UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

NUTRIENTES, ANTIOXIDANTES Y FLAVONOIDES EN SEMILLAS DE *Chenopodium quinoa* Willd CULTIVADAS EN MÉXICO Y ECUADOR

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIA

Presenta:

MAGALI ANABEL CAÑAREJO ANTAMBA

Bajo la supervisión de: DIANA GUERRA RAMÍREZ, DRA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
1854
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
APROBADA

Chapingo, Estado de México, diciembre de 2021

NUTRIENTES, ANTIOXIDANTES Y FLAVONOIDES EN SEMILLAS DE *Chenopodium quinoa* Willd CULTIVADAS EN MÉXICO Y ECUADOR

Tesis realizada por **MAGALI ANABEL CAÑAREJO ANTAMBA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:

DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

ASESOR:

DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:

DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR:

DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

LECTOR EXTERNO:

DRA. CAROLINA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

CONTENIDO

CONTENIDO ..... **iii**
LISTA DE CUADROS ..... **vi**
LISTA DE FIGURAS ..... **vii**
DEDICATORIAS ..... **xii**
AGRADECIMIENTOS ..... **xiii**
DATOS BIOGRÁFICOS ..... **xv**
RESUMEN GENERAL ..... **xvi**
GENERAL ABSTRACT ..... **xvii**
1. INTRODUCCIÓN GENERAL **1**
1.2. Objetivos 5
1.3. Literatura citada 5
2. REVISIÓN DE LITERATURA **9**
2.1. Origen y distribución 9
2.2. Producción 10
2.3. Variabilidad genética de la quinoa 11
2.4. Composición química del grano de quinoa 12
2.5. Compuestos fenólicos en semillas de quinoa 15
2.5.1. Ácidos fenólicos 15
2.5.2. Flavonoides 17
2.6. Betalaínas 20
2.7. Actividades biológicas de los compuestos fenólicos 20
2.8. Métodos de capacidad antioxidante 21
2.9. Técnicas de separación y purificación de compuestos flavonoides 23
2.9.1. Técnicas cromatográficas 23
2.9.2. Resonancia Magnética Nuclear 25

2.9.3. Espectrometría de masas 26
2.10. Literatura citada 26
3. COMPARISON OF NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL PROPERTIES OF *Chenopodium quinoa* CULTIVATED IN MEXICO AND ECUADOR 32
3.1. Abstract 32
3.2. Introduction 33
3.3 Material and Methods 34
3.3.1. Plant materials 34
3.3.2. Chemicals 35
3.3.3. Determination of color 35
3.3.4. Proximate and chemical analysis 35
3.3.5. Free amino acids profile identification 36
3.3.6. Fatty acid composition 36
3.3.7. Extraction and fractionation of samples 37
3.3.8. Total phenolics, flavonoids, and betalains content 37
3.3.9. Antioxidant capacity 38
3.3.10. Statistical analysis 39
3.4. Results and Discussion 39
3.4.1. Color study 39
3.4.2. Proximate and chemical analysis 40
3.4.3. Analysis of free amino acids 42
3.4.4. Fatty acid composition 44
3.4.5. Free and bound phenols and flavonoids content 45
3.4.6. Content of free and bound betalains in red quinoa 46
3.4.7. Antioxidant capacity 47
3.5. Conclusion 49
3.6. Acknowledgements 49
3.7. References 50

4. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES DE *Chenopodium quinoa* CULTIVADA EN LOS ANDES DEL ECUADOR .. 55

4.1. Resumen 55

4.2. Introducción 57

4.3. Materiales y Métodos 58

4.3.1. Material vegetal 58

4.3.2. Reactivos e instrumentación 58

4.3.3. Obtención de extractos de semillas de quinoa 59

4.3.4. Separación de compuestos flavonoides por cromatografía en columna abierta 60

4.3.5. Separación en fase sólida de fracciones ricas en flavonoides 61

4.3.6. Purificación de la fracción T4-20% por RP-HPLC semipreparativa 62

4.4. Resultados y Discusión 63

4.4.1. Elucidación estructural del compuesto QI 64

4.4.2. Elucidación estructural del compuesto QII 84

4.4.3. Elucidación estructural del compuesto QIII 96

4.5. Conclusiones 105

4.6. Literatura citada 105

5. CONCLUSIONES GENERALES 108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal en quinoa de grano blanco, rojo y negro (% en base seca) 13

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos esenciales presentes en quinoa comparado con otros cereales. 14

Table 3. Proximate analysis and mineral content of three quinoa cultivars. 41

Table 4. Fatty acids profile by gas chromatography on quinoa seeds cultivated in different regions. 44

Cuadro 5. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C y correlaciones, HMBC y COSY para la aglicona de QI en acetona-d_6. 72

Cuadro 6. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y de ^{13}C y correlaciones HMBC y COSY para la aglicona de QII en acetona-d_6 92

Cuadro 7. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C y correlaciones HBC y COSY para la aglicona de QIII en acetona-d_6. 104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de ácidos fenólicos presentes en semillas de quinoa 16
Figura 2. Estructura química de tipos de flavonoides..... 18
Figura 3. Estructura de flavonoides aislados en quinoa..... 19
Figure 4. Graphical representation of color parameters L*, a*, and b* of three quinoa cultivars (n=3)..... 40
Figure 5. Free amino acids profile of three quinoa cultivars. 43
Figure 6. Free and bound phenols (A) and flavonoids (B) content of three quinoa cultivars. 46
Figure 7. Antioxidant capacity by ABTS (A), FRAP (B) and DPPH (C) methods in quinoa cultivated in different regions. 48
Figura 8. Obtención de extractos de diferente polaridad a partir de semillas de quinoa. 60
Figura 9. Esquema general de aislamiento y purificación de flavonoides a partir del extracto acidificado EtOH/H_2O. 61
Figura 10. Perfil cromatográfico del extracto de semillas de quinoa blanca a 280 nm. Los tres primeros picos corresponden a los compuestos identificados. 63
Figura 11. Estructura molecular de los compuestos QI, QII, y QIII aislados de semillas de quinoa de Ecuador. 64
Figura 12. Espectro de RMN-^{1}H (700 MHz, acetona-d6) del compuesto QI. ... 65
Figura 13. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QI, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos. 66
Figura 14. Fórmulas parciales de los derivados de benceno que están contenidos en QI. 66
Figura 15. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QI. 67

Figura 16. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C del derivado QI, mostrando la zona de carbonos aromáticos. 68
Figura 17. Estructura y datos de RMN de ^{13}C de grupos carbonilo presentes en flavonoides que pueden estar presentes en la estructura del derivado QI (Pelter et al., 1976). 69
Figura 18. Estructura de la propiofenona mostrando un hidrógeno de hidroxilo fenólico a un grupo carbonilo de cetona. 70
Figura 19. Posibilidades de flavonoide A y flavonoide B que permiten establecer la estructura de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 70
Figura 20. Expansión de los espectros de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) publicados por la empresa Merck-Sigma Aldrich, que permiten asignar a la quercetina (flavonoide **A**) como la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 71
Figura 21. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones del protón de hidroxilo fenólico en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 73
Figura 22. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 73
Figura 23. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 74
Figura 24. Resumen gráfico de las correlaciones tipo HMBC de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa. 75
Figura 25. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C, mostrando señales importantes de azúcares presentes en el derivado QI. 76
Figura 26. Expansión del espectro bidimensional HSQC de los hidrógenos de los monosacáridos presentes en el derivado QI. 77
Figura 27. Expansión del espectro bidimensional HSQC de hidrógenos anoméricos de azúcares presentes en el derivado QI. 78

Figura 28. Expansiones del espectro bidimensional HMBC mostrando una correlación de la señal doble a 5.68 ppm de un hidrogeno anomérico de azúcar con la señal a 134.44 ppm del carbono C3 presente en el derivado QI..... 78
Figura 29. Estructuras parciales de interconexión de monosacáridos en el derivado QI, deducida del análisis de las correlaciones observadas en sus espectros de RMN. 79
Figura 30. Ejemplos de disacáridos y polisacáridos que muestran enlaces glicosídicos 1,4' y 1,6' que podrían ser modelos para deducir la interconexión de azúcares en el derivado QI. 80
Figura 31. Expansión del espectro HMBC de QI mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos..... 81
Figura 32. Estructura de posibles monosacáridos presentes en el derivado QI82
Figura 33. Asignaciones parciales resultantes de la correlación HMBC del derivado QI mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos y estructura molecular completa de QI. 83
Figura 34. Espectro de RMN-^{1}H (700 MHz, acetona-d_6) del compuesto QII.... 84
Figura 35. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QII, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos 85
Figura 36. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QII. 86
Figura 37. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C del derivado QII, mostrando la zona de carbonos aromáticos 87
Figura 38. Posible estructura de la aglicona y de sustitución glicosídica presente en el derivado QII, aislado de quinoa..... 88
Figura 39. Expansión del espectro HMBC mostrando la conexión del C3 de la aglicona del Kaempferol y el protón de un azúcar presente en QII..... 88
Figura 40. Expansión del espectro HSQC (Figura izquierda) que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A de la aglicona y diagrama de correlaciones HSQC y HMBC (Figura derecha) presente en el derivado QII..... 89

Figura 41. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QII, aislado de quinoa. 90
Figura 42. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos del anillo B y resumen gráfico de las correlaciones tipo HMBC de la aglicona presente en el derivado QII. 91
Figura 43. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C, mostrando señales importantes de azúcares presentes en el derivado QII 92
Figura 44. Expansión del espectro bidimensional HSQC de hidrógenos anoméricos de azúcares presentes en el derivado QII. 93
Figura 45. Expansión del espectro bidimensional HSQC de la zona de metilos y de azúcares presentes en el derivado QII. 94
Figura 46. Asignaciones parciales de las correlaciones HMBC y COSY y expansión del espectro HMBC mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos de QII. 95
Figura 47. Estructura molecular propuesta para el derivado QII aislado de semillas de quinoa. 96
Figura 48. Espectro de RMN-^{1}H (700 MHz, acetona-d_6) del compuesto QIII. .. 97
Figura 49. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QIII, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos 98
Figura 50. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QIII. 99
Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado QIII, mostrando la zona de carbonos aromáticos y la zona de carbonos base de hidroxilos de azúcares. . 99
Figura 52. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QIII, aislado de quinoa. 100
Figura 53. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A y B de la aglicona presente en el derivado QIII. 101

Figura 54. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QIII, aislado de quinoa. 102
Figura 55. Expansión del espectro HMBC (A) mostrando correlaciones con el carbono C3 y con el CH_2 y el anomérico de otro azúcar y asignaciones parciales de las correlaciones HMBC y COSY (B) de QIII. 103
Figura 56. Estructura molecular propuesta para el derivado QIII aislado de semillas de quinoa. 103

DEDICATORIAS

A Dios por poner en mi la fortaleza espiritual necesaria para poder avanzar en momentos de dificultad.

A mí por la constancia en mis estudios, por el tiempo invertido, y por la valentía de querer alcanzar mis metas.

A mi esposo Jesús Frutero por su apoyo incondicional y su ayuda en todo momento

A mi madre Elvia Antamba y a mi padre Ángel Cañarejo quienes con su ejemplo y amor me enseñaron a ser perseverante con mis objetivos y a creer que todo es posible si uno quiere.

A mis Hermanos; Glenda, Javier y Johana por su apoyo y su complicidad en todo momento.

A mis adorados sobrinos; Gabriel, Leandro, Ma. Emilia, Camila, Francisco, Sarahí, y Emma.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haber financiado mis estudios de Posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por darme la oportunidad de cumplir una meta más en vida profesional.

Al **Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria** y al personal administrativo por su apoyo durante el doctorado.

A los Doctores Diana Guerra Ramírez y Benito Reyes Trejo por creer en mí, por ser mis guías en el desarrollo de este trabajo y por aceptarme en su equipo de investigación.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares por sus atinadas observaciones y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los Doctores Marlen Mayorga Flores y Federico del Río Portilla por su colaboración durante mi estancia en el Laboratorio 1 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Ingeniero Oscar Bañuelos Tavárez de la Estación Experimental de Tlaltizapan, Morelos, del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por su colaboración con semillas cultivas en México.

Al Dr. Vijay Yoshi del Departamento de Ciencias de Horticultura, Texas A&M AgriLife Research, USA, por su colaboración en la realización de análisis químicos.

A la Dirección Distrital de Imbabura del Ministerio de Agricultura y Ganadería por su contribución con semillas de quinoa cultivadas en la Sierra Norte del Ecuador.

A los Doctores Holber Zuleta, Ma. Rosa González, Ricardo Domínguez, e Irma Salgado por el apoyo y por sus atinadas sugerencias durante el desarrollo experimental de mi tesis.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Productos Naturales del Área de Química; Guillermina Hernández, Ulises Murrieta, y Néstor Hernández, por su amistad, por su apoyo, y por su complicidad durante la fase experimental.

A mis queridos compañeros de la cuarta generación del Doctorado en Ciencias Agroalimentarias por hacer que mi estancia en el Posgrado sea más agradable y por compartir conmigo este periodo de formación académica.

A Daysi Gómez, Verenice Torrez, Daniel Miranda, Diana Becerra, Paulina González, y Alberto Mendoza por su amistad, su apoyo, y sus consejos durante estos cuatro años de estancia en el Posgrado.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales



Nombre: Magali Anabel Cañarejo Antamba
Fecha de nacimiento: 10 de febrero de 1984
Lugar de nacimiento: Otavalo, Provincia de Imbabura, Ecuador
CURP: CAAM840210MNEXNG07

Desarrollo académico

Pregrado: Ingeniera agrónoma
Universidad: Universidad Central del Ecuador
País: Ecuador
N° registro SENESCYT: 1005-10-988412

Posgrado: Maestra en Ciencias en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad: Universidad Autónoma Chapingo
País: México
N° registro SENESCYT: 5641R-14-39546

Ha sido técnica de campo en el área de Fomento Agro productivo del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca de Ecuador durante el período 2010-2012. Se ha desempeñado como transferencista Agropecuario en el área de Manejo de ensayos de difusión y validación de tecnologías del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) del Ecuador durante el período de 2015. También, fue docente universitario de la Universidad Técnica del Norte del Ecuador desde el periodo octubre de 2015 hasta febrero de 2018. Finalmente, desarrolló proyectos de investigación titulados “Evaluación agroeconómica de cuatro categorías de tubérculo-semilla de papa (*Solanum tuberosum*), con pequeños agricultores del cantón Mejía, Pichincha” y “Tortilla nutracéutica obtenida de maíz de grano azul: Formulación y vida de anaquel”.

RESUMEN GENERAL

Nutrientes, antioxidantes y flavonoides en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd cultivadas en México y Ecuador

Las semillas de *Chenopodium quinoa,* ricas en nutrientes y compuestos bioactivos carecen de estudios en regiones diferentes a las de su hábitat de origen. El objetivo de este trabajo fue analizar y comparar las propiedades nutricionales y antioxidantes de semillas de quinoa cultivadas en Ecuador y México, así como determinar la estructura molecular de algunos flavonoides. El cultivo de quinoa mexicana fue adaptado y mejorado a las condiciones climatológicas del Estado de Morelos, mientras que los dos cultivares de Ecuador, fueron proporcionados por agricultores de la región. Las propiedades nutricionales se evaluaron mediante los siguientes estudios: análisis proximal, contenido mineral, perfil de aminoácidos y de ácidos grasos. Se cuantificaron los fenoles y betalaínas totales, y la capacidad antioxidante. De las semillas blancas de Ecuador se obtuvieron cinco extractos de polaridad creciente. Del extracto hidro-etanólico se aislaron, por HPLC, tres flavonoides cuya estructura química fue elucidada por RMN de ^{1}H y ^{13}C y experimentos bidimensionales COSY, HMBC y HSQC. Las semillas blancas de Ecuador contienen la mayor concentración de proteínas (16.59 g 100 g^{-1}). La concentración de minerales P, Ca y Mg fue más alta en los granos de quinoa mexicana: 424.66, 60.33, y 152.33 mg 100 g^{-1}, respectivamente. Por otro lado, los aminoácidos arginina, ácido glutámico y alanina fueron los más abundantes en los tres cultivares y los porcentajes de ácidos grasos insaturados varió entre 74 y 78%. Las semillas de quinoa mexicana presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos del orden de 2.9 mg EAG g^{-1}. La concentración de betalaínas en quinoa roja fue de 83.3 mg 100 g^{-1}. A partir del extracto hidro-etanólico, el cual mostró un mayor rendimiento y una mayor capacidad antioxidante, se aislaron y purificaron los flavonoides quercetina 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**1),** kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**2**) y quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**3**), este último descrito por primera vez.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa*, flavonoides, capacidad antioxidante

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Magali Anabel Cañarejo Antamba
Directora de Tesis: Diana Guerra Ramírez, Dra.

GENERAL ABSTRACT

Nutrients, antioxidant, and flavonoids in *Chenopodium quinoa* Willd seeds grown in Mexico and Ecuador

Chenopodium quinoa seeds, abundant in nutrients and bioactive compounds, lack studies in different regions from those of their original habitat. In this work, the nutritional and antioxidant properties of quinoa seeds that grown in Ecuador and in Mexico were analyzed and compared. Also, the determination of the molecular structure of some flavonoids was done. The Mexican quinoa cultivation was adapted to the climatic conditions in the State of Morelos, while the two cultivars from Ecuador were provided by farmers of these region. The nutritional properties were evaluated using these studies: proximal analysis, mineral content, amino acid, and fatty acid profile. Total phenols, betalains, and antioxidant capacity were quantified. Five extracts of increased polarity from white seeds from Ecuador were obtained. Three flavonoids were isolated by HPLC from the hydroethanolic extract, and their chemical structure was elucidated by ^{1}H and ^{13}C NMR and bidimensional experiments such as COSY, HMBC, and HSQC. The white seeds from Ecuador contain the highest proteins concentration of 16.59 g 100 g^{-1}. The concentration of P, Ca, and Mg minerals was higher in Mexican quinoa grains: 424.66, 60.33, y 152.33 mg 100 g^{-1}, respectively. On the other hand, arginine, glutamic acid and alanine were the most abundant amino acids in the three cultivars and the percentages of unsaturated fatty acids varied from 74 to 78%. Mexican quinoa seeds presented the highest content of phenolic compounds of the order of 2.9 mg EAG g^{-1}. The concentration of betalain in red quinoa was 83.3 mg 100 g^{-1}. The next flavonoids compounds: quercetin 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-rhamnopyranose)-β-galactopyranose (**1)** kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopyranose)-β-galactopyranose (**2**) and quercetin 3-O-(6´´-O-α-rhamnopyranosa)-β-galactopyranose (**3**) were isolated and purified from hydroethanolic extract, which showed a higher yield and a higher antioxidant capacity than the other extracts. Compound **3** was described for the first time.

Key words: *Chenopodium quinoa*, flavonoids, antioxidant capacity

Thesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Magali Anabel Cañarejo Antamba.
Advisor: Diana Guerra Ramírez, Dra.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un grano alimenticio nativo de la región Andina perteneciente a la familia de las Amarantaceas. Este grano es producido tradicionalmente en países como Bolivia, Colombia, Perú, Ecuador y Chile, pero también es cultivado en países como México, Estados Unidos, Canadá, España, Francia, Reino Unido, China, y en el continente Africano (Alandia et al., 2020). La producción mundial anual de este grano es de 150.000 toneladas (Hernández-Ledesma, 2019) y cerca del 74% de esta producción es cubierta por la países Andinos (Alandia et al., 2020). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Ecuador es el tercer productor de quinoa más importante de América del Sur con una producción anual para el 2019 de 4.5 toneladas. Mientras que, en México la quinoa es cultivada en forma dispersa y en pequeñas unidades experimentales, razón por la cual no existen registros oficiales de producción. Este grano puede crecer desde el nivel del mar hasta 400 metros de altitud y tolerar condiciones extremas de suelo y clima (Melini & Melini, 2021). En cuanto a la diversidad genética, aproximadamente 250 especies del género *Chenopodium* son cultivadas en diferentes regiones del mundo (Hernández-Ledesma, 2019), y parámetros como color, forma del grano, tipo de inflorescencia, contenido de proteína, saponinas y betalaínas son variables de interés para su conservación y adaptación (Rojas et al., 2011).

Las semillas de quinoa son reconocidas como un super alimento debido a su alto valor nutricional y beneficios potenciales para la salud (Filho et al., 2017). Estas semillas presentan un contenido de proteína entre 10 y 14% (Lee & Sim, 2018) y

un adecuado balance de aminoácidos principalmente de lisina, treonina y metionina (Vega-Gálvez et al., 2010) que son superiores a cereales como el arroz, maíz y trigo (Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017). Además, la quinoa es fuente de azúcares libres, ácido orgánicos, lípidos (Pellegrini et al., 2018; Pereira et al., 2019), y vitaminas C, B1, B2, B6 y E, las cuales son esenciales para la salud humana. También se conoce que la quinoa concentra cantidades significativas de los minerales calcio, fósforo, hierro, potasio, magnesio, zinc, entre otros y algunos de éstos se encuentran en cantidades superiores a los cereales tradicionales (Filho et al., 2017).

Adicionalmente a los macronutrientes, la quinoa también contiene varios metabolitos secundarios como son los ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos nitrogenados como las betalaínas (Lin et al., 2019). Estos compuestos intervienen en diversas funciones fisiológicas de la planta, como mecanismo de defensa natural y contribuyen en las características sensoriales de los frutos y vegetales. Cabe resaltar que los compuestos fenólicos tienen un efecto positivo en la salud de las personas debido a su capacidad para atrapar radicales libres, los cuales están relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiodegenerativas, cáncer, diabetes, neurodegenerativas, inflamatorias y bacterianas (Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017). En semillas de quinoa, el contenido de compuestos fenólicos totales varía desde 16.8 hasta 59.7 mg 100 g^{-1} y aproximadamente entre el 7 y 60% de este contenido corresponde a los ácidos fenólicos (Wang & Sun, 2019). Asimismo, en variedades de quinoa de color rojo y negro cultivadas en Perú han reportado fenoles totales desde 2.5 hasta 7.9 mg EAG g^{-1} (Abderrahim et al., 2015), mientras que, quinoas cultivadas en China han reportado valores entre 1000 y 1500 mg EAG 100 g^{-1} y para flavonoides totales entre 350 y 450 mg ER 100 g^{-1} (Liu et al., 2020). Esta variación en el contenido está relacionado con las condiciones del cultivo, la variabilidad genética de la especie y el método experimental (Fischer et al., 2013). También,

se ha documentado en quinoa la identificación de 23 compuestos fenólicos, de los cuales la mayoría fueron ácidos fenólicos junto con los flavonoides quercetina y kaempferol (Tang et al., 2015). Estos dos últimos compuestos son los polifenoles mayoritarios en la quinoa con concentraciones individuales de 0.84 mg g^{-1} (Hernández-Ledesma, 2019).

Por otro lado, algunos estudios han identificado la composición estructural de compuestos derivados de quercetina y kaempferol glicosilado en semillas de quinoa blanca, roja y negra (Dini et al., 2004; Gómez-Caravaca et al., 2011; Hirose et al., 2010; Pereira et al., 2020). Para la identificación de estos compuestos generalmente se utilizan la combinación de métodos cromatográficos, resonancia magnética nuclear (RMN) mononucleares y binucleares, espectrometría de masas e FT-IR. Inicialmente, la espectroscopía de FT-IR permite determinar los posibles grupos de compuestos con base en su absorbancia característica, mientras que el resto de métodos contribuyen con la separación e identificación de los compuesto (Cheynier, 2012). Los resultados de estos estudios demostraron la presencia de quercetina y kaempferol glicosilados en el carbono C-3, además de los ésteres glucosílicos del ácido vanílico. Los residuos de azúcares que más comúnmente se encuentran unidos a los flavonoides encontrados en las semillas de quinoa son glucosa, galactosa, ramnosa, y apiosa. La quercetina y kaempferol glicosilados son potentes antioxidantes capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno (EROS), causantes del estrés oxidativo, y exhibir propiedades biológicas en beneficio de la salud de las personas (Xiao, 2017).

Aunque varios estudios describen las cualidades nutricionales y nutracéuticas de variedades de quinoa adaptadas en distintas regiones de todo el mundo (Miranda et al., 2011; Pellegrini et al., 2018; Pereira et al., 2019; Tang et al., 2015), a la fecha no se habían descrito estudios de variedades nativas de Ecuador y genotipos adaptados en México. Tampoco se había explorado el tipo de

metabolitos secundarios en semillas de quinoa de Ecuador. Bajo este contexto, surge el interés de comparar las propiedades nutricionales y antioxidantes entre las semillas de quinoa mexicana y de quinoa ecuatoriana. Así como, aislar e identificar compuestos bioactivos en extractos de quinoa ecuatoriana.

Este trabajo está dividido en cuatro capítulos, el primero consta de una introducción general, el segundo corresponde a la revisión de la literatura relacionada con los principales temas en los que se basa esta tesis: propiedades nutricionales, antioxidantes y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de extractos de semillas de quinoa.

En el tercer capítulo se describe la comparación de las propiedades nutricionales y antioxidantes de los tres cultivares de quinoa estudiados, uno adaptado a las condiciones edafoclimáticas del Estado de Morelos, México y dos provenientes de los Andes del Ecuador. Las propiedades nutricionales fueron estudiadas evaluando la composición proximal, el contenido mineral, y los perfiles de aminoácidos y ácidos grasos. En tanto que, las propiedades antioxidantes se evaluaron cuantificando los fenoles totales, betalaínas y por los ensayos ABTS, FRAP y DPPH. Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista Chilean Journal Agricultural Research con el título “Comparision of nutritional and nutraceutical properties of Chenopodium quinoa cultivated in Mexico and Ecuador”, DOI: 10.4067/S0718-58392021000400507. Octubre 2021. Por esta razón, se incluye en la tesis con las normas editoriales de la revista.

En el cuarto capítulo se detalla el proceso de separación e identificación de tres metabolitos secundarios. A partir del extracto hidro-alcohólico de las semillas de quinoa se aislaron y purificaron, mediante diferentes técnicas cromatográficas, los flavonoides quercetina 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**1),** kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**2**) y quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**3**). La estructura

química de estos compuestos fue elucidada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, RMN de H^1, C^{13} y experimentos bidimensionales HMBC, HSQC, y COSY, cabe mencionar que, de acuerdo con la literatura, el compuesto **3** resultó ser un nuevo producto natural.

1.2. Objetivos

General:

Comparar las propiedades nutricionales y el potencial nutraceútico de semillas de quinoa cultivadas en Ecuador, respecto a las cultivadas y adaptadas en condiciones edafoclimáticas diferentes a las de su hábitat de origen, para valorar su consumo y aplicaciones en la agroindustria.

Particulares:

- Analizar las propiedades nutricionales y antioxidantes de tres accesiones de semillas de quinoa, dos provenientes de Ecuador y una cultivada y adaptada en el estado de Morelos, México, para determinar si las condiciones ecológicas influyen en la composición de nutrientes y potencial nutracéutico.

- Aislar y purificar, mediante técnicas cromatográficas, metabolitos secundarios a partir de extractos polares de semillas de quinoa.

- Elucidar la estructura molecular, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos polares de semillas de quinoa.

1.3. Literatura citada

Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M. C., & Condezo-hoyos, L. (2015). Physical features , phenolic compounds , betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd .) from Peruvian Altiplano. *Food Chemistry*, *183*, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.029

Alandia, G., Rodriguez, J. P., Jacobsen, S. E., Bazile, D., & Condori, B. (2020). Global expansion of quinoa and challenges for the Andean region. *Global Food Security*, *26*(March), 100429. https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100429

Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, *11*(2–3), 153–177. https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8

Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2004). Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chemistry*, *84*(2), 163–168. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00185-7

Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., & Coimbra, J. S. D. R. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(8), 1618–1630. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811

Fischer, S., Wilckens, R., Jara, J., & Aranda, M. (2013). Variation in antioxidant capacity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Will) subjected to drought stress. *Industrial Crops and Products*, *46*, 341–349. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.037

Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Caboni, M. F. (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(20), 10815–10825. https://doi.org/10.1021/jf202224j

Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, *2*(3), 27. https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556

Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T., & Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*, *119*(4), 1300–1306. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.008

Lee, M., & Sim, K. H. (2018). Nutritional value and the kaempferol and quercetin contents of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) from different regions. *Foos Science and Technology*, *50*(6), 680–687.

Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019). Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. *Molecules*, *24*(13). https://doi.org/10.3390/molecules24132512

Liu, M., Zhu, K., Yao, Y., Chen, Y., Guo, H., Ren, G., … Li, J. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of phenolic compounds from white,

red, and black *Chenopodium quinoa* seed. *Cereal Chemistry*, *97*(3), 703–713. https://doi.org/10.1002/cche.10286

Melini, V., & Melini, F. (2021). Functional components and anti-nutritional factors in gluten-free grains: A focus on quinoa seeds. *Foods*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/foods10020351

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Uribe, E., López, J., Martínez, E., Rodríguez, M. J., … Di Scala, K. (2011). Physico-chemical analysis, antioxidant capacity and vitamins of six ecotypes of chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Procedia Food Science*, *1*, 1439–1446. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.213

Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, *111*(July 2017), 38–46. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006

Pereira, E., Cadavez, V., Barros, L., Encina-Zelada, C., Stojković, D., Sokovic, M., … Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Chenopodium quinoa* Willd. (quinoa) grains: A good source of phenolic compounds. *Food Research International*, *137*(May), 109574. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109574

Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., & C.F.R. Ferreira, I. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, *280*(December 2018), 110–114. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.068

Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., Blajos, J., & Santivañez, T. (2011). La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO*, *37*, 66. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010

Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P. X., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterisation of phenolics , betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd . genotypes. *Food Chemistry*, *166*, 380–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of*

Food and Agriculture, *90*(15), 2541–2547. https://doi.org/10.1002/jsfa.4158

Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*, *14*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.007

Wang, J., & Sun, B. (2019). Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods. In *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6167-8

Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(9), 1874–1905. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) ha sido por décadas un alimento básico pre-hispánico para las comunidades de la región Andina. Según las características botánicas, la quinoa pertenece a la familia de las Amaranthaceas, es una planta dicotiledonea que puede crecer hasta una altura de 3 metros. Las semillas de quinoa son pequeñas con un diámetro entre 1 a 2.5 mm y su color varía entre el blanco y negro con tonalidades amarillas, marrón, rosado y rojo; sus semillas se asemejan en función y composición a las de los verdaderos cereales, motivo por el que se denomina "pseudocereal" (Mir, Riar, & Singh, 2018). La planta tolera condiciones ambientales de estrés abiótico (resistencia a suelos salinos, heladas, y sequedad), y puede ser cultivada desde el nivel del mar hasta 4000 metros de altitud (Vega-Gálvez et al., 2010). Esta amplia adaptación ha permitido que la semillas puedan expandirse a otros paises como China (Li et al., 2018), Corea (M. Lee & Sim, 2018), Alemania (Präger et al., 2018), Dinamarca, Polonia, Italia, Suecia, y África, lugares donde se ha destacado como un alimento potencial para su consumo (Bhargava & Ohri, 2016; Ruiz et al., 2014). En consecuencia de esto, tanto la diversificación como la investigación de la quinoa ha incrementado de manera exponencial y constante en diferentes lugares del mundo.

En el año 2013, semillas de quinoa peruana fueron introducidas por primera vez en México y adaptada a diferentes condiciones ecológicas. Posteriormente, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y otras instituciones de investigación agrícola extendieron el cultivo de quinoa a la región

norte (Torreón, Coahuila a 1300 m.s.n.m.), a la región centro (Texcoco, México; Valle de Toluca entre 2300 y 2600 m.s.n.m.), a la zona cálida del Estado de Morelos a 940 m.s.n.m., y a la región sur (Veracruz a 10 m.s.n.m.). En la región Andina, se han identificado sitios de dispersión de las semillas de quinoa ubicados en los alrededores del Lago Titicaca en Bolivia y Perú. Sin embargo, la distribución natural de las semillas va desde Colombia hasta parte del sur de los Andes de Chile, e incluye a Bolivia, Ecuador, Perú, y Argentina, éstos países a su vez son responsables de su biodiversidad (Ruiz et al., 2014).

4.4. Producción

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) es un grano antiguo de alto valor cultural y considerado por la población andina como un alimento sagrado. La alta adpatabilidad de la quinoa a condiciones ambientales extremas ha permitido diversificar la producción en regiones distintas a las de su origen, como la India, USA, China, Canadá, y Europa (Hernández-Ledesma, 2019). La producción mundial anual de este grano es de 159 647 toneladas para el 2018 con una tendencia de crecimento anual. En Sur América, hasta ahora, la producción de quinoa se ha concentrado principalmente en Perú y Bolivia con 88.2 ton/ha y 68.9 ton/ha respectivamente, y en menor volúmen en Ecuador con 4.5 toneladas para el año 2019 (FAO, 2019). Para el Ecuador la quinoa es un alimento clave para fomentar la seguridad alimentaria de la región; sin embago, su producción en los últimos cinco años ha tenido un declive debido a factores sociales, agronómicos, tecnológicos y limitaciones de comercialización. Sus semillas son producidas por familias y asociaciones campesinas de las provincincias de Carchi, Imbabura, Chimborazo, y Pichincha, principalmente. No se registra en el sistema de información nacional el tipo de variedad de quinoa cosechada. En México la quinoa es un cultivo nuevo y se produce en pequeñas cantidades, razón por la cual no existen registros oficiales de producción.

En distintos estudios se ha informado que el cultivo de quinoa puede crecer en condiciones extemas de temperatura (-4 a 38°C), bajas precipitaciones (50 mm/año) y suelos pobres en nutrientes, por tanto se convierte en un cultivo estratégico para las regiones de África y Asia, donde la producción de alimentos es limitada a causa del cambio climático y desertificación (Graf et al., 2015). Las semillas de quinoa están presentes en la elaboración de múltiples productos alimenticios (pastas, chocolates, harinas, alimentos de animales, horneados, germinados, bebidas, barras energéticas, entre otras) y aporta cantidades importantes de nutrientes, principalmente de proteína y lípidos (Ceyhun & Sanlier, 2019). En la actualidad la harina de quinoa puede ser utilizada como un ingrediente sustituto funcional del trigo para la preparación de productos de panadería sin gluten (Romano et al., 2019). La creciente demanda de las personas por alimentos nutritivos con potencial terapéutico motiva a la Industria Alimentaria hacia la producción y utilización del cultivo de quinoa en distintas partes del mundo.

2.3. Variabilidad genética de la quinoa

La adaptación de la quinoa a condiciones ambientales distintas a las de su origen ha permitido promover la agrobiodiversidad de especies y conservación de los recursos naturales en una zona específica. La diversidad genética de la quinoa abarca cerca de 3.121 variedades del género Chenopodium, y su conservación y manejo está bajo responsabilidad de Instituciones Agrarias y Universidades distribuidas en toda la franja Andina. Los países Bolivia y Perú concentra la mayor variabilidad genética de la especie (5000 accesiones) seguido de Ecuador, donde se conservan 642 accesiones aproximadamente. Estos países conservan a la quinoa dentro de bancos de germoplasma, en donde sus semillas mantienen una actividad fisiológica mínima para evitar la pérdida de viabilidad (Rojas et al., 2011). Según Hernández-Ledesma (2019) aproximadamente 250 especies del

género *Chenopodium* son cultivadas en todo el mundo, las cuales incluyen a materiales vegetales silvestres y cultivadas en campos andinos.

La diversidad genética se ha clasificado de acuerdo con criterios de; morfología, fenología, genética y de historia de cultivo, que permiten agrupar en distintas poblaciones. Sin embargo, la valoración del hábito de crecimiento, color de la planta, color y forma del grano, inflorescencia, contenido de proteína, saponinas y betalaínas parecen ser los criterios más importantes de clasificación (Rojas et al., 2011). Uno de los componentes de la variabilidad fenotípica es el color del grano, y en la mayoría de las accesiones identificadas en la región Andina se presentan variantes de grano pigmentado. Los granos de quinoa muestran una amplia gama de tonalidades que incluyen; blanco, crema, amarillo, rosa, rojo, morado, café y negro. El color de las semillas pigmentadas se debe a que las betalaínas se encuentran localizadas en el pericarpio del grano. Las betalaínas son pigmentos naturales utilizados en productos alimenticios y farmacéuticos y poseen importantes propiedades biológicas para el cuerpo humano (Graf et al., 2015).

2.4. Composición química del grano de quinoa

Las accesiones de quinoa que han sido adaptadas en distintas partes del mundo reportan una composición promedio del 15.3% de proteína y 70% de carbohidratos (Filho et al., 2017). Las semillas pigmentadas (rojo/negro) presentan mayor contenido de carbohidratos (Pereira et al., 2019) y un alto contenido de fibra dietaria insoluble (Pellegrini et al., 2018). La composición proximal de la quinoa blanca, roja y negra se muestra en el Cuadro 1.

Por otro lado, el cultivo de quinoa podría ser una alternativa de semillas oleaginosas por su alta calidad y contenido de ácidos grasos, prinicipalmente de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoléico (48-52%) y linolénico (4.6-8.0%) (Filho et al., 2017). Estudios han demostrado que los ácidos grasos

poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) ejercen un impacto positivo sobre la salud de las personas, debido a que están asociados con la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertenión, diabetes, entre otras. Asimismo, el contenido de PUFA en semillas de quinoa supera a lo reportado en aceites de maní, almendra, oliva, coco, germen de trigo y germen de arroz (Orsavova et al., 2015).

Cuadro 1. Composición proximal en quinoa de grano blanco, rojo y negro (% en base seca)

Componente (%)	Quinoa		
	Blanca	Roja	Negra
Humedad	8.8	7.9	7.4
Proteína	13.5	14.5	13.8
Cenizas	2.4	2.5	2.5
Lípidos	5.7	6.6	6.1
Carbohidratos	74.1	73.2	76.3

Fuente: Pereira et al. (2019) y Pellegrini et al. (2018).

La quinoa es considerada como un alimento de alta calidad proteíca debido a la presencia de aminoácidos esenciales, los cuales son necesarios para los distintos procesos metabólicos del cuerpo humano y benefician la salud. En particular, la proteína de quinoa es alta en lisina, histidina, y metionina, aminoácidos que son limitante en cereales tradicionales como trigo, cebada, maíz, y soya. Las principales proteínas de almacenamiento en la quinoa según el orden de abundancia son la globulina (37%) y albumina (35%), estos porcentajes podrían cambiar según la variedad de la especie. La globulina de tipo 11S, también denominada Chenopodina, es una proteína hexamérica que consta de subunidades básicas y ácidas unidas por un enlace disulfuro con un peso molecular de 320 kilo Daltones (kDa). Mientras que, la albumina de tipo 2S esta conformada por fragmentos heterogéneos de proteína unidos por dos enlaces disulfuro con un peso molecular entre 8 a 9 kDa (Dakhili et al., 2019). Según los requerimientos nutricionales de la FAO, la quinoa es un alimento referencial de

una dieta adecuada para infantes, niños y adultos (Abugoch-James, 2009). El perfil de aminoácidos escenciales con respecto a otros cereales se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos esenciales presentes en quinoa comparado con otros cereales.

		(%)		
Aminoácidos	Quinoa	Maíz	Arroz	Trigo
Isoleucina	4.9	4.0	4.1	4.2
Leucina	6.6	12.5	8.2	6.8
Lisina	6.0	2.9	3.8	2.6
Metionina	5.3	4.0	3.6	3.7
Fenilalanina	6.9	8.6	10.5	8.2
Treonina	3.7	3.8	3.8	2.8
Triptófano	0.9	0.7	1.1	1.2
Valina	4.5	5.0	6.1	4.4

Fuente: Silva et al. (2020)

Además del contenido de proteína, lípidos y carbohidratos, la quinoa es rica en micronutrientes como vitaminas y minerales. Algunas vitaminas identificadas en este pseudocereal son ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol (vitamina E) , thiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), así como altas concentraciones de ácido fólico. Se ha informado que el contenido de riboflavina (B2) en una porción de 100 gramos de quinoa alcanza a cubrir cerca del 80% de los requerimientos de los niños y el 40% de los de adultos (Semra Navruz-Varli y Nevin Sanlier, 2016). Tambien se resalta la presencia de minerales principalmente de potasio (0.01-502 g/100g), fósforo (140-530 g/100g), magnesio (26-502 g/100g), y calcio (27.5-148.7 g/100g) en cantidades suficientes para una dieta balanceada (Hernández-Ledesma, 2019). Todos estos micronutrientes constituyen un componente importante de alimentación.

2.5. Compuestos fenólicos en semillas de quinoa

Adicional a los macronutrientes, la quinoa posee algunos metabolitos secundarios que incluyen a los ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos nitrogenados (betalaínas). Estos metabolitos actúan como protección de la planta frente a condiciones de estrés ambiental y exhiben efectos positivos sobre la salud humana por sus varias actividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatoria, anticancerígenas, antibacterianas, inmunoreguladoras y antidiabéticas (Vilcacundo & Hernández-Ledesma, 2017; Lin et al., 2019). Por tanto, los beneficios potenciales de la quinoa para la salud, además de sus macro y micronutrientes, son los metabolitos secundarios que también contribuyen en ella.

2.5.1. Ácidos fenólicos

Estructuralmente, los ácidos fenólicos son compuestos que contienen un anillo aromático con al menos uno o más sustituyentes hidroxilo (OH); estos compuestos pueden existir en forma libre o como fenoles ligados a estructuras de la pared celular vegetal (Balasundram et al., 2006). En quinoa, los ácidos fenólicos se encuentran localizados principalmente en el pericarpio de las semillas y se han reportado más comúnmente los ácidos vanílico, p-hidroxibenzoico, gálico, p-cumárico, ferúlico y cafeico (Figura 1). Aproximadamente 22 compuestos fenólicos en forma libre y conjugada han sido encontrados en semillas de quinoa; la mayoría fueron ácidos fenólicos junto con los flavonoides quercetina y kaempferol (Tang & Tsao, 2017). Liu et al. (2020) informaron que el ácido ferúlico (76-251 mg/kg), vanílico (14-523mg/kg), y p-cumárico (10.6 mg/kg) son los ácidos fenólicos más abundantes en quinoa y aseguran que la quinoa de color rojo y negro concentran mayor contenido de ácidos fenólicos libres. El ácido siríngico es mayoritario en estas quinoas.

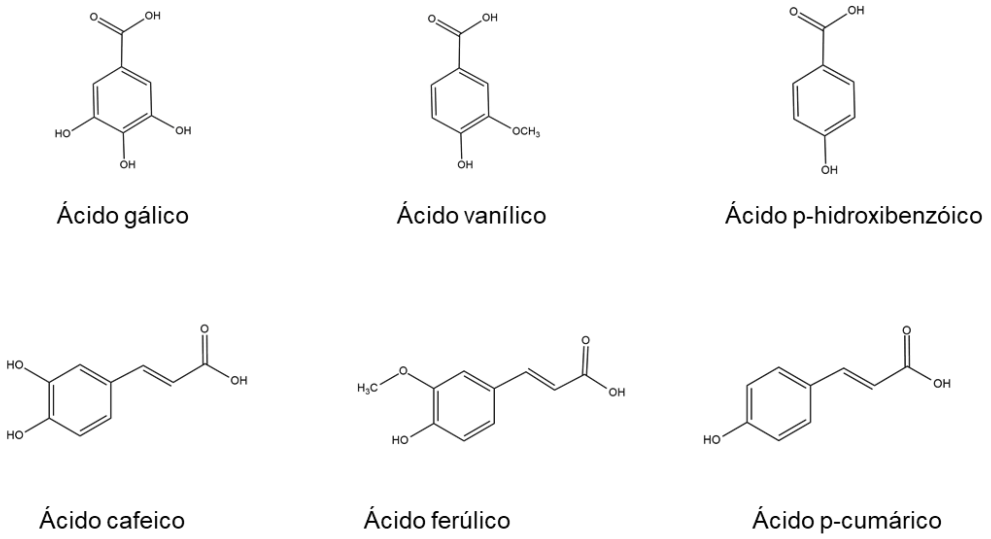


Figura 1. Estructura de ácidos fenólicos presentes en semillas de quinoa (Tang & Tsao, 2017).

En otro estudio, encontraron los mismos resultados en quinoa cultivada en Canadá, y adicionaron la presencia de los compuestos betaninas e isobetaninas en semillas de quinoa roja y negra (Tang et al., 2015). El contenido de compuestos fenólicos totales cambió según la variedad y el grado de molienda de las semillas. Han et al. (2019) encontraron que el contenido total de fenólicos de quinoa cultivada en China disminuyó de 200.4 a 137.36 mg EAG 100 g^{-1} con el aumento del tiempo de molienda del grano de 0 a 70 segundos. Los valores de capacidad antioxidante también disminuyeron de manera similar (cercano al 40%). La estructura química de los compuestos fenólicos le confiere propiedades antioxidantes, las cuales están relacionadas con la prevención de enfermedades degenerativas. En la actualidad, las enfermedades coronarias son la principal causa de muerte, por lo que alimentos de alto valor nutricional y ricos en antioxidantes naturales podrían contribuir con la protección cardiovascular e incrementar la calidad de vida de las personas (Filho et al., 2017).

2.5.2. Flavonoides

Los flavonoides en el grano de quinoa están localizados en la cubierta del grano y contribuyen a diversos efectos fisiológicos de la planta. Estos compuestos pertenecen al grupo de polifenoles mayoritarios, y su estructura básica consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una unidad de tres carbonos. Las semillas de quinoa concentran entre 36.2 a 144.3 mg g^{-1} de flavonoides totales (Wang & Sun, 2019); sin embargo, estos valores varían según las condiciones del cultivo, variabilidad genética y factores ambientales (Miranda et al., 2011). Los flavonoides principales en esta especie son la quercetina y el kaempferol, además de las agliconas, acacetina, mircetina, daidzeina, y genisteína. Según sus características estructurales, estos compuestos pueden clasificarse como flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, e isoflavonas (Lin et al., 2019). Los flavonoles glicosilados son los compuestos más abundantes en esta especie; están constituidos principalmente por derivados de quercetina y kaempferol (Figura 2) con concentraciones alrededor de 0.84 mg g^{-1} de cada compuesto (Hernández-Ledesma, 2019). Como se mencionó anteriormente, la interacción genotipo-ambiente (G×A) es un factor relevante para la acumulación de estos compuestos. Por otro lado, se ha demostrado que los derivados glicosilados de quercetina y kaempferol identificados en quinoa presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora y antibacteriana (Lin et al., 2019). Estas propiedades benéficas están asociadas con su relación estructura-actividad, donde el tipo de glicosilación y la posición del azúcar influyen sobre una mayor o menor bioactividad, así como en su estabilidad química y enzimática (Lee et al., 2019; Xiao, 2017).

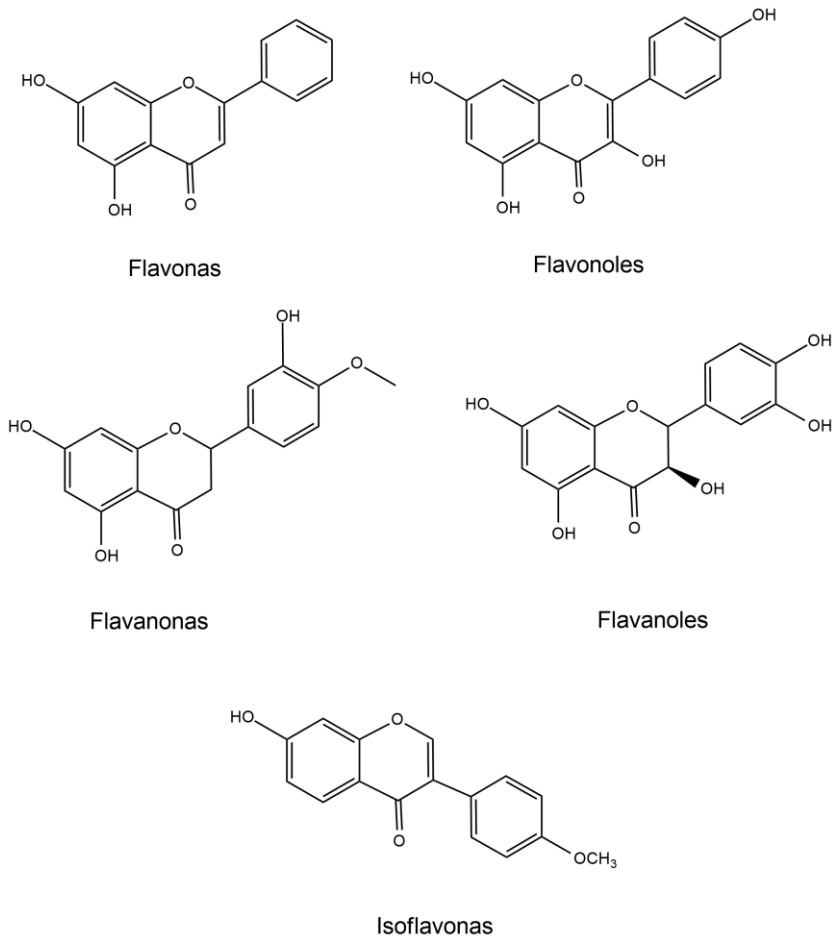
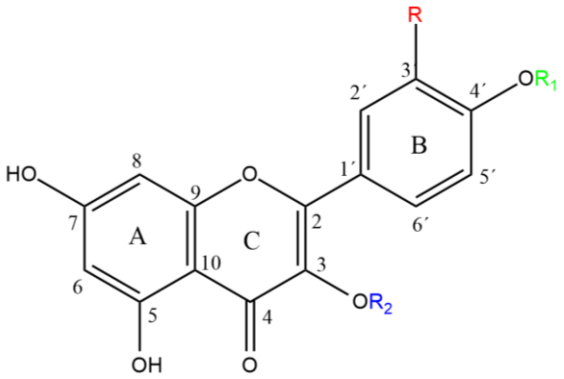


Figura 2. Estructura química de tipos de flavonoides

La obtención de quercetina y kaempferol glicosilados en extractos de *Chenopodiumm quinoa* ha sido reportada por varios autores. Por ejemplo, Pereira et al. (2020) evidenciaron la presencia flavonoides, en semillas de quinoa cultivadas en Perú, cinco derivados glicosilados de la quercetina y tres derivados glicosilados del kaempferol. Estos compuestos fueron extraídos en los disolventes etanol/agua y analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, siglas en inglés) y por espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/MS, siglas en inglés). Las estructuras químicas de las moléculas derivadas de quercetina y kaempferol se muestra en la Figura 3. Estos compuestos también fueron identificadas previamente por Dini et al. (2004) en la

quinoa dulce var. Kancolla cultivada en Perú y por Hirose et al. (2010) en la variedad de quinoa NL-6 cultivado en Japón.



R	R_1	R_2	m/z: $[M-H]^-$
OH	H	quercetina-3-O-(2,6-di-O-α-ramnopiranosilo-β-galactopiranosilo)	755
OH	H	quercetina-3-O-(2,6-di-O-α-ramnopiranosilo-β-glucopiranosido)	755
OH	H	quercetina-3-O-β-apiofuranosilo-6-O-α-ramnopiranosilo-β-galactopiranosilo	741
OH	H	quercetina-3-O-[β-D-apiofuranosilo (1´´´´→2´´)-β-D-galactopiranosido	595
OH	H	quercetina-glucuronida	477
OH	H	quercetina-3-O-glucosida	463
H	H	kampferol-3-O-(2,6-di-O-α-ramnopiranosilo-β-galactopiranosilo)	739
OCH_3	CH_3	kaempferol-3-O-β-D-apiofuranosilo (1´´´→2´´)-O-[α-L-ramnopiranosilo-(1´´´´ → 6´´)]-β-D-galactopiranosilo	741
H	H	kaempferol-3-O-β-D-glucuronopiranosido	461

Figura 3. Estructura de flavonoides aislados en quinoa (Dini et al., 2004; Gómez-Caravaca et al., 2011; Hirose et al., 2010).

2.6. Betalaínas

Estas moléculas son pigmentos naturales producidos por algunas familias de plantas, incluyen a los grupos betacianinas (coloración rojo-violeta) y bataxantinas (coloración amarillo-naranja). Algunos de los pigmentos nitrogenados determinados en quinoa son amarantina, betanina, isobetanina, dopaxantina, indicaxantina, y miraxantina; los tres primeros conforman el grupo de betacianias y los tres últimos incluyen el grupo de betaxantina (Lin et al., 2019). Las betalaínas son derivados del aminoácido tirosina y se ha confirmado la presencia de este pigmento en las semillas de quinoa de color (Graf et al., 2015). Estructuralmente son distintas a los compuestos fenólicos, pero comparten interés agroalimentario debido a su potencial bioactivo, el cual está relacionado principalmente con las propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antibacterianas. En las variedades de quinoa de color rojo y negro, el contenido de betalaínas totales varía entre 0.18 y 6.10 mg 100 g^{-1} de harina de quinoa. Se ha demostrado una correlación positiva entre la capacidad antioxidante y las betalaínas, por lo tanto, estos pigmentos aportan como fuente natural de antioxidantes en las semillas (Abderrahim et al., 2015).

2.7. Actividades biológicas de los compuestos fenólicos

El interés en los compuestos fenólicos ha sido relevante por su implicación en la salud humana, debido a sus características terapéuticas, las cuales están asociadas con sus propiedades antioxidantes. Los compuestos fenólicos se caracterizan por la capacidad de capturar radicales libres que provocan reacciones de oxidación en cadena, las cuales inducen daños a moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Soobrattee et al., 2005). El estrés oxidativo causado por el exceso de nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) contribuyen al desarrollo de enfermedades en el cuerpo humano de tipo cardiovascular, cáncer, diabetes, neurodegenerativas e inflamación (Wu & Cederbaum, 2003). Varios estudios han reportado que

extractos fenólicos de quinoa ayudan a combatir las ROS; esto se debe a que los fenólicos tienen la capacidad de donar electrones debido a su estructura química. Liu et al. (2020) reportaron que los extractos fenólicos de quinoa blanca tienen la capacidad de eliminar radicales ABTS y DPPH hasta un 60% y 65% respectivamente. En variedades de quinoa de color (rojo y negro), los extractos fenólicos exhiben mayor capacidad para atrapar radicales libres (hasta un 74%). También se ha demostrado que el contenido de flavonoides totales y la capacidad antioxidante por los ensayos DPPH y ABTS tienen una correlación positiva (> 0.7), por lo tanto, los flavonoides pueden capturar eficazmente los radicales libres y contribuir con funciones antioxidantes (Pellegrini et al., 2018). Además, estos compuestos son capaces de intervenir en procesos celulares de expresión genética, señalización intercelular, y agregación plaquetaria (Das et al., 2012). El contenido total de fenoles y flavonoides han sido analizados por métodos espectrofotométricos en distintas variedades de quinoa, evidenciando que las diferencias del contenido fitoquímico entre variedades podrían atribuirse a factores genotípicas, ambientales y procesamiento de la semilla (Melini & Melini, 2021). Las propiedades biológicas mencionadas anteriormente señalan a los compuestos fenólicos como agentes nutracéuticos de interés científico agroalimentario.

2.8. Métodos de capacidad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos químicos que contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares (Shahidi & Zhong, 2015). Los compuestos antioxidantes actúan mediante algunos mecanismos químicos como: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, siglas en inglés), transferencia de un electrón (SET, siglas en inglés) y la habilidad para atrapar iones de metales. Estos mecanismos permiten comprender la diversidad química de los antioxidantes. En general, los compuestos antioxidantes pueden

reaccionar por varios mecanismos de reacción o por un mecanismo predominante (Apak et al., 2013). La estructura química de un compuesto antioxidante tiene la capacidad de donar electrones al chocar con un radical libre para convertirlo en una especie estable. Los radicales libres son especies reactivas capaces de producir reacciones en cadena que dañan las células (Shahidi & Zhong, 2015). Algunos de los métodos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante se describen a continuación:

- **Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulffónico) (ABTS)**

Se basa en la capacidad de los antioxidantes para disminuir el color intenso del radical catión estable ABTS. En este método, la producción del radica catión es interceptado mediante la reacción previa con un oxidante fuerte como el persulfato de potasio generado en el laboratorio con 16 horas de anticipación. La reacción del antioxidante de prueba y el radical ABTS puede ser por mecanismos múltiples (HAT o SET). Una de las ventajas de este radical catión es que puede solubilizarse en medios hidrofílicos y lipofílicos, además no es afectado por la fuerza iónica del medio.

- **2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

El DPPH es un radical estable con un color morado oscuro. El método se basa en medir la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical DPPH, que al reaccionar el radical pierde su color. El mecanismo de reacción predominante es por ET, aunque puede ocurrir también el mecanismo HAT. Este método es usado muy frecuente, ya que no se tiene que generar el radical en el laboratorio y el tiempo de reacción es corto (15 min).

- **Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)**

El método FRAP se basa en la capacidad reductora de los antioxidantes frente al complejo ion férrico TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina). Esta reacción

produce un color azul intenso que es medido a 595 nm. Es un método rápido, sencillo, y su mecanismo de reacción predominante es por ET.

Además de estos métodos, existen otros que miden antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Algunos de estos son ORAC, TEAC, y CUPRAC entre otros (Schaich, Tian, & Xie, 2015).

2.9. Técnicas de separación y purificación de compuestos flavonoides

2.9.1. Técnicas cromatográficas

La cromatografía se basa en la aplicación de una muestra compleja sobre una superficie o un sólido (fase estacionaria), misma que entra en contacto con la fase móvil y migra a través de ella en una sola dirección, provocando una separación entre sí. En el proceso de separación influyen características moleculares asociadas con la adsorción, la partición, y la afinidad o diferencias entre sus pesos moleculares (Martínez M., 2020). Existen diferentes métodos cromatográficos para la separación de compuestos, los cuales han sido clasificados según el mecanismo de separación: adsorción, partición y afinidad. estado físico de las fases (Líquido o gas), o disposición de la fase estacionaria (columna o papel) (Coskun, 2016).

Por otro lado, los métodos de separación para compuestos flavonoides son basados principalmente en cromatografía líquida y con menos frecuencia se han utilizado los métodos por cromatografía en capa delgada y electroforesis capilar (de Rijke et al., 2006). Para la separación de flavonoides glicosilados, en este trabajo se utilizó tres tipos de métodos que son: cromatografía en columna abierta (1), separación en fase sólida (2), y cromatografía líquida de alta eficiencia (3). Los fundamentos de estos métodos se detallan a continuación.

- **Cromatografía en columna abierta**

En esta técnica, la fase estacionaria (sílica gel) es previamente acondicionada con un disolvente orgánico y empacada dentro de una columna de vidrio, sobre esta fase se coloca la muestra preadsorbida en sílica gel. La fase móvil constituida por una mezcla de disolventes de distinta polaridad es circulada por la columna empacada. Finalmente, los compuestos migran a través de la fase estacionaria y son separados dependiendo de la adsorción selectiva de cada uno de los compuestos. Esta técnica permite reducir la complejidad de una muestra y es un método muy útil para separación de metabolitos secundarios.

- **Separación en fase sólida**

En este caso, la fase estacionaria no polar está empacada en una pequeña columna de plástico, en la cual se aplica la muestra diluida y luego se deja recircular la fase móvil que está constituida por la mezcla de disolventes de distinta polaridad. Los compuestos migran a través de la fase estacionaria provocando una separación entre sí. Este sistema de separación utiliza presión de vacío y volúmenes pequeños de muestra y de fases.

- **Cromatografía líquida de alta resolución**

Es una técnica instrumental de alta capacidad de separación de compuestos de una mezcla. Se basa en la aplicación de una cantidad de muestra sobre una fase móvil que fluye a una presión atmosférica entre 10 y 400 psi con un caudal establecido. Para la separación de flavonoides, comúnmente esta técnica utiliza columnas de sílice con enlaces C8 o C18 (fase reversa) y mezcla de disolventes de agua que contenga acetato, metanol o acetonitrilo. El tamaño de partícula de la fase estacionaria (entre 2 a 5 µm) y la alta presión sobre la tasa de flujo son factores que permiten aumentar la eficiencia de separación de compuestos.

2.9.2. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica instrumental que permite determinar la estructura molecular de un compuesto orgánico. Se basa en la observación del espín de los núcleos atómicos, mismos que son manipulados con radiofrecuencia para obtener información sobre su ambiente químico. Si estos núcleos atómicos tienen distintas densidades electrónicas provocados por átomos vecinos o por su posición en la molécula, darán lugar a diferencias en frecuencias de resonancia y se podrán diferenciar entre ellos. Por consiguiente, cada núcleo presentará una frecuencia de resonancia específica, la cual se denomina desplazamiento químico (δ) (Silverstein et al., 2007). Las resonancias (señales) observadas en los espectros de RMN están en función de la complejidad de una molécula, mientras más grande sea, más difícil será la asignación e interpretación de los espectros. Para la obtención de los espectros, los disolventes orgánicos utilizados con frecuencia son dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d*6*), metanol deuterado (CD_3OD), acetona deuterada ($(CD_3)_2CO$), y como disolvente de referencia tetrametilsilano (TMS) (Dini et al., 2004; Wawer & Zielinska, 2001). El uso de disolventes deuterados generan una señal para la estabilización del campo magnético y permite optimizar la resolución de las señales de RMN (Ignat et ., 2011).

Se han empleado distintas técnicas de RMN para la identificación estructural de compuestos flavonoides como flavonas, flavonoles, y flavanonas, que son abundantes en especies vegetales. Estas técnicas incluyen a RMN de ^{1}H y de ^{13}C, los experimentos bidimensionales (^{1}H-^{1}H) COSY, de correlación heteronuclear (^{1}H-^{13}C) a un enlace de distancia HSQC y a dos o tres enlaces de distancia HMBC. Con estos experimentos se podrá encontrar la secuencia entre átomos y las interacciones entre estos para generar la conformación molecular de un compuesto de interés (Ignat et al., 2011).

2.9.3. Espectrometría de masas

Es una técnica analítica importante en la identificación y caracterización química de los metabolitos secundarios (Martínez, 2020). Se basa en ionizar una muestra de interés para generar fragmentos de moléculas cargadas y medir su masa con relación a su carga. Los componentes principales de un espectrómetro de masas incluyen a una fuente de ionización, un analizador de masas, y un detector. Cada pico en el espectro cromatográfico corresponde a una masa específica de cada molécula (Glish & Vachet, 2003).

En compuestos fenólicos, las principales fuentes de ionización utilizadas son: ionización por electropulverización (ESI), ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), ionización a presión atmosférica (API), entre otras más (Ignat et al., 2011). Para este trabajo de tesis se utilizó la técnica MALDI-TOF, la cual es adecuada para analizar moléculas de mayor peso molecular con alta precisión. Esta técnica requiere de un analizador TOF y de la asistencia de una matriz, misma que puede estar conformada por dos materiales: ácido 2.5.-dihidroxibenzoico y ácido sinapínico. Se mezclan una cantidad de muestra de interés con el compuesto de la matriz para luego ser sometido a una irradiación pulsada. Finalmente, las moléculas ionizadas de la muestra son expulsadas de la matriz hacia el espectrométro de masas (Silverstein et al., 2007). En los últimos años, la combinación de técnicas de HPLC y espectrometría de masas son el mejor enfoque para analizar compuestos fenólicos en muestras vegetales.

2.10. Literatura citada

Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M. C., & Condezo-hoyos, L. (2015). Physical features , phenolic compounds , betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (Chenopodium quinoa Willd .) from Peruvian Altiplano. *Food Chemistry*, *183*, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.029

Abugoch-James, L. E. (2009). Chapter 1 Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 58, pp. 1–31).

https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *85*(5), 957–998. https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042

Bhargava, A., & Ohri, D. (2016). Origin of Genetic Variability and Improvement of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). In *Gene Pool Diversity and Crop Improvement, Sustainable Development and Biodiversity* (Springer I, pp. 241–270). https://doi.org/10.1007/978-3-319-27096-8_8

Ceyhun, A., & Sanlier, N. (2019). A new generation plant for the conventional cuisine : Quinoa (Chenopodium quinoa Willd .). *Trends in Food Science & Technology*, *86*(November 2018), 51–58. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039

Coskun, O. (2016). Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*, *3*(2), 156–160. https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757

Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, *299*(July), 125161. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161

Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(2), 173–183. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4

de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, *1112*(1–2), 31–63. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019

Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2004). Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chemistry*, *84*(2), 163–168. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00185-7

Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., & Coimbra, J. S. D. R. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(8), 1618–1630. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811

Glish, G. L., & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, *2*(2), 140–150. https://doi.org/10.1038/nrd1011

Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Caboni, M. F. (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (Chenopodium quinoa Willd) by a liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(20), 10815–10825. https://doi.org/10.1021/jf202224j

Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(4), 431–445. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12135

Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Dong, L., … Liu, L. (2019). Changes in saponins, phenolics and antioxidant activity of quinoa (Chenopodium quinoa willd) during milling process. *Lwt*, *114*(December 2018), 108381. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108381

Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, *2*(3), 27. https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556

Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T., & Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of Chenopodium quinoa seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*, *119*(4), 1300–1306. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.008

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *126*(4), 1821–1835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026

Lee, M., & Sim, K. H. (2018). Nutritional value and the kaempferol and quercetin contents of quinoa (Chenopodium quinoa Willd .) from different regions. *Foos Science and Technology*, *50*(6), 680–687.

Lee, S., Lee, J., Lee, H., & Sung, J. (2019). Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(11), 1–9. https://doi.org/10.1111/jfbc.13002

Li, S., Chen, C., Ji, Y., Lin, J., Chen, X., & Qi, B. (2018). Improvement of nutritional value, bioactivity and volatile constituents of quinoa seeds by fermentation with Lactobacillus casei. *Journal of Cereal Science*, *84*(June), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.008

Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019). Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. *Molecules*, *24*(13). https://doi.org/10.3390/molecules24132512

Liu, M., Zhu, K., Yao, Y., Chen, Y., Guo, H., Ren, G., … Li, J. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of phenolic compounds from white, red, and black Chenopodium quinoa seed. *Cereal Chemistry*, *97*(3), 703–713. https://doi.org/10.1002/cche.10286

Martínez, A. (2020). *Química de Productos Naturales*. Medellín, Colombia: Universidad de Antoquia.

Melini, V., & Melini, F. (2021). Functional components and anti-nutritional factors in gluten-free grains: A focus on quinoa seeds. *Foods*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/foods10020351

Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2018). Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *75*(September 2016), 170–180. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.016

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Uribe, E., López, J., Martínez, E., Rodríguez, M. J., … Di Scala, K. (2011). Physico-chemical analysis, antioxidant capacity and vitamins of six ecotypes of chilean quinoa (Chenopodium quinoa Willd). *Procedia Food Science*, *1*, 1439–1446. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.213

Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., & Vicha, R. (2015). Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Molecular Science*, *16*(Cvd), 12871–12890. https://doi.org/10.3390/ijms160612871

Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (Chenopodium quinoa Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, *111*(July 2017), 38–46. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006

Pereira, E., Cadavez, V., Barros, L., Encina-Zelada, C., Stojković, D., Sokovic, M., … Ferreira, I. C. F. R. (2020). Chenopodium quinoa Willd. (quinoa) grains: A good source of phenolic compounds. *Food Research International*, *137*(May), 109574. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109574

Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., & C.F.R. Ferreira, I. (2019). Chemical and nutritional characterization of Chenopodium quinoa Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious

food. *Food Chemistry*, *280*(December 2018), 110–114. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.068

Präger, A., Munz, S., Nkebiwe, P. M., Mast, B., & Graeff-Hönninger, S. (2018). Yield and quality characteristics of different quinoa (Chenopodium quinoa willd.) cultivars grown under field conditions in southwestern Germany. *Agronomy*, *8*(10). https://doi.org/10.3390/agronomy8100197

Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., Blajos, J., & Santivañez, T. (2011). La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO*, *37*, 66. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010

Romano, A., Masi, P., Nicolai, M. A., Falciano, A., & Ferranti, P. (2019). QUINOA (chenopodium quinoa willd.) flour as novel and safe ingredient in bread formulation. *Chemical Engineering Transactions*, *75*(May 2018), 301–306. https://doi.org/10.3303/CET1975051

Ruiz, K. B., Biondi, S., Oses, R., Acuña-Rodríguez, I. S., Antognoni, F., Martinez-Mosqueira, E. A., … Molina-Montenegro, M. A. (2014). Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *34*(2), 349–359. https://doi.org/10.1007/s13593-013-0195-0

Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays.” *Journal of Functional Foods*, *18*, 782–796. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024

Semra Navruz-Varli y Nevin Sanlier. (2016). Nutritional and health benefits of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Journal of Cereal Science*, *69*, 371–376.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757–781. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047

Silva, P. M., Massuela, D. C., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Grae, S., & Piatti, C. (2020). *of the Potentials of the “ Golden Grain ” and Cultivation and Marketization*.

Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D., & Bryce, D. (2007). *Spectrometric Identification of Organic Compounds,* New York, USA. (Vol. 8). https://doi.org/10.1021/jm00342a059

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *579*(1–2), 200–213. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023

Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P. X., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterisation of phenolics , betanins and antioxidant activities in seeds of three Chenopodium quinoa Willd . genotypes. *Food Chemistry*, *166*, 380–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018

Tang, Y., & Tsao, R. (2017). Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(7), 1–16. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600767

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(15), 2541–2547. https://doi.org/10.1002/jsfa.4158

Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Current Opinion in Food Science*, *14*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.007

Wang, J., & Sun, B. (2019). Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods. In *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6167-8

Wawer, I., & Zielinska, A. (2001). 13C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *39*(7), 374–380. https://doi.org/10.1002/mrc.871

Wu, D., & Cederbaum, A. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*, 277–284. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7630-6_8

Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(9), 1874–1905. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400

3. COMPARISON OF NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL PROPERTIES OF *Chenopodium quinoa* CULTIVATED IN MEXICO AND ECUADOR

3.1. Abstract

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is considered a superfood due to its nutritional qualities and potential health benefits. In this work, the nutritional and nutraceutical properties were compared for white Ecuador quinoa seeds (WEQ) and red Ecuador quinoa seeds (REQ) with respect to the white Mexican quinoa seeds (WMxQ). Quinoa seeds from Peru have been introduced and adapted to the geographic and climatic conditions by the State of Morelos, Mexico, improved by mass selection in field to obtain plants with desirable phenotypic characteristics. The nutritional properties of seeds were evaluated through a proximate analysis, mineral content, amino acids profile, and fatty acid profile of quinoa oil. The nutraceutical properties were determined quantifying total phenols, total betalains and antioxidant capacity. The results evidenced that WEQ seeds had the highest protein content (16.59 g 100 g^{-1} dw). The P, Ca, and Mg contents were high in WMxQ (424.6, 60.3, and 152.3 mg 100 g^{-1} in dw respectively). Arginine, glutamic acid, and alanine were the most abundant amino acids in the three cultivars. In all quinoas, unsaturated fatty acids were most predominant (73.6% to 78.0%). The Mexican quinoa seeds showed the highest total phenolic content (2.9 mg gallic acid equivalent g^{-1} in fw). The concentration of betalains in the REQ was 83.3 mg 100 g^{-1} fw. The results demonstrate that nutritional and phenolic contents varies according to the color seeds and region. Quinoa of Mexico is high in phenolic compounds and may be used as a source of natural antioxidants.

Key words: Antioxidant capacity, betalains, free amino acids, nutraceutical potential, quinoa.

3.2. Introduction

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) member of the Amaranthaceae family, is a native species of the Andean region in South America and routinely used in the preparation of soups, salads, desserts, and sweet drinks, among others (Ceyhun and Sanlier, 2019). Quinoa is mainly produced in Bolivia, Ecuador and Peru, but its cultivation has spread to others regions from Europe, Asia, and North America (Rojas et al., 2011). This species due to its wide genetic variability and broader adaptability grows from sea level until to an altitude of 4000 m and can tolerate adverse agro-ecological and edaphic conditions (Vega-Gálvez et al., 2010). In 1990, Peruvian quinoa was introduced in Mexico and has adapted to dry climate (Coahuila, 1300 m a.s.l.), sub-humid climate (State of Mexico, from 2300 to 2600 m a.s.l.), and humid subtropical climate (Morelos, 940 m a.s.l.). Quinoa that was adapted and produced in the State of Morelos shown higher yield of seeds (2 t ha^{-1}) and higher forage production.

Quinoa is considered a superfood due to its nutritional qualities (Filho et al., 2017), thus it is becoming increasingly popular choice of food among the health-conscious populations and millennials. Quinoa seeds are a rich source of protein (Lee and Sim, 2018), free sugars (Pereira et al., 2019), organic acids (Pellegrini et al., 2018), vitamins, minerals, and essential amino acids (Vilcacundo and Hernández-Ledesma, 2017). In addition to macronutrients, quinoa also contains bioactive compounds such as phenols and betalains responsible for the various seed colors and are related to the antioxidant capacity (Tang and Tsao, 2017). The nutritional composition and phenolic contents of quinoa seeds vary considerably according to the geographic location, environmental factors, soil type, fertilization, and genetic background (Miranda et al., 2011). A detailed landscape of the chemical composition of Morelos region adapted germplasm would better understand its nutraceutical properties, stability in response to Genotype $\times$ Environment interactions, and allow its exploitation through genetic

improvement. Previous studies compared quinoas cultivated in Denmark, Poland, Chile, USA, Argentina, and Korea and reported high contents of proteins (from 12% to 16%), lipids (from 4.2% to 13.0%), and ash (from 2.7% to 4.0%) with respect to quinoas of Peruvian and Bolivian origin (Lee and Sim, 2018; Sobota et al., 2020). Although several studies have evaluated quinoa varieties grown in the different parts of the world, little is known about the ones adapted to the Mexican environment.

Therefore, the aim of this study was to compare the nutritional and nutraceutical properties of three quinoa cultivars; one adapted in Mexico and the other two from the Andean region of Ecuador. The outcome of this study would contribute to the knowledge of the potential benefits of quinoa seeds to the health of consumers in these two regions of the world.

3.3 Material and Methods

3.3.1. Plant materials

White Ecuador quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds (WEQ) variety INIAP-Tunkahuan released by Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP) were purchased directly from the farmers in Ibarra, Imbabura Province (0°19′12″ N, 78°12′36″ W) and red Ecuador quinoa seeds (REQ) variety red-INCA were purchased in local market of Quito, Ecuador. White Mexico quinoa seeds (WMxQ), were provided by the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Experimental Station of Tlaltizapan (18°41'19.8" N, 99°07'35.1" W) Morelos, Mexico. The different quinoa samples were acquiring in the same season year. In the case of Ecuador, the quinoa is grown in Highland soil with an annual rainfall from 200 to 500 mm and temperature from 13 to 18°C, while in Mexico, the quinoa was produced with low pluvial precipitation (< 100 mm annual) and average temperature at 22°C. Seeds were washed, dried, and ground using a blender (NB-101S, Housewares, Los Angeles, California, USA)

until obtaining a fine powder (20 mesh). Quinoa flours were stored in polyethylene bags at -20°C until use. The color was measured in the whole seeds.

3.3.2. Chemicals

Folin-Ciocalteu phenolic reagent, anhydrous sodium carbonate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), sodium acetate trihydrate, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), ferric chloride hexahydrate, quercetin, potassium persulfate, and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), gallic acid, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) were obtained from Sigma-Aldrich products (St. Louis, Missouri, USA). Aluminum chloride and potassium acetate were acquired from Fermont S.A. de C.V. and Meyer S.A. de C.V., Mexico, respectively. All reagent were analytical grade.

3.3.3. Determination of color

The color was determined with a Hunter lab colorimeter (MiniScan XE Plus 45/0-L, HunterLab, Reston, Virginia, USA) in CieLab scale (L*, a*, b*). Values of a* and b* were calculated, the tone angle (Hue; h*) parameter and color saturation (Chroma; C*) applying the Equations 1 and 2, while the L* value it was taken as lightness (McGuire, 1992).

$$h* = Tan^{-1}\frac{b*}{a*} \quad (1)$$

$$C* = \sqrt{(a*)^2 + (b*)^2} \quad (2)$$

3.3.4. Proximate and chemical analysis

The proximate composition was determined according to the methods described by AOAC (1998), moisture (934.01), protein (2001.11, using N × 6.25), fiber (962.09), ash (942.05), and fat (920.39). Mineral content was determined as described by Gavlak et al. (2013) using a microwave (Microwave Reaction

System, Anton Paar, Mexico). A quinoa flour sample (0.15 g) was placed in a microwave digestion tube and added 0.5 mL concentrated nitric acid (16.8 N) and 2.0 mL 30% hydrogen peroxide to each tube. The tubes with sample and reagents were taken to predigestion for 30 min and then placed in the microwave. An atomic absorption spectrophotometer (GBC, SavantAA, Mexico) was used to Ca, Mg, Fe and Zn, a flame photometer (Lachat Instrument, Burlington, Canada) to K, and an ultra-violet spectrophotometer (Jenway, 6715 UV/Vis, Staffordshire, UK) to P.

3.3.5. Free amino acids profile identification

Free amino acids were analyzed according to the method proposed by Joshi et al. (2006). Quinoa seeds (10 mg) were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder after mixing with 20 mM HCl (10 µL mg^{-1} sample), the mixtures were centrifuged at 14 000 × g at 4 °C for 20 min. The supernatants were derivatized using an AccQ-Fluor reagent kit (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Free amino acids were carried out using UPLC system (Acquity H-class, Waters) coupled with Xevo TQ mass spectrometer using an electrospray ionization (ESI) probe. Samples (10 µL) were injected on to column (AccQTag, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.7 particles, Waters) and the data were collected using Empower software (Waters). The mobile phase of water phase (A) (0.1% formic acid v/v) and acetonitrile (B) (0.1% formic acid v/v), with a stable flow rate at 0.5 mL min^{-1} and column temperature setting at 60 °C. L-Norleucine was used as an internal control, and the amino acids were quantified in nmol mg^{-1} quinoa seeds.

3.3.6. Fatty acid composition

Quinoa flour samples (20 g) were subjected to extraction (14 h) with *n*-hexane in Soxhlet equipment. After, hexane was removed under reduced pressure in a rotary evaporator (R-300, Büchi, Flawil, Switzerland) to obtain the oil. Fatty acid methyl esters (FAME's) were obtained by esterification and transesterification of

the oil (López-Yerena et al., 2018) with some modifications. The FAME's were analyzed in a gas chromatograph (6890, Agilent, Santa Clara, California, USA) with an ATSilar column (0.25 mm i.d × 30 m × 0.25 µm film thickness, Croydon, England), and a flame ionization detector (FID). The initial oven temperature was 170 °C with ramps of 10 °C per min at a final temperature of 240 °C. The injector and detector temperatures were set at 250 °C and hydrogen gas was used at a flow rate of 1.8 mL min^{-1}. The results were expressed as a percentage of the area (% area).

3.3.7. Extraction and fractionation of samples

A quinoa flour sample (1.0 g) was successively extracted with 25 mL methanol:water (50:50 v/v, pH 2) and acetone:water (70:30, v/v) solution. The extract was shaken at room temperature (22 °C) for 1 h and then centrifuged (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 2100 × g, at 4 °C for 10 min. The supernatants were mixed, filtered (ashless filter paper, Whatman grade 41, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), adjusted to 50 mL, and stored at -18 °C until use. From this extract, the free phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity were determined. The pellet obtained from the previous extractions was re-extracted with 10 mL methanol:concentrated sulfuric acid (90:10, v/v) and refluxed for 10 h, then centrifuged (2100 ×g, 4 °C, 10 min). The supernatant was recovered and adjusted to 10 mL with the extraction solvent, filtered, and stored at -18 °C until use. From this extract, the phenolics, flavonoids, betalains, and antioxidant capacity were determined (Abderrahim et al., 2015).

3.3.8. Total phenolics, flavonoids, and betalains content

The total phenolic content (TPC) quantification was carried out according to Hernández-Rodríguez et al. (2016) using Folin-Ciocalteu reagent. A gallic acid standard curve with a linear range (concentration 0.00 to 0.01 mg gallic acid mL^{-}

^{1}) was prepared. Results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} quinoa flour.

The total flavonoids content (TFC) was determined according to the method described by Chang et al. (2002). A quercetin standard curve with a linear range (concentration 0 to 0.01 mg quercetin mL^{-1}) was prepared. The results were expressed as mg quercetin equivalent (QE) g^{-1} quinoa flour.

Total betalains were quantified by the method of Castellanos-Santiago and Yahia (2008) adapted to the microplates. Total betalains content (BC) was calculated from the equation:

$$BC\ (mg\ g^{-1}) = [(A \times DF \times MW \times Vd)/\varepsilon \times L \times Wd]$$

where A is the maximum absorbance at 535 and 435 nm for betacyanins and betaxanthin respectively, DF is the dilution factor, MW (g mol^{-1}) is molecular weight of betaxanthin (308 g mol^{-1}) and betacyanin (550 g mol^{-1}), Vd (mL) is volume of sample capacity, ε is molar extinction coefficient of betacyanins (ε = 60000 L mol^{-1} cm^{-1}) and betaxanthin (ε = 48000 L mol^{-1} cm^{-1}), L (cm) is length of the path-light in the well (0.50 cm) and Wd (g) is sample weight. The absorbances were measured in a Microplate reader (software Gen5, Biotek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA). The results were expressed as mg betalain 100 g^{-1} quinoa flour.

3.3.9. Antioxidant capacity

The antioxidant capacity (AC) of the extract was determined by 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Re et al., 1999), ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain, 1996) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Cheng et al., 2006) assays, adapted to the microplates. The results were expressed as mg trolox equivalent (TE) g^{-1} quinoa flour. The inhibitory concentration 50% (CI_{50}) was calculated by plotting the percentages of degraded DPPH against the sample concentration.

3.3.10. Statistical analysis

Results are presented as mean value ± standard deviation of three replicates per sample and analyzed by one-way ANOVA. To compare the means Tukey's test was used and was considered differences significant at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SAS program 2005 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

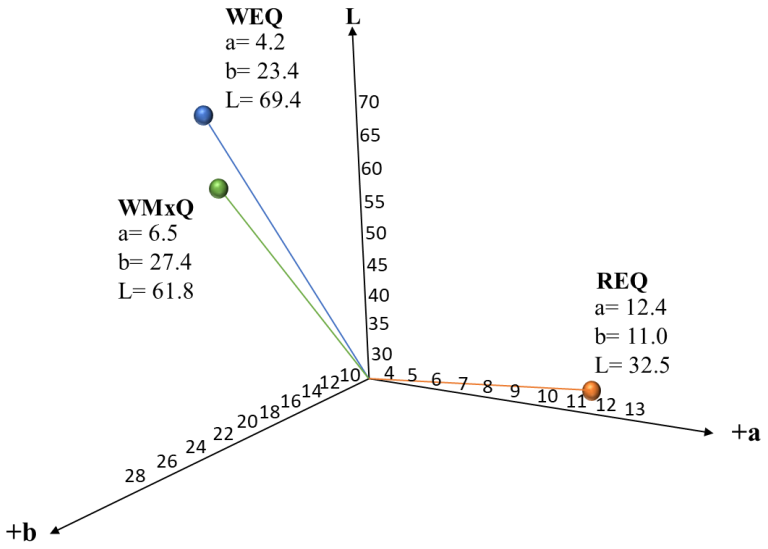
3.4. Results and Discussion

3.4.1. Color study

Figure 4 shows the color parameters L*, a* and b * of three quinoa cultivars. The results evidenced positive values for a* and b* coordinates. The lightness value (L*) that indicates color brilliance revealed a significant difference ($P \leq 0.05$) between quinoa cultivars. The positive a* coordinate was higher in the red seeds based on the value of hue (40.81°) and chroma (16.22), also showed a significant difference ($P \leq 0.05$), the tone of this seeds was purple-red, less pure, and less bright. The b* positive coordinate was high in the WMxQ cultivar, according to the hue (76.26°) and chroma (27.33) values which were significantly different ($P \leq 0.05$) between the studied cultivars. The combination of these coordinates with the L value revealed the yellow-cream shade slightly lighter but with less lightness than the WEQ. (Pellegrini et al., 2018) reported a hue of 89.71° and chroma of 16.69 in white quinoas, in this study, the hue value was low while the chroma value was higher than found by these authors.

The L value* in red quinoa was lower than values reported by Laqui-Vilca et al. (2018), who obtained values for lightness between 48.1% and 53.5% in red quinoa seeds pericarp. The food color is an indicator of natural pigments, these pigments can be used as food coloring and be considered as functional ingredients due to their implication in human health (Shetty and Geethalekshmi, 2017).

Figure 4.Graphical representation of color parameters L*, a*, and b* of three quinoa cultivars (n=3)



WMxQ: White Mexico quinoa. WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa; L*: lightness (%); +a: x, red-purple tone component; +b: y, yellow tone component.

The color of quinoa seeds varies from white to black with yellow, red, pink, and violet hues. Red quinoa have significant betalains content; in particular of betanins and isobetanins that are pigments with biological activities for the benefit of health (Tang et al., 2015).

3.4.2. Proximate and chemical analysis

Quinoa, with high nutritional potential, is a species of C3 photosynthetic pathway, unlike other cereals, it adapts and tolerates agroclimatic changes (García-Parra et al., 2020). The content of protein, essential amino acids, fiber, carbohydrates, and unsaturated fatty acids determines the nutritional quality of quinoa seeds. The chemical and proximate composition of quinoa seeds is shown in Table 3. The protein (16.5 g 100 g^{-1}) content in WEQ seeds was significantly ($P \leq 0.05$) higher than WMxQ. Fat content in WEQ and REQ (7.2 and 7.5 g 100 g^{-1}, respectively) were higher than for WMxQ. In contrast, ash and crude fiber levels were high in

WMxQ (2.75 and 2.73 g 100 g^{-1} respectively) and REQ (2.53 and 2.80 g 100 g^{-1} respectively). The REQ had the highest content of carbohydrate (73.4 g 100 g^{-1}). Unlike our results, much lower protein (11.2 to 13.0 g 100 g^{-1}) and fat (4.8 to 5.4 g 100 g^{-1}) contents have been reported in the quinoa seeds grown in Peru, Bolivia, and Spain (Nowak et al., 2016; Pellegrini et al., 2018; Pereira et al., 2019). Protein content in the range of 13% to 17% has been reported by most studies (Maradini Filho et al., 2017). This content in quinoa seeds is higher than in traditional cereals such as wheat (7.4%), barley (10.5%), and rice (13.3%) (Tang and Tsao, 2017) and is considered a high-quality protein because provide all essential amino acids, particularly by the presence of lysine, methionine, and threonine, which are lacking in other cereals such as wheat and corn (Hernández-Ledesma, 2019).

Table 3. Proximate analysis and mineral content of three quinoa cultivars.

	WMxQ	WEQ	REQ
Moisture	7.39 ± 0.18a	6.99 ± 0.02b	7.10 ± 0.02ab
Protein	15.74 ± 0.03b	16.59 ± 0.12a	13.70 ± 0.04c
Fat	6.53 ± 0.10b	7.26 ± 0.12a	7.52 ± 0.18a
Ash	2.75 ± 0.04a	2.25 ± 0.22b	2.53 ± 0.03ab
Crude fiber	2.73 ± 0.05a	1.64 ± 0.24b	2.80 ± 0.08a
Carbohydrate	72.23 ± 0.13b	72.25 ± 0.08b	73.43 ± 0.07a
P	424.66 ± 18.90a	296.33 ± 9.29b	235.66 ± 5.13c
K	254.66 ± 2.52b	241.66 ± 4.72c	334.66 ± 6.81a
Ca	60.33 ± 3.21a	21.00 ± 1.00b	14.66 ± 1.52c
Mg	152.33 ± 4.04a	124.33 ± 3.05b	97.66 ± 2.52c
Fe	3.97 ± 0.11b	4.78 ± 0.11a	3.85 ± 0.05b
Zn	2.08 ± 0.06b	2.52 ± 0.19a	2.07 ± 0.00b

Moisture content is expressed as g 100 g^{-1} fresh weight; protein, fat, ash, crude fiber, and carbohydrate contents are expressed as g 100 g^{-1} dry weight; minerals content is expressed as mg 100 g^{-1} dry weight. For each row, means ± standard deviation followed by different letters are significantly different (n = 3, $P \leq 0.05$).WMxQ: white Mexico quinoa; WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa.

The consumption of 100 g quinoa seeds accounts for 46.5% of daily protein requirement according to Food and Agriculture Organization of the United Nations

(FAO) guidelines. Furthermore, the quinoa contains important bioactive compounds as peptides and phenolic compounds that are related to the prevention of cardiovascular and immunological diseases, cancer, diabetes, among many others (Tang and Tsao, 2017). The Highland Northern of Ecuador soils are of volcanic origin and contain significant amounts of organic matter, a source of available nitrogen for the plants (Huygens et al., 2008) by this reason the Ecuadorian seeds contain the highest concentration of protein. Additionally, oil and crude protein contents is affected by Genotype × Environment interaction (Arslanoglu et al., 2011).

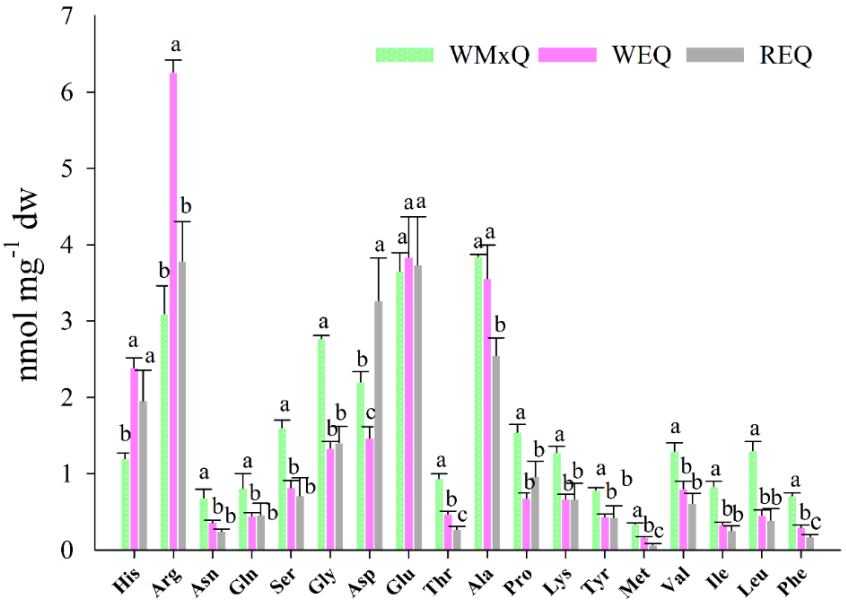
According to our results, P was the main micronutrient in all the samples analyzed (235.6-424.6 mg 100 g^{-1}), followed by K (241.6-334.6 mg 100 g^{-1}), Mg (97.6-152.3 mg 100 g^{-1}), and Ca (21.0-60.3 mg 100 g^{-1}). WMxQ had the highest contents of P, Ca, and Mg. WEQ had the highest contents of Fe (4.7 mg 100 g^{-1}) and Zn (2.4 mg 100 g^{-1}), showing significant differences ($P \leq 0.05$) among studied cultivars. REQ showed the highest K content (334.6 mg 100 g^{-1}). Although Fe and Zn contents in the three cultivars were lower than other published studies (Lee and Sim, 2018), they were much higher than the regionally popular cereals such as wheat, corn and rice (Nowak et al., 2016). It is known that the chemical and mineral composition of quinoa seeds is significantly affected by geographical areas, N bioavailability, and genetic background (Miranda et al., 2011).

3.4.3. Analysis of free amino acids

According to some studies, the content of amino acids in quinoa depends on the region of cultivation and genetic variability of seeds (Lee and Sim, 2018; Miranda et al., 2012). This variation can be explained by the genetic characteristics of the Ecuatorian seeds, that are cultivated in Highland volcanic soils (2500 m a.s.l.). While that the Mexican quinoa grow a low altitude (950 m a.s.l.). In the studied samples, 18 amino acids were detected, including eight essential (Figure 5). WMxQ accumulated the highest concentration of almost all free amino acids. The

most abundant free amino acids in the three quinoa cultivars were arginine, glutamic acid, and alanine. The arginine content in WEQ (6.25 nmol mg^{-1}) was significantly higher than WMxQ (3.09 nmol mg^{-1}); glutamic acid content showed nonsignificant differences ($P > 0.05$) among WMxQ, WEQ, and REQ cultivars. Alanine content was similar between WMxQ (3.84 nmol mg^{-1}) and WEQ (3.55 nmol mg^{-1}), while red seeds were low in arginine and alanine contents.

Figure 5. Free amino acids profile of three quinoa cultivars.



Means ± standard deviation followed by different letters are significantly different for each amino acid ($n = 3$, $P \leq 0.05$). Dw: Dry weight; WMxQ: white Mexico quinoa; WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa.

Arginine is a critical amino acid for children and adolescents due to its role in stimulating the production and release of growth hormones (Abugoch-James, 2009) and also in production of creatine, a compound involved in the muscle regeneration process (Kreider et al., 2017). The essential amino acids (histidine, lysine, methionine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, and threonine) represented about 27% of the total amino acids analyzed. Consistent with other studies (Lee and Sim, 2018), our results confirmed the abundant accumulation of

arginine, glutamic acid, alanine, histidine, aspartic acid, glycine, and lysine in all three cultivars. Food consumption with a balanced composition of amino acids may replace amino acids lost in natural biochemical processes, contributing to the prevention of age-related diseases and improving health (Rose, 2019).

3.4.4. Fatty acid composition

The fatty acids profile in the studied quinoa cultivars is displayed in Table 4. In all three cultivars, unsaturated fatty acids were most predominant (73.6% to 78.0%). Linoleic acid was the primary fatty acid ranging from 45.4% to 53.9%, followed by oleic acid (23.8% to 28.0%). The results evidenced that WMxQ and WEQ contained higher linoleic acid concentration than Peruvian quinoa seeds (30%) (Pereira et al., 2019). In addition, the content of linoleic acid in quinoas cultivated in WMxQ and WEQ was higher than the reported in peanut, almond, olive, coconut, wheat germ and rice germ oil (Orsavova et al., 2015).

Table 4. Fatty acids profile by gas chromatography on quinoa seeds cultivated in different regions.

	Saturated				Unsaturated				
Cultivars	Palmitic (C16:0)	Estearic (C18:0)	Araquidic (C20:0)	Total	Pamitoleic (C16:1)	Oleic (C18:1)	Linoleic (C18:2)	Total	NI
	% Area				% Area				% Area
WMxQ	10.02	0.56	0.40	10.99	0.22	23.81	53.99	78.02	10.99
WEQ	9.65	0.62	0.43	10.70	0.19	25.76	52.13	78.08	11.22
REQ	10.32	0.72	0.53	11.57	0.20	28.04	45.42	73.66	14.77

NI: Not identified; WMQ: white Mexico quinoa; WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa.

Linoleic acid is important in the human diet because it reduces the risk of cardiovascular diseases and the incidence of diabetes type II (Abugoch-James, 2009). The fatty acids composition of seeds in the present study was comparable to those reported for different quinoa varieties cultivated in USA (Wood et al., 1993).

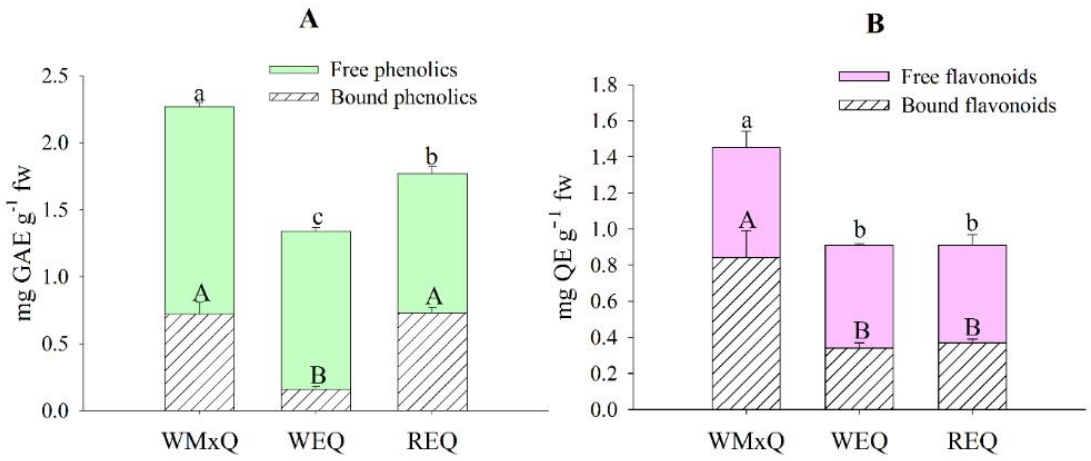
3.4.5. Free and bound phenols and flavonoids content

The results of TPC in free and bound forms are shown in Figure 6A. The TPC is the sum of the free and bound fractions; the free phenolic content in WMxQ was 40.9% higher than WEQ and showed significant differences ($P \leq 0.05$) between cultivars. While, in the bound fraction, WMxQ showed 77.7% more TPC than WEQ. The highest TPC in WMxQ (2.9 mg GAE g^{-1} fw), with respect to Ecuadorian seeds, can be explained given their genotypic difference in addition to limited irrigation conditions and high temperature exposure, factors that could increase the production of free phenolic compounds (Piovesana et al., 2018). According to Fischer et al. (2013), water restriction during the vegetative cycle and genetic variability of the genotype have a significant effect on the increase of TPC and antioxidant capacity. The free fraction of WMxQ was slightly higher than those reported by Tang et al. (2015) for white seeds (2.2 mg GAE g^{-1}). Abderrahim et al. (2015) reported TPC values from 2.5 to 2.7 mg GAE g^{-1} for red quinoa seeds, these results were higher than our results. The TPC in WMxQ and WEQ was also slightly lower than obtained from quinoa seeds cultivated in Peru, USA, and Korea (3.4, 4.3 and 4.5 mg GAE g^{-1}, respectively) (Lee and Sim, 2018).

The most abundant flavonoids in quinoa seeds are flavonols like quercetin, myricetin, and kaempferol derivatives. Quercetin has the highest antioxidant capacity, therefore provides multiple benefits to human health (Tang et al., 2015). Free flavonoids content in WMxQ (1.45 mg QE g^{-1} fw) was significantly higher ($P \leq 0.05$) than WEQ (0.91 mg QE g^{-1} fw), which is equivalent to 37.2% more flavonoids regarding the cultivars from Ecuador (Figure 6B). Regarding bound flavonoids, WMxQ exceeded by 59.5% and 55.9% to WEQ and REQ, respectively. The TFC was the highest in the soluble phenolic fraction that in the extract by acid-hydrolysis. The free flavonoid values in WMxQ and WEQ were slightly lower than those reported by Lee and Sim (2018) for white quinoa seeds (between 1.4 and 1.9 mg EQ g^{-1}). The free flavonoid content in REQ was comparable with the values from 0.81 to 1.34 mg EQ g^{-1} presented by Abderrahim

et al. (2015). It is important to consider that the variation of polyphenols in quinoa seeds could be related to crop conditions, varieties, and environmental factors (Miranda et al., 2011).

Figure 6. Free and bound phenols (A) and flavonoids (B) content of three quinoa cultivars.



Means ± standard deviation followed by different letters are significantly different in free or bound compounds (n = 3, P ≤ 0.05). GAE: Gallic acid equivalent; fw: fresh weight; QE: quercetin equivalent; WMxQ: white Mexico quinoa; WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa.

3.4.6. Content of free and bound betalains in red quinoa

Betalains are the pigments involved in the different colors of quinoa seeds, these pigments are divided into two groups, betacyanins (Bc) and betaxanthins (Bx). Total betalain content is the sum of Bc and Bx present in the sample and was determined in free and bound fraction of red seeds extract. Betalains were not detected in the free fraction extract; however, in the bound extract betalains, betaxanthins (44.9 mg 100 g^{-1} fw) and betacyanins (38.4 mg 100 g^{-1} fw) were identified at 435 and 535 nm, respectively. The total betalains content (83.3 mg 100 g^{-1} fw) in red quinoa seeds from Ecuador was higher compared with the values reported by Li et al. (2015) for amaranth seeds from Mexico, Guatemala and Andean region (0.07 to 0.96 mg 100 g^{-1}). The Bc and Bx contents in the

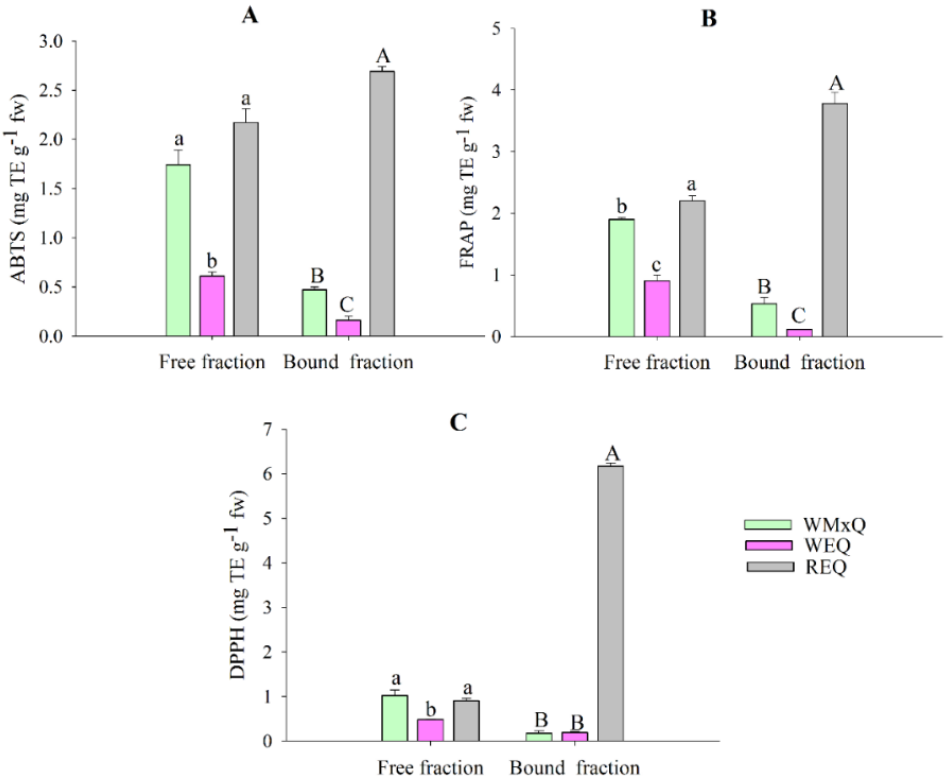
present study were higher than those determined by Abderrahim et al. (2015) for quinoa seeds, these authors used the conventional extraction method with methanol:water (20:80 v/v, room temperature). On the other hand, Laqui-Vilca et al. (2018) reported values between 70.7 and 89.6 mg 100 g^{-1} for Bc and 100.3 to 218.2 mg 100 g^{-1} for Bx in pericarp of red quinoa from Peru, these values were higher than values found in REQ. The latter article results were obtained mixing 50 µg quinoa with water to a final volume of 500 µL, using the microwave-assisted extraction method. In this study, the total betalains content was extracted by acid-hydrolysis with heating, however, it is important to consider the time and temperature to avoid degradation of pigment. In addition, the results of this study demonstrate that the pigments responsible for the red quinoa seeds are betalains and not anthocyanins as reported by Pásko et al. (2009). The betalains are nitrogen compounds present in color seeds, its variation can be related with the high nitrogen concentration in volcanic origin soils.

3.4.7. Antioxidant capacity

Figure 7 shows the results of AC as measured by ABTS, FRAP, and DPPH methods of three quinoa cultivars. The antioxidant capacity in REQ was significantly higher ($P \leq 0.05$) than white quinoas in all methods applied, this can be explained by the contribution of betalains to AC. The ABTS values (Figure 7A) in the free and bound phenolic fractions displayed significantly higher ($P \leq 0.05$) AC in WMxQ (1.74 mg TE g^{-1} fw) and with respect to WEQ. The FRAP analysis (Figure 4B) showed significant differences ($P \leq 0.05$) between studied quinoas. WMxQ (1.9 mg TE g^{-1} fw) presented 52.7% more AC than WEQ in the free phenolic fraction. In bound phenolic fraction, WMxQ (0.5 mg TE g^{-1} fw) showed 80% more AC than WEQ. The same behavior was observed by the DPPH method (Figure 7C), the AC in the free phenolic fraction of WMxQ (1.0 mg TE g^{-1} fw) was higher than WEQ. Mexican quinoa presented IC_{50} of 4.55 mg mL^{-1}, which is equivalent to 47.1% more AC regarding the white quinoa from Ecuador. However,

in the bound phenolic fraction, WMxQ and WEQ showed nonsignificant differences. On the other hand, in the bound phenolic fraction, REQ showed IC_{50} value (0.784 mg mL^{-1} fw) lower than white quinoas, which is equivalent to 96.9% and 97.2% more AC for WMxQ and WEQ respectively. Tang et al. (2015) found that the AC was higher (> 3000 mg/kg) in the hydrolysate fraction from red and black quinoas than free fraction, in the present study REQ had the same behavior.

Figure 7. Antioxidant capacity by ABTS (A), FRAP (B) and DPPH (C) methods in quinoa cultivated in different regions.



Means ± standard deviation followed by different letters are significantly different in free or bound compounds (n = 3, P ≤ 0.05). TE: Trolox equivalent; fw: fresh weight; WMxQ: white Mexico quinoa; WEQ: white Ecuador quinoa; REQ: red Ecuador quinoa.

The AC obtained in the free phenolic fraction of the studied quinoas was lower than those presented by Pellegrini et al. (2018) for white seeds (1.9 to 4.5 mg TE g^{-1}) and red seeds (4.5 to 7.7 mg TE g^{-1}) by the ABTS, FRAP and DPPH

methods. Regarding the DPPH results of quinoa seeds, the values in free phenolic fraction were comparable with IC_{50} (0.46 and 3.77 mg mL^{-1}) presented by Miranda et al. (2011). The difference in AC with other authors could be explained for the extraction method used, for the type of solvent, and time. The AC is associated with the phenolic content in free or bound forms, these compounds exert biological activities for the benefit of human health.

3.5. Conclusion

In the present study, the nutritional composition showed high contents of fiber, ash, P, Ca, Mg in the seeds of Mexican quinoa, while the seeds of white quinoa from Ecuador accumulated high contents of protein, fats, Fe, Zn, and amino acids such as arginine, histidine, alanine, and glutamic acid. Red quinoa showed higher content of carbohydrates, fiber, and K than white quinoas. All three studied quinoa cultivars showed presence of all essential amino acids (0.3 to 1.3 nmol mg^{-1}). The quinoa seeds oil was high in unsaturated fatty acids, mainly linoleic acid (45.4% to 53.9%). Regarding phenolics composition, Mexican quinoa had the highest phenolic content. Betalains was found only in the bound fraction of red quinoa. The acid hydrolysis method increased the extraction of betalains, compared to the assisted-microwave method previously reported. The seeds grown in Mexico showed almost 50% higher phenolic content than white quinoa seeds. Quinoa seeds adapted in Mexico have an improved nutritional and nutraceutical composition compared to white quinoa seeds from Ecuador.

3.6. Acknowledgements

This study was developed by the 21017-EI project from Universidad Autónoma Chapingo. The scholarship of the Magali Anabel Cañarejo-Antamba was supported by CONACYT, México. The authors acknowledge to Experimental Station of Tlaltizapan, CIMMYT, State of Morelos, México and the Ministry of Agriculture and Livestock (MAG), Imbabura Province, Ecuador.

3.7. References

Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M. C., and Condezo-hoyos, L. 2015. Physical features , phenolic compounds , betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quino*a Willd .) from Peruvian Altiplano. Food Chemistry, 183: 83–90. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.029.

Abugoch-James, L. E. 2009. Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritionalm and functional properties. p. 1-31. In Taylor, S.L. (ed.) Advances in food and nutrition research. Vol. 58. Academic Press, Cambrige, Massachuusetts, USA. https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1.

AOAC. 1998. Official Methodos of analysis of AOAC International. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg, Maryland, USA.

Arslanoglu, F., Aytac, S., and Oner, E. K. 2011. Effect of genotype and environment interaction on oil and protein content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed. African Journal of Biotechnology, 10(80): 18409–18417. https://doi.org/10.5897/AJB10.1879.

Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239(1): 70–76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292.

Castellanos-Santiago, E and Yahia, E. M. 2008. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Agricultural and Food Chemistry, 56: 5758–5764.

Ceyhun, A., and Sanlier, N. 2019. A new generation plant for the conventional cuisine : Quinoa (Chenopodium quinoa Willd .). Trends in Food Science & Technology, 86: 51–58. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178–182.

Cheng, Z., Moore, J., and Yu, L. 2006. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. Agricultural and Food Chemistry, 54(1): 7429–7436.

Filho, A. M. M., Pirozi, M. R., Borges, J. T. D. S., Pinheiro Sant'Ana, H. M., Chaves, J. B. P., and Coimbra, J. S. 2017. Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(8): 1618–1630. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811.

Fischer, S., Wilckens, R., Jara, J., and Aranda, M. 2013. Variation in antioxidant capacity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Will.) subjected to drought stress. Industrial Crops and Products, 46: 341–349. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.037.

García-Parra, M., Zurita-Silva, A., Stechauner-Rohringer, R., Roa-Acosta, D., and Jacobsen, S. E. 2020. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its relationship with agroclimatic characteristics: A colombian perspective. Chilean Journal of Agricultural Research, 80(2): 290–302. https://doi.org/10.4067/S0718-58392020000200290.

Gavlak, R., Horneck, R., Miller, R. O., and Kotuby-Amacher, J. 2013. Soil, Plant and Water Reference Methods for the Western Region. 4th ed. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.

Hernández-Ledesma, B. 2016. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, *2*(3:27). https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556.

Hernández-Rodríguez, G., Espinosa-Solares, T., Hernández-Eugenio, G., Villa-García, M., Reyes-Trejo, B., and Guerra-Ramírez, D. 2016. Influence of Polar Solutions on the Extraction of Phenolic Compounds from Capulín Fruits (*Prunus serotina*). Mexican Chemical Society, 60: 73–78.

Huygens, D., Boeckx, P., Templer, P., Paulino, L., Van Cleemput, O., Oyarzún, C., et al. 2008. Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. Nature Geoscience, 1(8): 543–548. https://doi.org/10.1038/ngeo252.

Joshi, V., Laubengayer, K. M., Schauer, N., Fernie, A. R., and Jander, G. 2006. Two Arabidopsis threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. *Plant Cell*, *18*(12):3565–3575. https://doi.org/10.1105/tpc.106.044958.

Kreider, R.B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R, et al. 2017. International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *14*(1): 1–18. https://doi.org/10.1186/s12970-017-0173-z.

Laqui-Vilca, C., Aguilar-Tuesta, S., Mamani-Navarro, W., Montaño-Bustamante, J., and Condezo-Hoyos, L. 2018. Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) hulls. Industrial Crops & Products, 111: 606–614. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.034.

Lee, M., and Sim, K. H. 2018. Nutritional value and the kaempferol and quercetin contents of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd .) from different regions. Foos Science and Technology, 50(6): 680–687.

Li, H., Deng, Z., Liu, R., Zhu, H., Draves, J., Marcone, M., et al. 2015. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three Amaranthus species. Journal of Food Composition and Analysis, 37:75–81. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.003.

López-Yerena, A., Guerra-Ramírez, D., Jácome-Rincón, J., Espinosa-Solares, T., Reyes-Trejo, B., Famiani, F., et al. 2018. Initial evaluation of fruit of accessions of Persea schiedeana Nees for nutritional value, quality and oil extraction. Food Chemistry, 245: 879–884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.088.

McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. HortScience *27*(12): 1254–1255.

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Martinez, E., López, J., Rodríguez, M. J., et al. 2012. Genetic diversity and comparison of physicochemical and nutritional characteristics of six quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) genotypes cultivated in Chile. Food Science and Technology, 32(4): 835–843. https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000114.

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Uribe, E., López, J., Martínez, E., Rodríguez, M. J., et al. 2011. Physico-chemical analysis, antioxidant capacity and vitamins of six ecotypes of chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Procedia Food Science, 1:1439–1446. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.213

Nowak, V., Du, J., and Charrondière, U. R. 2016. Assessment of the nutritional composition of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). Food Chemistry, 193: 47–54. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111.

Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., and Vicha, R. 2015. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. Molecular Science, 16(6): 12871–12890.

https://doi.org/10.3390/ijms160612871.

Pásko, P., Barton, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M., and Zachwieja, Z. 2009. Anthocyanins , total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. Food Chemistry, 115:994–998. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.037.

Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. et al. 2018. Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. Industrial Crops and Products, 111: 38–46. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006.

Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., and C.F.R. Ferreira, I. 2019. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. Food Chemistry, 280: 110–114. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.068.

Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., Zenezini Chiozzi, R., et al. 2018. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410: 3425–3444. https://doi.org/10.1007/s00216-018-0852-x.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationd decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9-10): 1231–1237. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056.

Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., Blajos, J., and Santivañez, T. 2011. La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO, Santiago, Chile. Available at https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010.

Rose, A. 2019. Amino acid nutrition and metabolism in health and disease. Nutrients, 11(2): 1–4. https://doi.org/10.3109/01677063.2011.647143.

Shetty, M. J., and Geethalekshmi, P. 2017. Natural Pigments as Potential Food Colourants: A Review. Trends in Biosciences, 10(21): 4057–4064.

Sobota, A., Świeca, M., Gęsiński, K., Wirkijowska, A., and Bochnak, J. 2020. Yellow-coated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) – physicochemical, nutritional, and antioxidant properties. Journal of the Science of Food and

Agriculture, 100(5): 2035–2042. https://doi.org/10.1002/jsfa.10222.

Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P. X., Liu, R., and Tsao, R. 2015. Characterisation of phenolics , betanins and antioxidant activities in seeds of three Chenopodium quinoa Willd . genotypes. *Food Chemistry*, *166*: 380–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018.

Tang, Y., and Tsao, R. 2017. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. Molecular Nutrition and Food Research, 61(7): 1–16. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600767.

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., and Martínez, E. A. 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(15): 2541–2547. https://doi.org/10.1002/jsfa.4158.

Vilcacundo, R., and Hernández-Ledesma, B. 2017. Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Current Opinion in Food Science, 14:1–6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.007.

Wood, S. G., Lawson, L. D., Fairbanks, D. J., Robison, L. R., and Andersen, W. R. 1993. Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 6 (1):. 41–44. https://doi.org/10.1006/jfca.1993.1005.

4. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES DE *Chenopodium quinoa* CULTIVADA EN LOS ANDES DEL ECUADOR

4.1. Resumen

Los compuestos fenólicos son de especial interés para la industria agroalimentaria, por su implicación en la salud humana. El objetivo de este trabajo fue aislar metabolitos secundarios de extractos polares de semillas de quinoa cultivada en los Andes del Ecuador y determinar su estructura molecular por espectrometría de RMN. Los granos de quinoa fueron adquiridos directamente de agricultores de la región. A partir de estos granos se obtuvieron cinco extractos de polaridad creciente. Del extracto hidro-etanólico se aislaron, por HPLC, tres flavonoides cuya estructura química fue elucidada por RMN de ^{1}H y ^{13}C y experimentos bidimensionales COSY, HMBC y HSQC y los espectros fueron analizados a 700 MHz en acetona-d_6. Los resultados evidenciaron que el extracto hidro-etanólico presentó un mayor rendimiento y una mayor capacidad antioxidante. De la fracción eluida con diclorometano-metanol (6:4), obtenida del extracto hidroetanólico, se aislaron tres flavonoides glicosilados, uno conocido como quercetina 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**1)** otro identificados como: kaempferol 4´-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**2**) y quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**3**). Este último publicado por primera vez para *Chenopodium quinoa*.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa*, flavonoides, cromatografía, RMN

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Magali Anabel Cañarejo Antamba
Directora de Tesis: Diana Guerra Ramírez, Dra

Abstract

ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF FLAVONOIDS OF *Chenopodium quinoa* CULTIVATED IN THE ANDES OF ECUADOR

Phenolic compounds are of special interest to the agri-food industry, due to their implication in human health, The objective of this work was to isolate glycosylated flavonoids from polar extracts of quinoa seeds grown in the Andes of Ecuador and to determinate their molecular structure by nuclear magnetic resonance. The quinoa grains were purchased directly from the farmers of the region. From these grains, five extracts of increasing polarity were obtained. Three flavonoids were isolated by HPLC from the hydroethanolic extract, and their chemical structure was elucidated by 1H and 13C NMR and two-dimensional COSY, HMBC, and HSQC experiments and the spectra were analyzed at 700 MHz in acetone-d6. The results evidenced that the hydroethanolic extract showed a higher yield and a higher antioxidant capacity than the other extracts. From the fraction eluted with dichloromethane-methanol (6:4, v/v), obtained from the hydroethanolic extract, three glycosylated flavonoids were isolated, one known as quercetin 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-rhamnopyranose)-β-galactopyranose (1), other known as kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopyranose)-β-galactopyranose (2) and quercetin 3-O-(6´´-O-α-rhamnopyranosa)-β-galactopyranose (3). The compound (3) was described for the first time.

Key words: *Chenopodium quinoa*, flavonoids, Chromatography, NMR.

Thesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Magali Anabel Cañarejo Antamba.
Advisor: Diana Guerra Ramírez, Dra.

4.2. Introducción

El consumo de alimentos poco saludables ha ocasionado efectos adversos sobre la salud humana. Para enfrentar esta problemática es deseable explorar fuentes alimenticias que aporten nutrientes y compuestos bioactivos de fácil acceso para el consumidor (Shridhar G et al., 2015). Entre los compuestos bioactivos, presentes en el reino vegetal, se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales juegan un papel importante en la prevención y tratamiento de padecimientos neuronales y cardiovasculares, cáncer, diabetes, obesidad y enfermedades bacterianas (Hernández-Ledesma, 2019). Las propiedades terapéuticas de este tipo de compuestos se atribuyen a su capacidad para capturar radicales libres, quelar iones metálicos activos, evitar la agregación plaquetaria, intervenir en procesos celulares de expresión genética y de señalización intercelular (Das et al., 2012). Por lo anterior los compuestos fenólicos son agentes nutracéuticos de interés científico agroalimentario.

La quinoa (*Chenopodiumm quinoa* W.) es un pseudocereal originario de la región Andina, y se ha convertido en una alternativa alimentaria para el resto del mundo. Se reconoce como un alimento estratégico para combatir la desnutrición infantil y una opción para personas con enfermedad celiaca, ya que no contiene gluten (Graf et al., 2015; Martínez-Villaluenga et al. 2020). Las semillas de quinoa son ricas en proteína (de 13.8% a 16.5%) y contienen diversos metabolitos secundarios como saponinas, fitoesteroles, betalaínas y compuestos fenólicos (Hernández-Ledesma, 2019). En quinoa, se ha documentado la presencia de 23 compuestos fenólicos, que pueden estar en forma libre y unidos a estructuras de la pared celular, de los cuales la mayoría son ácidos fenólicos y flavonoides glicosilados derivados de la quercetina y el kaempferol (Tang et al., 2015). También, en semillas de quinoa, provenientes de Perú se identificaron ocho flavonoides, glicosilados, cinco derivados de quercetina y tres de kaempferol (Pereira et al., 2020). Se ha demostrado que los derivados glicosilados de

quercetina y kaempferol identificados en quinoa presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora y antibacteriana (Lin et al., 2019). Estas propiedades benéficas están asociadas con su estructura química, donde el tipo de glicosilación, y la posición del azúcar en la aglicona, determinan el grado de bioactividad y su estabilidad química y enzimática (Lee et al., 2019; Xiao, 2017).

En las semillas de quinoa se han aislado e identificado algunos flavonoides glicosilados (Dini et al., 2004; Hirose et al. 2010; Pellegrini et al., 2018); a la fecha, este tipo de compuestos no se ha descrito en la variedad de quinoa nativa de Ecuador. El objetivo de este trabajo fue aislar flavonoides glicosilados a partir de extractos polares de semillas de quinoa cultivada en los Andes del Ecuador y establecer su estructura molecular por resonancia magnética nuclear.

4.4. Materiales y Métodos

4.3.1. Material vegetal

Las semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) se compraron directamente a los agricultores en Ibarra (0°19′12″ N, 78°12′36″ E), Provincia de Imbabura, Ecuador. Las semillas fueron previamente lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente (22°C) bajo sombra durante 3 días. Posteriormente, fueron molidas usando un nutribullet (NB-101S, CA, USA) hasta obtener un polvo fino (malla 20) el cual se almacenó en bolsas de polietileno a -20°C hasta su análisis.

4.3.2. Reactivos e instrumentación

Para la extracción por maceración y la purificación por cromatografía en columna abierta, se utilizaron disolventes grado reactivo. Para el proceso de extracción en fase sólida y la purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, se utilizaron disolventes grado HPLC: acetonitrilo (ACN), metanol, y agua Milli-Q y el reactivo ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A). La

separación de compuestos por SPE se llevó a cabo en columnas de StrataXpro (C_{18} fase reversa, 140 Å, 55 µm, Phenomenex, USA). Para la purificación por RP-HPLC se utilizó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1100, USA, integrado con un detector UV con arreglo de diodos (λ 230 y 280 nm) y una columna Aeris Peptide de Phenomenex (XB-C_{18}, 250 x 4.6 mm, 3.6 µm). La caracterización de los flavonoides glicosilados se determinó mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C y bidimensionales fueron adquiridos en un equipo Bruker AVANCEC III HD (Bruker AVANCE III HD-500, MA, USA) operado a 700 MHz en acetona 99%, deuterada (Sigma Aldrich). Las masas moleculares se determinaron en un espectrómetro Bruker Daltonic flexAnalysis, MA. USA. Los datos de RMN fueron procesados usando el software MestreNova (14.2).

4.3.3. Obtención de extractos de semillas de quinoa

El proceso de obtención de extractos polares de semillas quinoa se muestra en la Figura 8. Las semillas de quinoa (1 kg), previamente molidas, fueron maceradas en hexano durante 48 h. La mezcla se filtró y el residuo se sometió a dos extracciones más, los filtrados se juntaron y evaporaron al vacío (Büchi, R-3, CH) para obtener el extracto hexánico. El residuo de las semillas se extrajo sucesivamente, bajo las mismas condiciones mencionadas, con diclorometano, acetato de etilo, metanol y una mezcla etanol/ agua/ ácido acético (60:40:0.1) para obtener los extractos correspondientes. El rendimiento de los extractos en orden de polaridad creciente fue: 21.1, 36.3, 3.1, 13.4, y 16.3 g/kg, respectivamente.

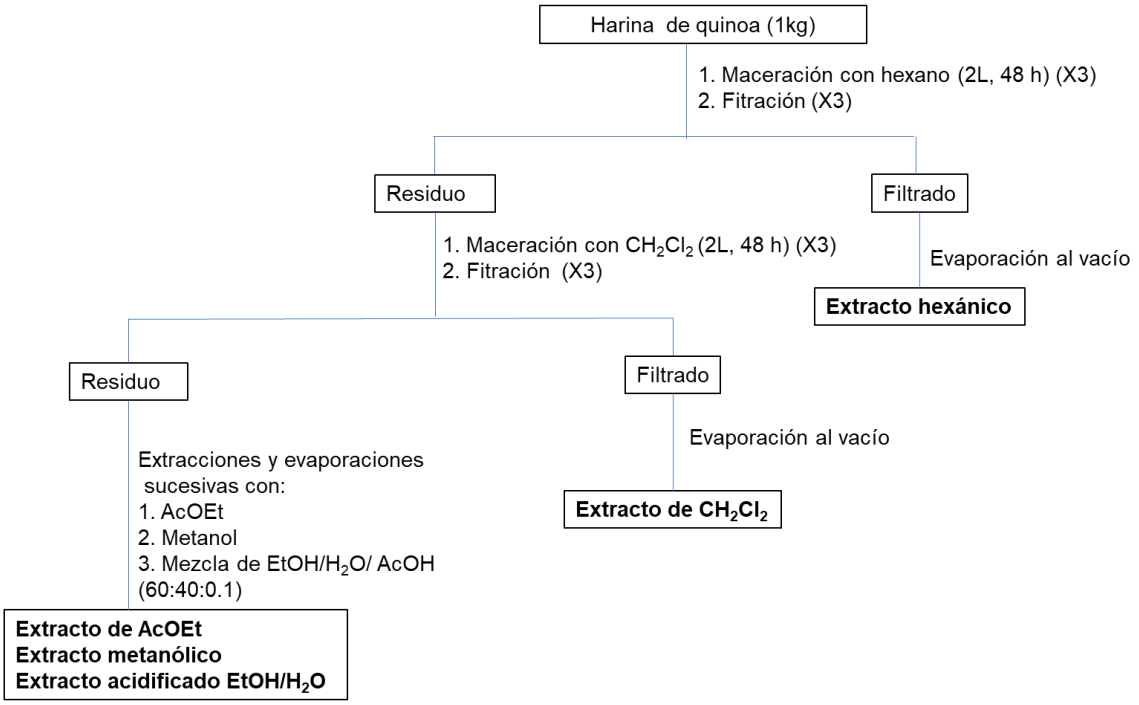


Figura 8. Obtención de extractos de diferente polaridad a partir de semillas de quinoa.

4.3.4. Separación de flavonoides por cromatografía en columna abierta

En la Figura 9 se muestra el proceso de separación del extracto EtOH/H_2O acidificado. Una porción de dicho extracto (16.3 g), fue suspendida en 50 mL de metanol para obtener un precipitado blanco, el cual fue separado por decantación, el sobrenadante, previamente evaporado (14.1 g) fue pre-adsorbido sobre gel de sílice (60, 0.063-0.2 mm, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) para su posterior separación por cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice en una relación 30:1 (w/w) con respecto a extracto a separar. Para eluír la columna se prepararon mezclas de diclorometano/metanol de polaridad creciente, con incrementos de metanol desde un 10% hasta un 70%. El volumen utilizado de cada gradiente fue 2L y se recolectaron un total de 450 fracciones clasificadas en 7 grupos denominados F9:1, F8:2, F7:3, F6:4, F5:5, F4:6 y F3:7.

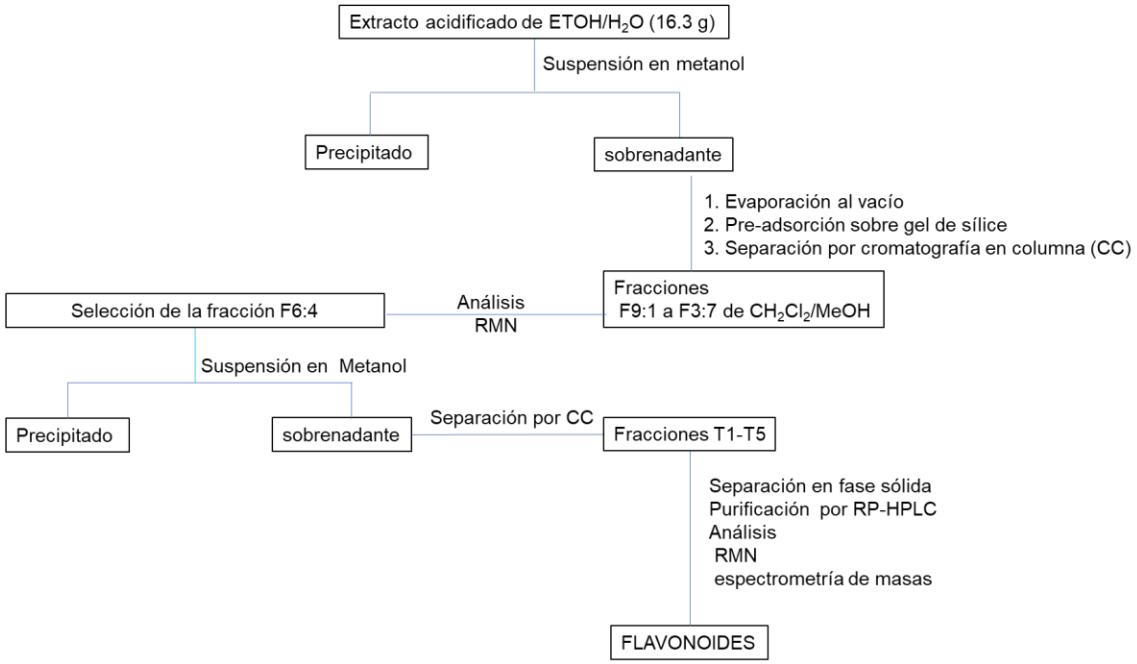


Figura 9. Esquema general de aislamiento y purificación de flavonoides a partir del extracto acidificado EtOH/H_2O.

Para identificar las fracciones ricas en flavonoides se obtuvieron los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C en dimetilsulfóxido (DMSO-d*6*). En la fracción 6:4, se identificaron señales que podrían estar asociadas a los grupos aromáticos e hidroxilo, por lo que fue sometida a una segunda separación cromatográfica. Para ello se utilizó una muestra de 1.5 g de la fracción 6:4, la cual fue suspendida en 10 mL de metanol absoluto, la parte soluble (1.3 g) se sometió a una separación por cromatografía en columna usando las mismas condiciones de separación antes mencionadas. De esta columna se obtuvieron un total de cinco fracciones de interés denominados T1, T2, T3, T4, y T5.

4.3.5. Separación en fase sólida de fracciones ricas en flavonoides

Las fracciones obtenidas en columna abierta aún contenían compuestos que pueden interferir con la purificación, por ese motivo se sometieron a una nueva separación por SPE. Previo al acondicionamiento de la columna (con metanol al

100%), una muestra de cada fracción fue disuelta en H_2O acidificada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05% y recirculada en la columna. Posteriormente se aplicó un volumen de 6 mL de cada uno de los siguientes eluyentes; H_2O con TFA al 0.05%, acetonitrilo (ACN) al 10%, 20%, 30%, 40%, y 100% con TFA al 0.05%. Las fracciones recolectadas se evaporaron a 40°C para remover el acetonitrilo. De este grupo, únicamente las fracciones 10% y 20% de ACN+TFA de T4 presentaron un perfil cromatográfico con señales separables y abundantes en fase reversa para la purificación de compuestos.

4.3.6. Purificación de la fracción T4-20% por RP-HPLC semipreparativa

La fracción T4-20% de ACN+TFA proveniente de la separación en fase sólida fue purificada utilizando un sistema de HPLC semipreparativa en fase reversa. Una muestra (700 µL) previamente acondicionada con ACN al 15 % fue eluída a un flujo de 1mL min^{-1} con un disolvente A (H_2O + 0.05 % TFA) y disolvente B (acetonitrilo + 0.05 % TFA) en los siguientes gradientes: 0-15 % B en 3 min; 15-45 % B en 12 min; 45-45% B en 15 min; 45-15% B en 18 min; 15-15 % en 27 min y fueron detectados en UV-VIS a 280 nm. En la Figura 10 se muestra el cromatograma de separación de la fracción 20% de ACN+TFA-T4.

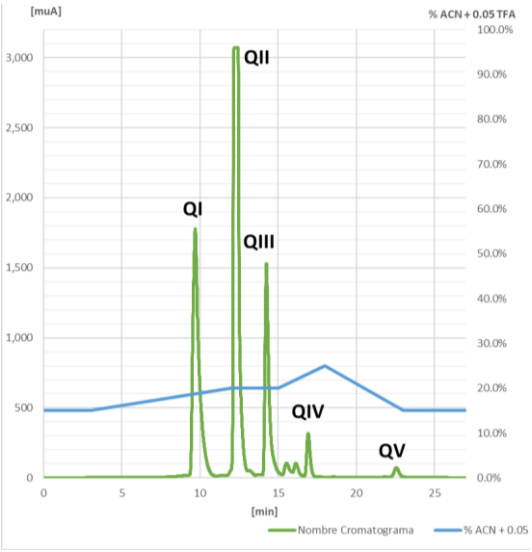


Figura 10. Perfil cromatográfico del extracto de semillas de quinoa blanca a 280 nm. Los tres primeros picos corresponden a los compuestos identificados.

Los compuestos presentes en los picos denominados QI, QII, y QIII fueron colectados, liofilizados y analizados por espectrometría de masas por MALDI-TOF y RMN-^{1}H en acetona deuterada (acetona-d_6). Finalmente, una muestra (4 mg) de los picos cromatográficos QI, QII, y QIII fueron analizados por RMN para determinar su estructura molecular.

4.4. Resultados y Discusión

De la fracción eluida con diclorometano-metanol (6:4), obtenida del extracto acidificado de EtOH/H_2O, se aislaron tres compuestos denominados QI, QII, y QIII, cuya estructura molecular se muestra en la Figura 11. Los métodos cromatográficos empleados en la purificación fueron: CCA, SPE, RP-HPLC, y la elucidación estructural se determinó con base en los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C y los experimentos COSY, HSQC, y HMBC. Además, se determinaron las masas moleculares por la técnica MALDI-TOF. La asignación de señales espectrales de la aglicona y residuos de azúcares se complementó con base en

la asignación de flavonoides descritos previamente en la literatura. Los espectros fueron analizados a 700 MHz determinados en acetona-d_6.

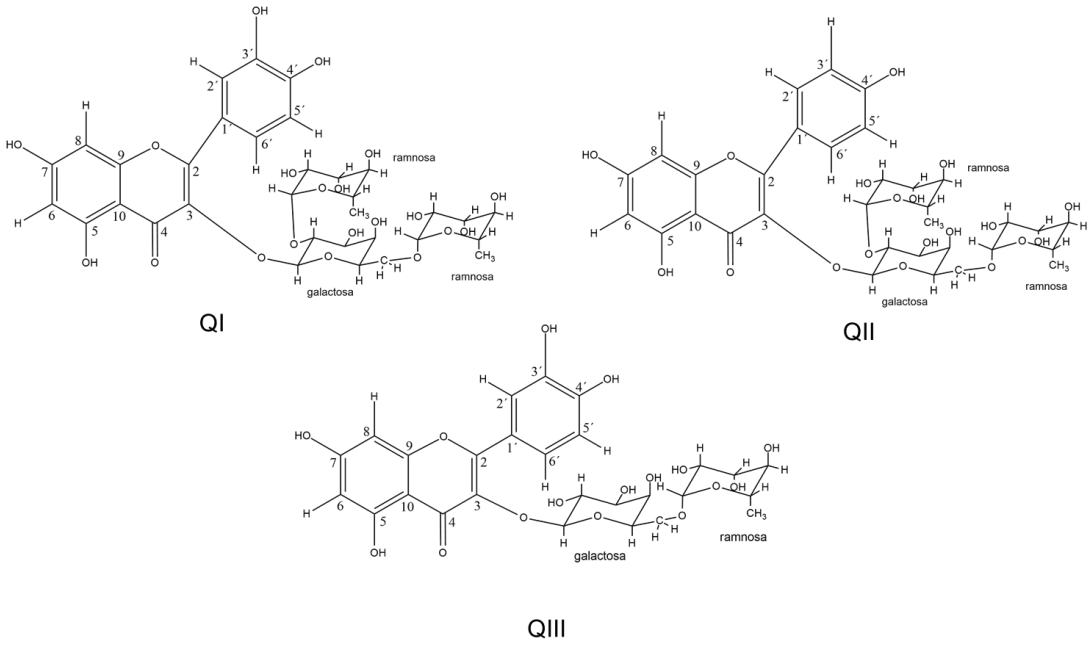


Figura 11. Estructura molecular de los compuestos QI, QII, y QIII aislados de semillas de quinoa de Ecuador.

4.4.1. Elucidación estructural del compuesto QI

El compuesto QI, aislado del extracto hidroetanólico, es un sólido amarillo claro, soluble en agua, metanol, acetona y acetonitrilo. En el análisis de masas, este sólido mostró un ion molecular de 757.9 m/z $[M+H]^+$ que se asoció a la fórmula molecular $C_{33}H_{40}O_{20}$ correspondiente a la masa molecular calculada de 756.7. Considerando la fórmula y el peso molecular, se tienen un total de 14 insaturaciones. El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) mostrado en la Figura 12, exhibe un conjunto de señales entre 6 y 8 ppm que fueron asignadas a cinco hidrógenos de tipo aromático, asimismo entre 3.2 y 4.2 ppm, el espectro exhibe un grupo de señales complejas que según su

desplazamiento químico están asociadas a hidrógenos base de oxígeno de grupo hidroxilo (-CH-OH), como las observadas en azúcares (Hirose et al., 2010).

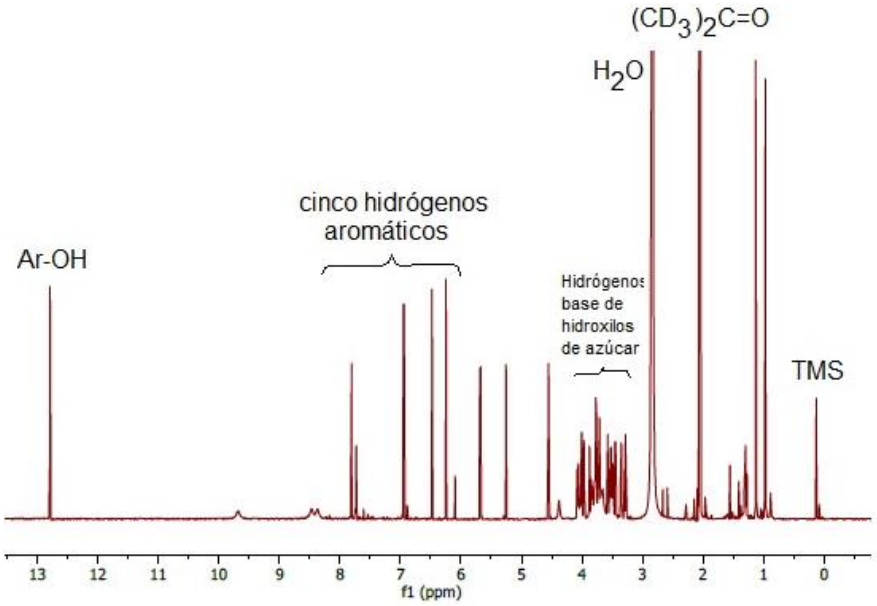


Figura 12. Espectro de RMN-1H (700 MHz, acetona-d6) del compuesto QI.

Continuando con el análisis estructural del derivado QI, una expansión de la zona de 6 a 8 ppm del espectro de RMN de ^{1}H (Figura 13), muestra dos hidrógenos aromáticos a 6.25 y 6.48 ppm, ambos exhiben un acoplamiento meta de J = 2.1 Hz en un anillo de benceno tetrasustituído, cuyo patrón de acoplamiento es de un sistema AB.

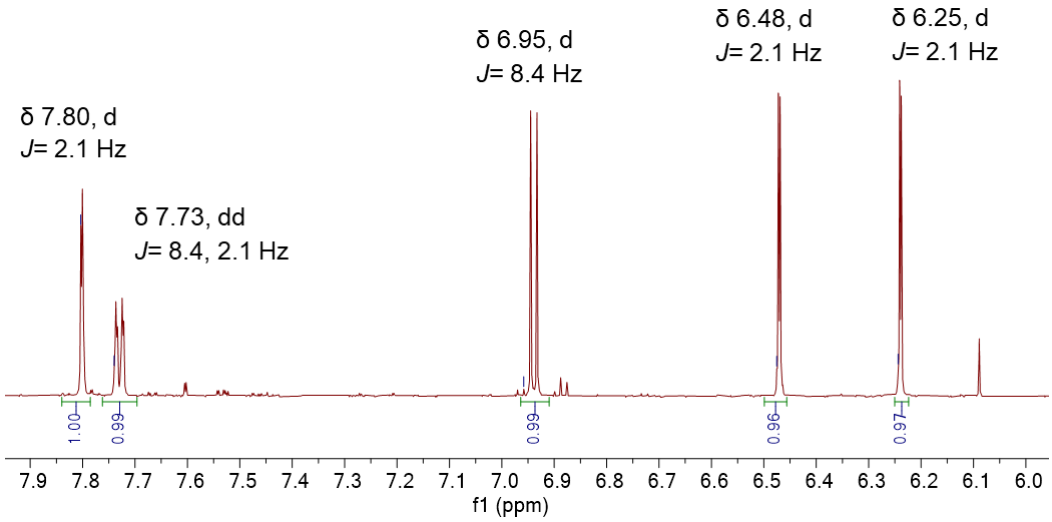


Figura 13. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QI, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos.

En la misma zona de hidrógenos aromáticos se observa otra señal a 6.95 ppm como una señal doble (d) de constante de acoplamiento *J*= 8.4 Hz y otra señal a 7.73 ppm como una doble de dobles (dd) exhibiendo constantes de acoplamiento *J*=8.4 y *J*=2.1 Hz y finalmente otra señal doble (d) a 7.80 ppm con una constante de acoplamiento *J*= 2.1 Hz, estas tres señales muestran un patrón de acoplamiento ABX, que deben pertenecer a otro anillo de benceno trisustituído, proponiéndose las estructuras parciales mostradas en la Figura 14.

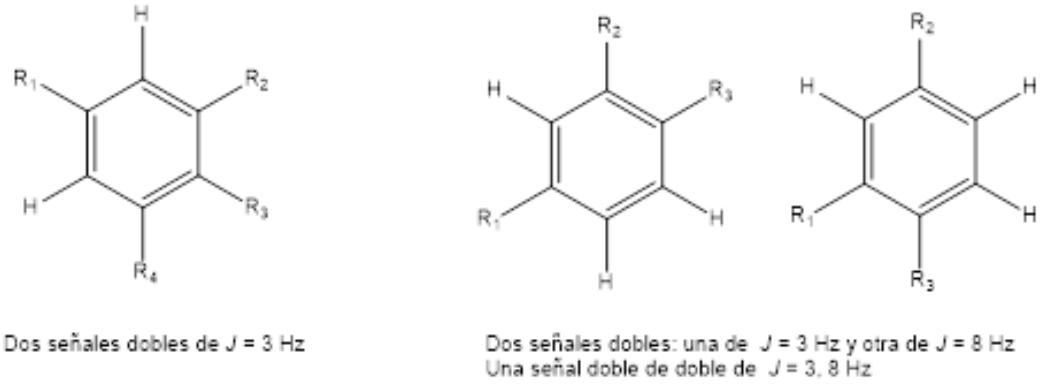


Figura 14. Fórmulas parciales de los derivados de benceno que están contenidos en QI.

Los patrones de acoplamiento de los hidrógenos aromáticos mencionados anteriormente se confirmaron mediante su espectro bidimensional homonuclear COSY, cuya expansión se muestra en la Figura 15, en este espectro se observa que los hidrógenos a 6.25 y 6.48 ppm, se encuentran acoplados, así como los localizados en 6.95 y 7.73 ppm también están acoplados y este último tiene una correlación meta con el protón desplazado a 7.80 ppm.

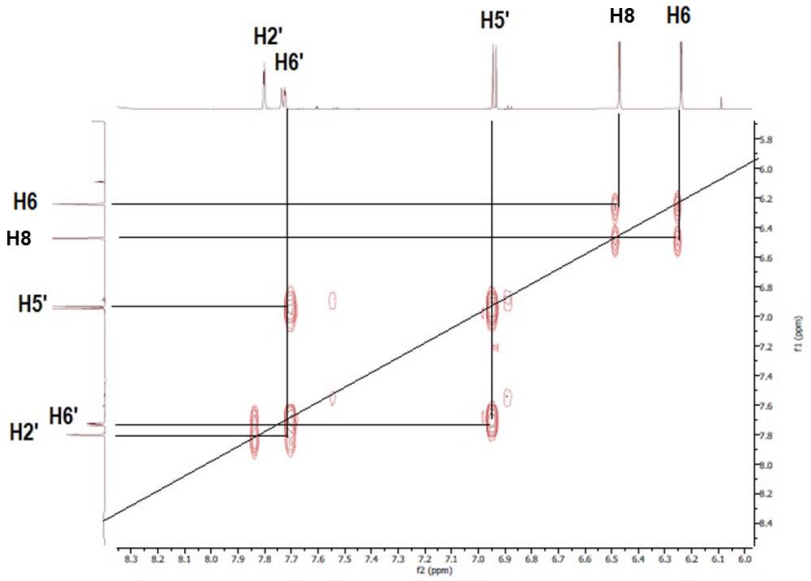


Figura 15. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QI.

Por otro lado, en una expansión del espectro de RMN- ^{13}C (Figura 16) entre 180.0 y 90.0 ppm, se observaron señales para 15 carbonos que podrían asociarse a la estructura de un flavonoide.

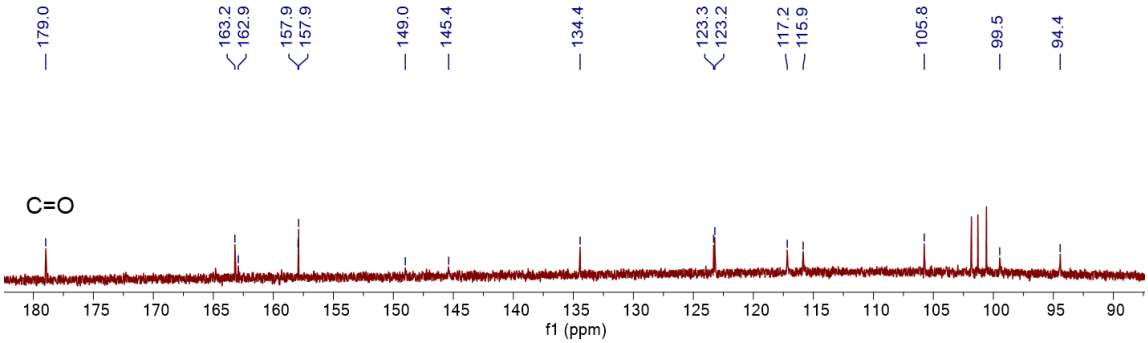


Figura 16. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C del derivado QI, mostrando la zona de carbonos aromáticos.

La señal 179.0 ppm se asigna a un grupo carbonilo de cetona α, β-insaturada (R-C=C-C=O) vecino a un anillo de benceno; tal desplazamiento químico permite efectuar una comparación de los derivados aromáticos como metabolitos secundarios de plantas denominados flavonoides; los cuales se clasifican como chalconas, flavanonas, flavonas e isoflavonas, cuyos datos de RMN de ^{13}C se encuentran publicados por Pelter et al. (1976). Los desplazamientos químicos de los grupos carbonilo publicados en dicho artículo, permiten descartar la estructura de una chalcona (C=O 191.95 ppm) y de una flavanona (C=O 195.5 ppm), finalmente la estructura de una flavona se justifica porque usualmente resuenan a 178 ppm, en tanto que las isoflavonas muestran resonancia de grupo carbonilo a 175 ppm, como se muestra en la Figura 17.

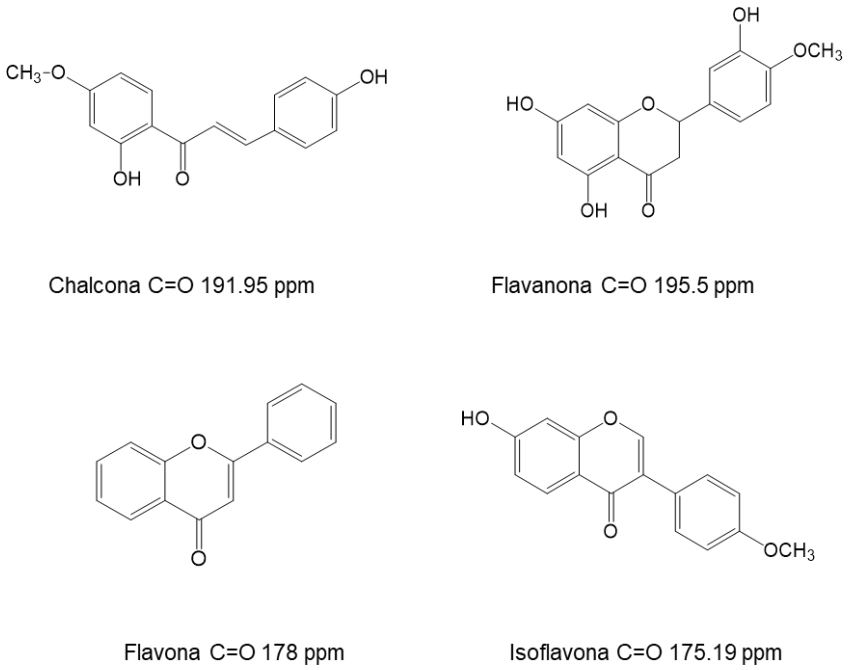


Figura 17. Estructura y datos de RMN de ^{13}C de grupos carbonilo presentes en flavonoides que pueden estar presentes en la estructura del derivado QI (Pelter et al., 1976).

Hasta este punto de la discusión de la estructura del derivado QI, se ha establecido como un flavonoide glicosilado al contener varias moléculas de azúcar enlazadas a este tipo de metabolito. Como se puede apreciar en su espectro de RMN de ^{1}H (Figura 12), este derivado contiene varios grupos hidroxilo; uno de ellos se encuentra a 12.79 ppm, como una señal simple e intensa que se asoció a la presencia de un hidrógeno de hidroxilo fenólico formando puente de hidrógeno con un grupo cetona. Esta situación se presenta en muchas moléculas orgánicas que contienen hidroxilos aromáticos vecinos a grupos carbonilo, ver Figura 17. Una búsqueda de este tipo de compuestos en bases de datos espectroscópicos permite corroborar esta señal en el espectro de RMN de la 2-hidroxipropiofenona donde el protón fenólico resuena a 12.6 ppm (Figura 18).

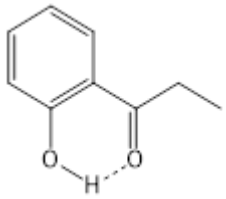


Figura 18. Estructura de la propiofenona mostrando un hidrógeno de hidroxilo fenólico a un grupo carbonilo de cetona.

Finalmente, con la información analizada hasta este momento, es posible proponer dos estructuras para la aglicona del derivado QI. Si se considera la fórmula condensada $C_{33}H_{40}O_{20}$, y que al menos tres moléculas de azúcar están conectadas a este derivado, es posible que contenga dos grupos hidroxilo libres y tres grupos a los que están conectadas las tres moléculas de azúcares mencionadas, ver Figura 19. Un análisis de los patrones de acoplamiento que tienen semejanza con las posibilidades, flavonoide A y flavonoide B, permitieron encontrar analogía con el espectro del 3,4-dimetoxiestireno y la posibilidad estructural del flavonoide A. En tanto que la posibilidad estructural del flavonoide B, presenta analogía con el patrón de acoplamiento del espectro de la metilhidroquinona.

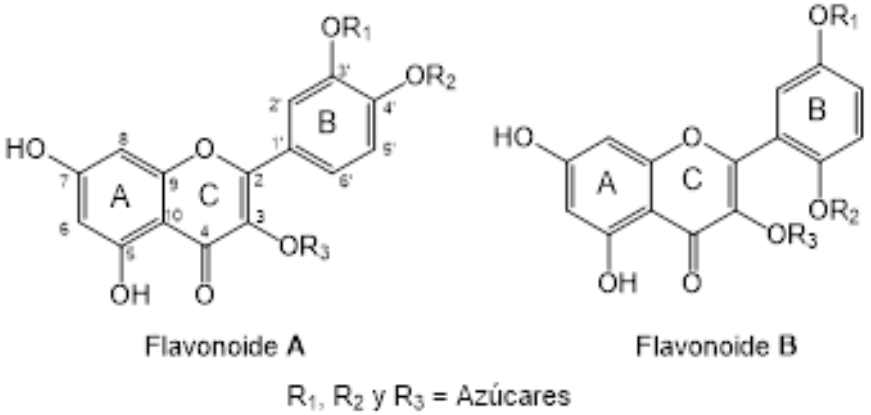


Figura 19. Posibilidades de flavonoide A y flavonoide B que permiten establecer la estructura de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

En conclusión, la posibilidad estructural del flavonoide A, es la que se apega o es congruente con la estructura de la aglicona de la quercetina, como se observa en la Figura 20, donde se incluyen expansiones de los espectros publicados por la empresa Merck-Sigma-Aldrich.

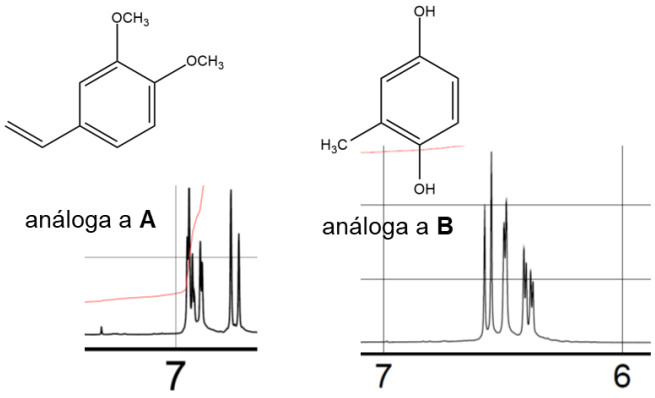


Figura 20. Expansión de los espectros de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) publicados por la empresa Merck-Sigma Aldrich, que permiten asignar a la quercetina (flavonoide **A**) como la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

Asignación de los desplazamientos químicos de RMN del derivado QI

Después de establecer la estructura molecular de la aglicona del derivado QI como quercetina, se efectuó la asignación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y RMN de ^{13}C. Estos desplazamientos químicos deben modificarse debidos a la anisotropía molecular que genera la cercanía de los azúcares. Para llevar a cabo dicha asignación, se emplearon los experimentos bidimensionales heteronucleares de HMBC y HSQC, y homonucleares COSY. La rigidez conformacional en el sistema flavonoide de la quercetina de QI facilitó la interpretación de los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C (Cuadro 5). La asignación se inició a partir de la señal de resonancia característica del hidrógeno de fenol a 12.79 ppm que muestra correlaciones observables en la expansión del espectro HMBC (Figura 21) a dos enlaces con el carbono C5 en 162.9 ppm y a tres enlaces con los carbonos C10 y C6 a 105.8 y 99.5, respectivamente.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C y correlaciones, HMBC y COSY para la aglicona de QI en acetona-d_6.

Átomo	d(^{1}H)	d(^{13}C)	HMBC	COSY
2		157.9	2', 6´	
3		134.4	1''	
4		179.0		
5		162.9	OH, 6,	
6	6.25 d	99.5	OH	8
7		163.2	6,	
8	6.48 d	94.4	6,	6
9		157.9	8,	
10		105.8	6, OH, 8,	
1'		123.2	2'	
2'	7.80 d	117.2		6'
3'		145.4	5'	
4'		149.0	6'	
5'	6.95 d	115.9	6'	6'
6'	7.73 dd	123.3	2', 5'	2', 5'

Así mismo, en el gráfico de correlaciones tipo HMBC y HSQC (Figura 21) se observa que el protón H6 muestra varias correlaciones importantes a dos enlaces con el carbono base de hidroxilo C7 a 163.2 ppm y a tres enlaces con el carbono C8 a 94.4 ppm. Este último carbono muestra correlación a un enlace con el hidrógeno H8 a 6.48 ppm y a su vez, este hidrógeno muestra una clara correlación a dos enlaces con el carbono C9 a 157.9 ppm (Figura 21).

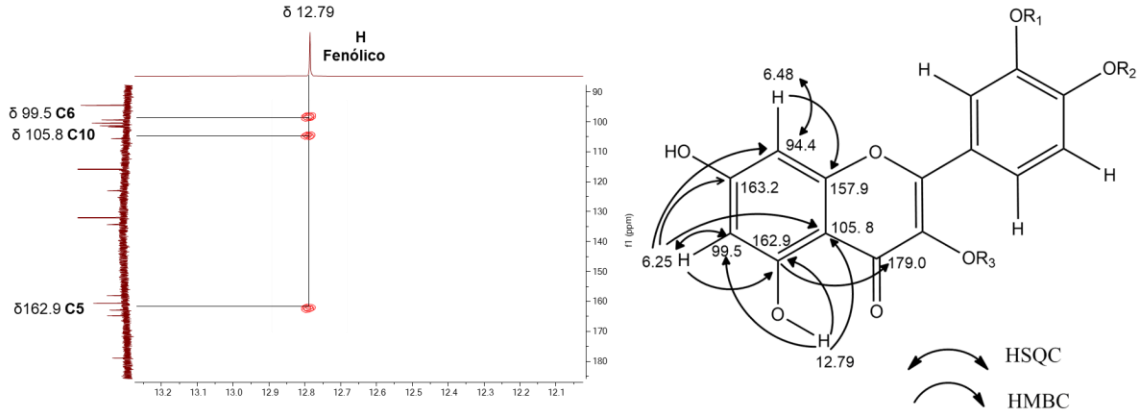


Figura 21. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones del protón de hidroxilo fenólico en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

De igual manera, en la expansión del espectro HSQC (Figura 22) se muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos H6 y H8 presentes en la aglicona del anillo A.

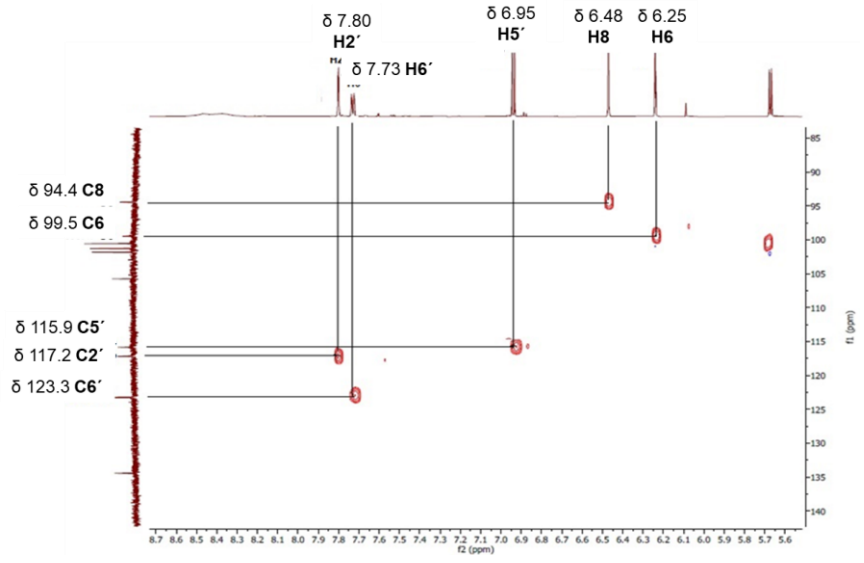


Figura 22. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

Se continuará con la asignación de desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C del anillo B (Figura 23), iniciando con la señal característica doble en 6.95 ppm de constante de acoplamiento *J* = 8.4 Hz (a la que le corresponde una señal a 115.9 ppm de C5' en su espectro HSQC, Figura 22), mostró correlaciones con los carbonos 123.3 ppm (que conecta a un enlace en su espectro HSQC (Figura 22) con el hidrogeno H6' a 7.73 ppm) y 123.2 ppm que son asignables a los carbonos C6´ y C1', respectivamente. Este mismo protón de señal doble (6.95 ppm) observa correlaciones a dos y tres enlaces con los carbonos a 145.4 y 149.0 ppm que fueron asignados a C3' y C4', respectivamente. Una señal de hidrógeno a 7.73 ppm (doble de dobles *J* = 8.4, 2.1 Hz) muestra una correlación a tres enlaces con el carbono C4' corroborando así la asignación de este carbono. Finalmente, la señal a 7.80 correspondiente a un doblete (*J* = 2.1 Hz) muestra correlación a un enlace en su espectro HSQC con la señal a 117.2 ppm asignada al carbono C2' y a la vez observa correlaciones a dos y tres enlaces con los desplazamientos 123.2 y 123.3 ppm asignados a los carbonos C1' y C6', respectivamente. De esta manera quedan asignados los desplazamientos químicos del anillo B de la quercetina presente en el derivado QI.

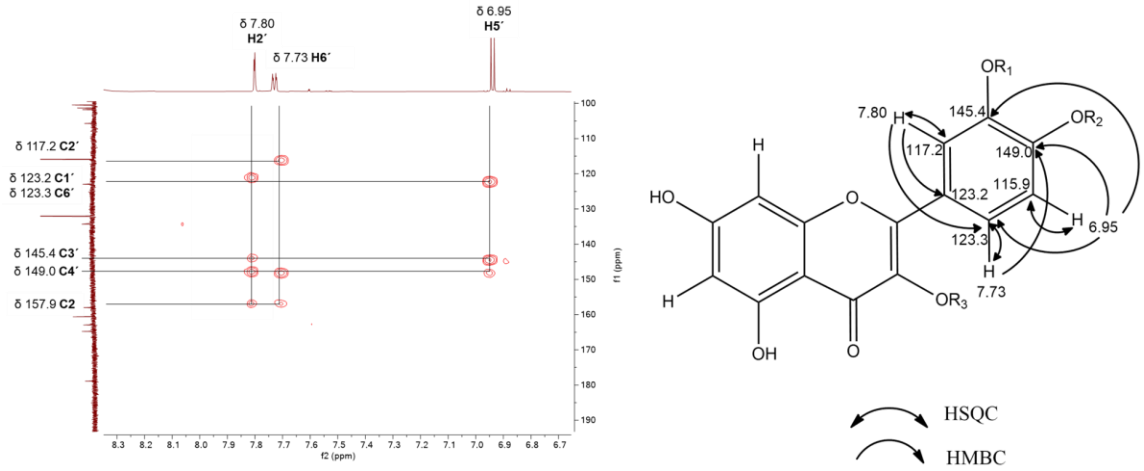


Figura 23. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

Por último, solo faltan de asignar los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C de los tres carbonos que están en el anillo C de la aglicona presente en el derivado QI. De inicio como se indicó anteriormente, se observa un desplazamiento a 178.9 ppm que se asignó al carbono C4 representado por el grupo carbonilo (C=O) en dicho anillo.

Por otro lado, la señal a 157.9 muestra correlaciones a tres enlaces en su espectro HMBC (Figura 23) con las resonancias a 7.80 y 7.73 ppm de los protones H2' y H6' del anillo B de la quercetina, y entonces dicha señal se asignó al carbono olefínico C2. Solamente queda una señal a 134.4 ppm que no muestra acoplamiento con protones ni del anillo A ni del B y fue asignado al carbono olefínico C3, mismo que es de esperarse este conectado a un residuo de azúcar, específicamente muestra una correlación a tres enlaces en su espectro HMBC con el hidrógeno anomérico a 5.68 ppm. Un resumen de las correlaciones a dos y tres enlaces deducidos de su espectro HMBC de la aglicona de QI, se muestra en la Figura 24.

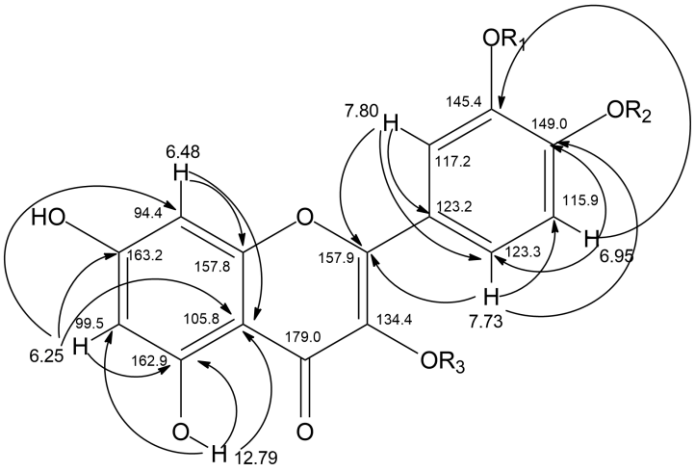


Figura 24. Resumen gráfico de las correlaciones tipo HMBC de la aglicona presente en el derivado QI, aislado de quinoa.

Continuando con la asignación de desplazamientos químicos, en el espectro de RMN de ^{13}C del derivado QI, se observan un conjunto de señales en la zona de

77 a 66 ppm y 19 a 17 ppm, cuya expansión (Figura 25) permite contabilizar 15 átomos de carbono que sumados a tres carbonos anoméricos dan los 18 carbonos de tres monosacáridos (Dini et al., 2004).

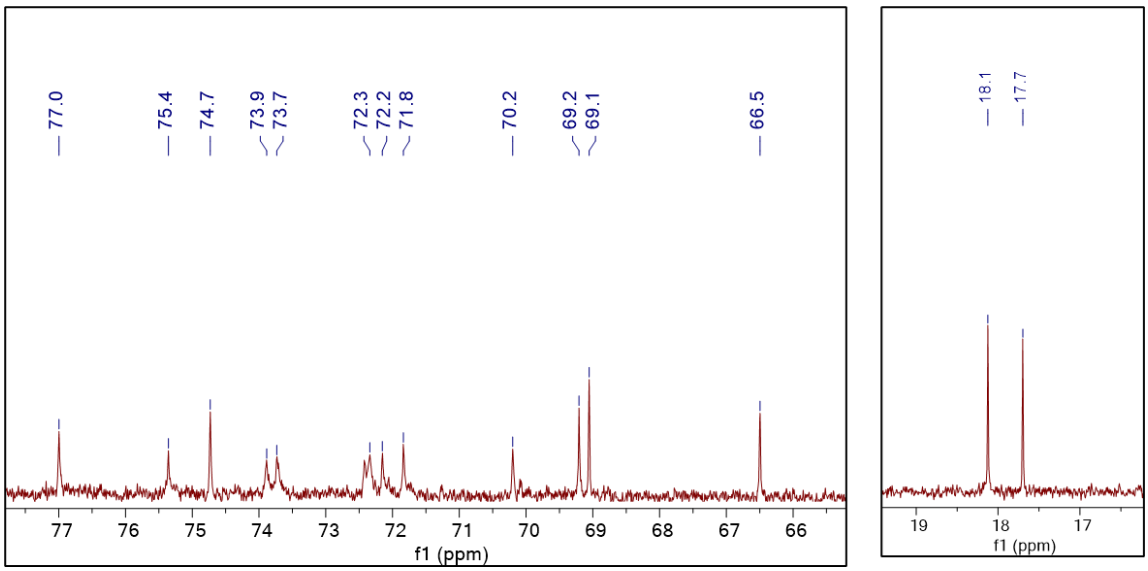


Figura 25. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C, mostrando señales importantes de azúcares presentes en el derivado QI.

Para establecer la naturaleza de los tres azúcares interconectados en el derivado QI, al analizar una expansión del espectro HSQC (Figura 26), se puede observar que únicamente a 66.5 ppm aparece una señal que fue asignada a un grupo metileno (-CH_2-, observar los contornos azules en este espectro) que es característico de los monosacáridos (glucopiranosas) naturales. Adicionalmente en el espectro de RMN de ^{1}H mostrado en la Figura 12, las señales dobles a 0.97 ppm y 1.12 ppm que integran para tres hidrógenos cada una, permite deducir que dos monosacáridos contienen grupos metilo, sugiriendo que es posible la presencia de moléculas de ramnosa o de fucosa.

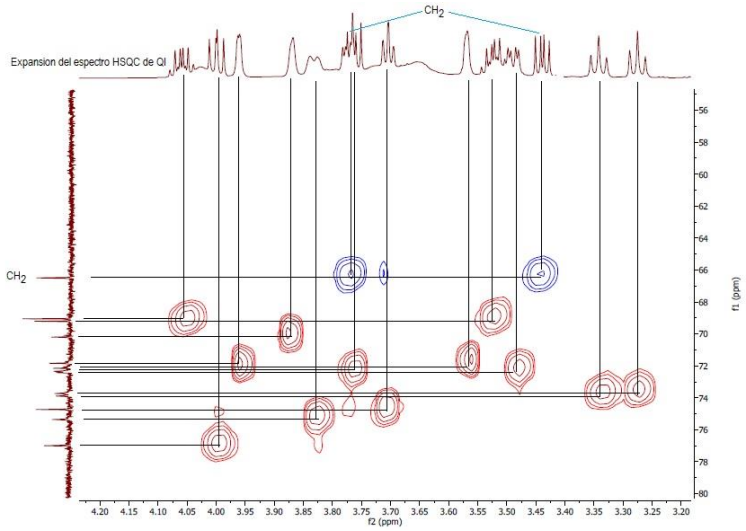


Figura 26. Expansión del espectro bidimensional HSQC de los hidrógenos de los monosacáridos presentes en el derivado QI.

Establecimiento de la conectividad y tipos de azúcares presentes en el derivado QI.

Como ya se mencionó, la estructura del derivado QI aislado y purificado de las semillas de quinoa, muestra un anillo de aglicona asignado como quercetina. Se puede establecer que este derivado contiene tres grupos de azúcar que son evidenciados por la presencia de tres hidrógenos anoméricos como lo indica la expansión del espectro HSQC mostrada en la Figura 27. En dicha expansión se deduce que el derivado QI, debe contener tres azúcares ubicados, ya sea en C3, C3’ o en C4’. Como fue establecido de manera preliminar la señal a 134.4 ppm que no muestra acoplamiento con protones ni correlaciones con el anillo A ni del B en la aglicona de QI, fue asignado al carbono olefínico C3.

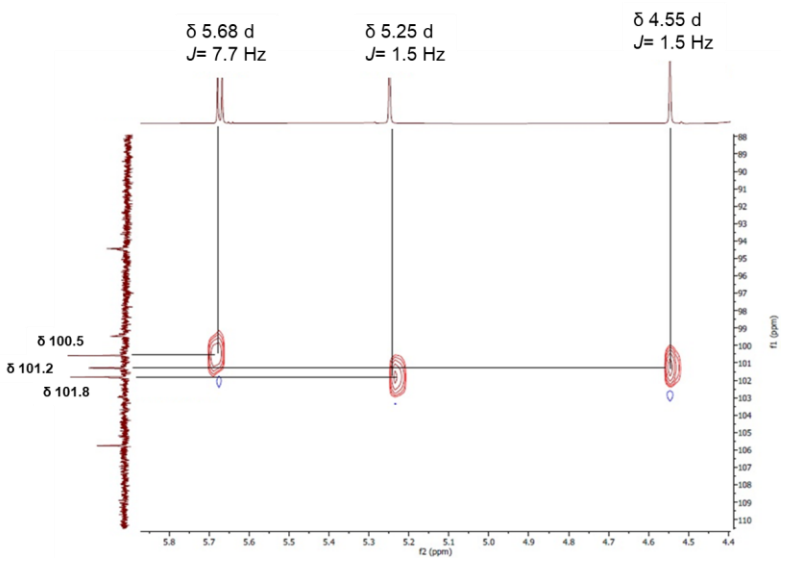


Figura 27. Expansión del espectro bidimensional HSQC de hidrógenos anoméricos de azúcares presentes en el derivado QI.

Mismo que está conectado a un residuo de azúcar, específicamente es el único que muestra una correlación a tres enlaces en su espectro HMBC con el hidrógeno anomérico a 5.68 ppm (Figura 28).

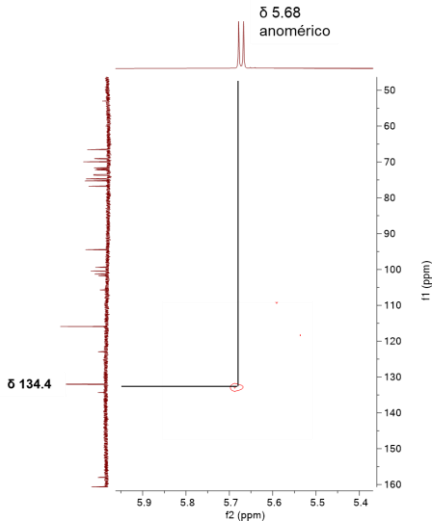


Figura 28. Expansiones del espectro bidimensional HMBC mostrando una correlación de la señal doble a 5.68 ppm de un hidrogeno anomérico de azúcar con la señal a 134.44 ppm del carbono C3 presente en el derivado QI.

Es importante resaltar que los hidrógenos anoméricos en 5.25 y 4.55 ppm, no exhiben correlación a tres enlaces con ningún carbono de la quercetina, deduciendo entonces que los tres residuos de azúcares deben estar interconectados en el carbono C3 de esta aglicona del derivado QI. Por tanto, se propone dos estructuras parciales de este derivado, una de conexión lineal entre los tres monosacáridos y otra indicando una ramificación de interconexión de monosacáridos, como la mostrada en la Figura 29.

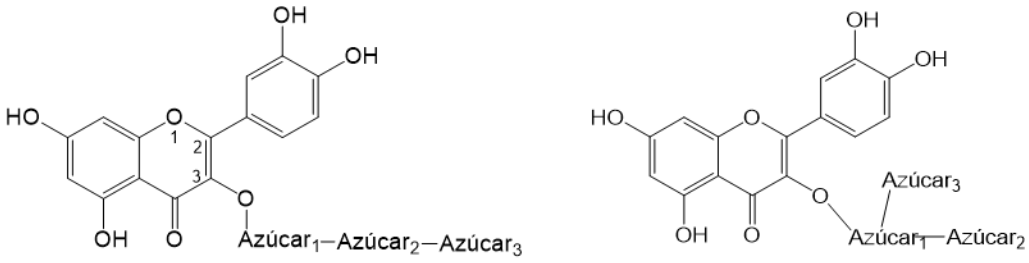


Figura 29. Estructuras parciales de interconexión de monosacáridos en el derivado QI, deducida del análisis de las correlaciones observadas en sus espectros de RMN.

Para avanzar en el tipo de interconexiones de azúcares que se espera en el derivado QI, es del conocimiento que al ser un producto de origen natural, los monosacáridos presentes deben, en principio, tener interconexiones glicosídicas 1,4´-, como la encontrada en la lactosa, un disacárido que está formado por galactosa y glucosa, o bien un enlace glucosídico 1,6´-, como la que presenta la amigdalina, un disacárido constituido por dos moléculas de glucosa y otra molécula de mandelonitrilo insertado en el carbono C1'. Con respecto a la observación de ramificaciones de monosacáridos, se ha descrito que la estructura de la amilopectina muestra este tipo de arreglo, donde se observan enlaces glicosídicos 1,4´- de moléculas interconectadas de forma lineal de glucosa y otro enlace glucosídico 1,6´- de glucosa ramificada, como se muestra en la Figura 30.

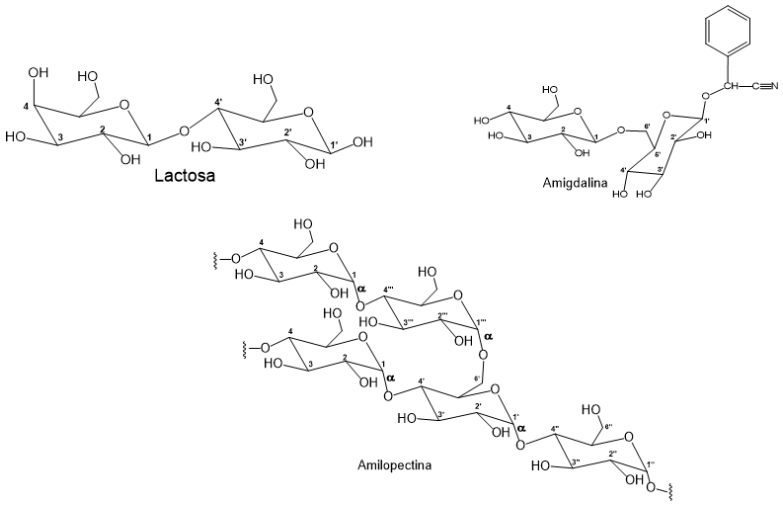


Figura 30. Ejemplos de disacáridos y polisacáridos que muestran enlaces glicosídicos 1,4' y 1,6' que podrían ser modelos para deducir la interconexión de azúcares en el derivado QI.

Continuando con la conectividad de los monosacáridos con la aglicona de QI, como se mencionó una correlación a tres enlaces en su espectro HMBC con el hidrógeno anomérico a 5.68 ppm al carbono C3 de la quercetina. Esta asignación se toma como punto de partida que observa una correlación en su espectro COSY con la señal a 3.96 ppm asignada al hidrógeno sobre el carbono C2'' que por su correlación HSQC le corresponde un desplazamiento a 77.0 ppm; este desplazamiento químico a tan alta frecuencia solamente se observa en monosacáridos como la galactosa (Dini et al., 2004). Otra señal importante para establecer la segunda interconectividad es la observada a tres enlaces en su espectro HMBC (Figura 31) entre la resonancia a 77.0 ppm y el hidrógeno anomérico a 5.25 ppm de un segundo residuo de monosacárido que podría corresponder a una ramnosa o una fucosa. Para localizar la tercera conectividad de azúcares, precisamente la resonancia del grupo metileno (-CH_2-) a 66.5 ppm muestra una correlación a tres enlaces en el espectro HMBC (Figura 31) con el hidrógeno anomérico situado en 4.55 ppm de otro residuo de ramnosa o fucosa.

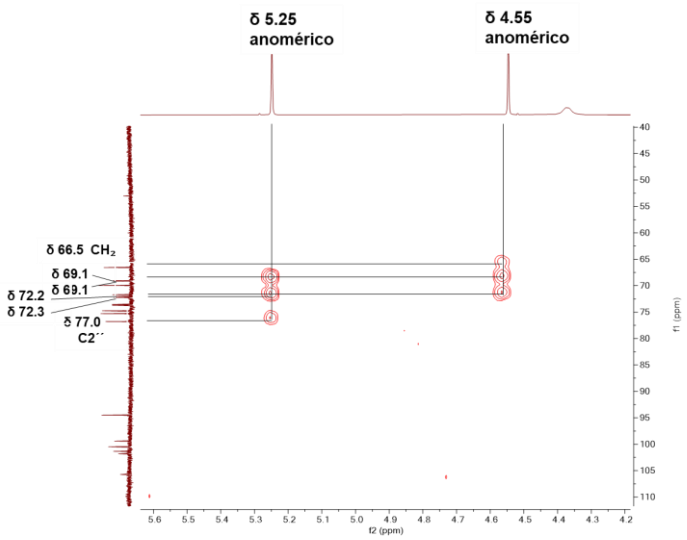


Figura 31. Expansión del espectro HMBC de QI mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos.

Para deducir el tipo de monosacárido que está interconectado con la galactosa, se toma como base los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H de fucosa publicado por Wu et al. (2014) y de los monosacáridos encontrados en QI, los cuales se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Desplazamientos químicos de RMN-^{1}H y constantes de acoplamiento (J) en Hz para fucosa y ramnosa

RMN-1H por Wu et al. (1014)		**RMN-1H de QI**	
	Fucosa	**monosacárido 1**	**monosacárido 2**
H-1	5.0 (J= 7.5 Hz)	5.25 (d, J=1-5 Hz, 1H)	4.55 (d, J= 1.5 Hz, 1H)
H-2	3.9 (J=7.5 Hz)	3.96 (dd, J= 3.6, 1.6 Hz, 1H)	3.57 (d, J=2.4 Hz, 1H)
H-3	4.0	3.76 (d, J=6.1 Hz, 1H)	3.49 (dd J=9.3, 3.5 Hz, 1H)
H-4	3.9	3.35 (t, J=9.4, 1H)	3.28 (t, J=9.4 Hz, 1H)
H-5	4.3	4.06 (dd, J=9.5, 6.2 Hz, 1H)	3.52 (dd, J=9.4, 6.2 Hz, 1H)
H-6 (CH_3)	1.2	0.97 (d, J=6.2 Hz, 3H)	1.12 (d, J=6.2 Hz, 3H)

Los desplazamientos correspondientes para la fucosa son diferentes a los observados en los dos monosacáridos contenidos en QI. Además, la constante de acoplamiento del protón H2 de la fucosa es aproximadamente *J*= 7.5 Hz (Usvalampi et al., 2018), esto indica que el hidroxilo (OH) sobre el carbono C2 está en posición axial, tal como se puede observar en su estructura química (Figura 32). En tanto que, la constante de acoplamiento de H2 de los monosacáridos identificados en QI es *J*= 3.6 y 2.4 Hz, esto muestra que el hidroxilo sobre el carbono C2 está en posición ecuatorial. Dado lo anterior, la estructura química de una ramnosa (Figura 32) es la que más se ajusta a esta característica. Por tanto, se podría deducir que además de la galactosa, existen dos ramnosas en el derivado QI.

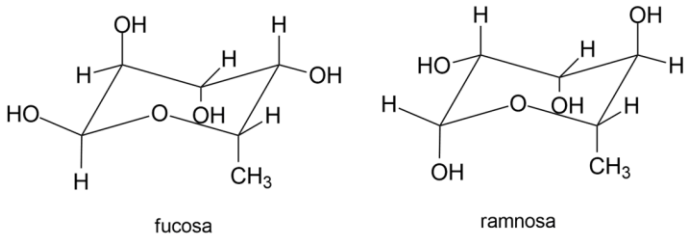
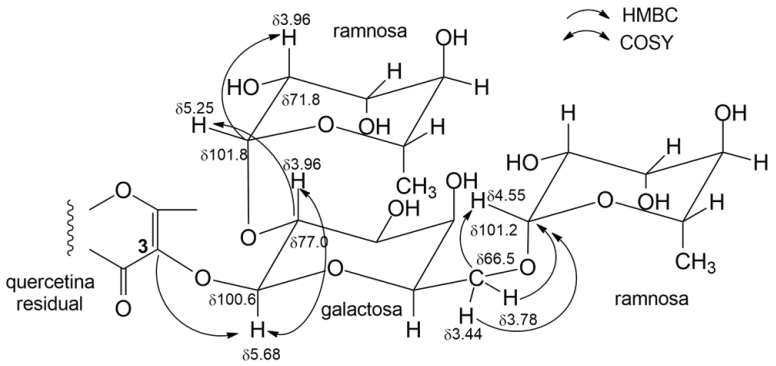


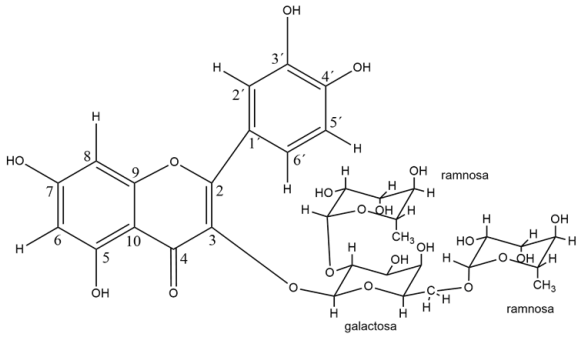
Figura 32. Estructura de posibles monosacáridos presentes en el derivado QI

La asignación completa de la conformación molecular de los residuos de azúcar fue mediante los espectros HMBC, HSQC, y COSY, mismos que permitieron correlacionar a dos y tres enlaces a los protones y carbonos de azúcar contenidos en el derivado QI. Con base en estos resultados, se propone que el compuesto QI es una quercetina que contiene a una galactosa y ésta última a su vez contiene dos ramnosas en la posición C-2´´ y C-6´´, quedando identificada como quercetina 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa **(1).** En la Figura 33 se muestra a las tres moléculas de azúcar enlazadas por sus carbonos anoméricos y a la estructura propuesta para el derivado QI. Este compuesto ha

sido previamente identificado en extractos polares de semillas de quinoa cultivadas en Perú (Dini et al., 2004 y Pereira et al., 2020).



Asignaciones parciales de tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos del derivado QI



Estructura molecular completa del derivado QI

Figura 33. Asignaciones parciales resultantes de la correlación HMBC del derivado QI mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos y estructura molecular completa de QI.

Los flavonoles glicosilados constituidos particularmente por derivados de quercetina y kaempferol son los compuestos más abundantes en las semillas de quinoa (Hernández-Ledesma, 2019). La quercetina glicosilada más común en la naturaleza tiene un residuo de azúcar en la posición C3 quedando como quercetina 3-O-glucósido. Este compuesto es un potente antioxidante capaz de combatir especies reactivas de oxígeno (EROS), causantes del estrés oxidativo, y exhibe propiedades biológicas en beneficio de la salud de las personas (Xiao, 2017).

4.4.2. Elucidación estructural del compuesto QII

El compuesto QII aislado con un alto grado de pureza es un sólido amarillo claro, soluble en agua, metanol, acetona, y acetonitrilo. De acuerdo con el análisis de masas de este sólido se identificó un ion molecular de 742 m/z $[M+H]^+$ que se asoció a la fórmula molecular $C_{33}H_{40}O_{19}$ correspondiente a la masa molecular calculada de 740.22 con 14 insaturaciones. En el espectro de RMN-^{1}H de QII que se muestra en la Figura 34, se observaron cuatro señales entre 8 a 6 ppm que fueron asignadas a hidrógenos de un anillo de benceno. De igual manera, el espectro muestra un grupo de señales entre 4.2 a 3.0 ppm que podrían estar asociadas a hidrógenos base de oxígeno de grupo hidroxilo de azúcares (Hirose et al., 2010).

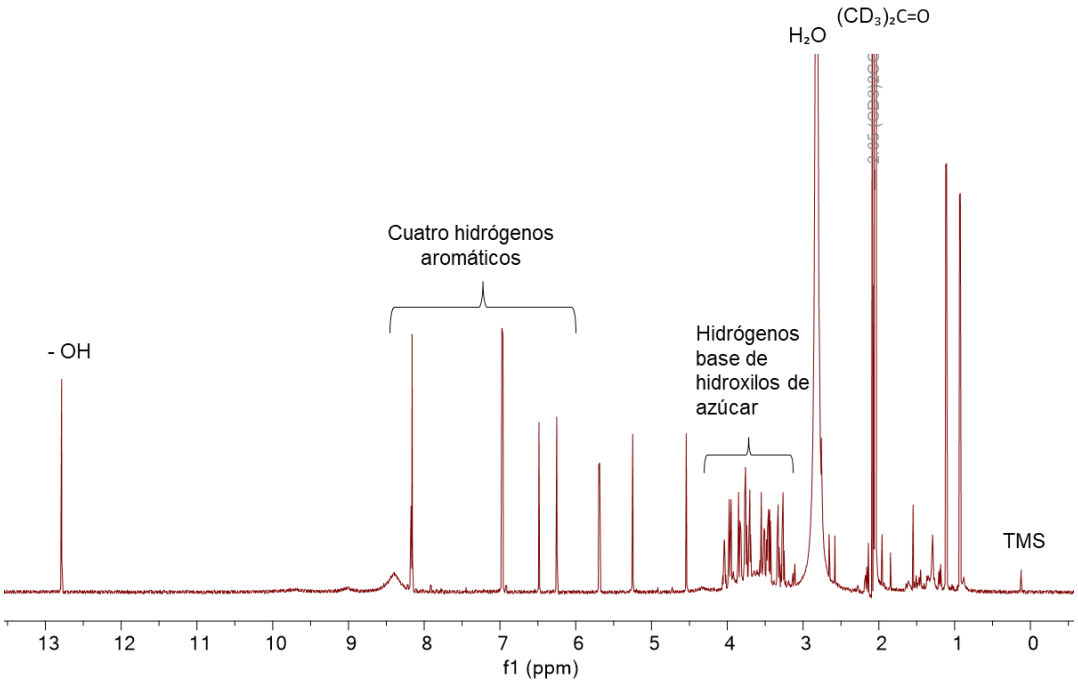


Figura 34. Espectro de RMN-^{1}H (700 MHz, acetona-d_6) del compuesto QII.

En el mismo sentido, una expansión de la zona de 8.5 a 6.0 ppm del espectro de RMN-^{1}H (Figura 35), indica dos hidrógenos aromáticos a 6.25 y 6.48 ppm, ambos exhiben un acoplamiento *meta* de *J*=2.1 Hz en un anillo de benceno

tetrasustituído, con un acoplamiento de un sistema AB, como se muestra en la Figura 35. También, en esta misma zona de hidrógenos aromáticos se observa una señal doble a 6.97 ppm y otra señal doble a 8.18 ppm, estas dos señales presentan un acoplamiento *orto* de *J*= 8.9 Hz y la integración de las señales de cuatro protones indican la presencia de un compuesto aromático para sustituido.

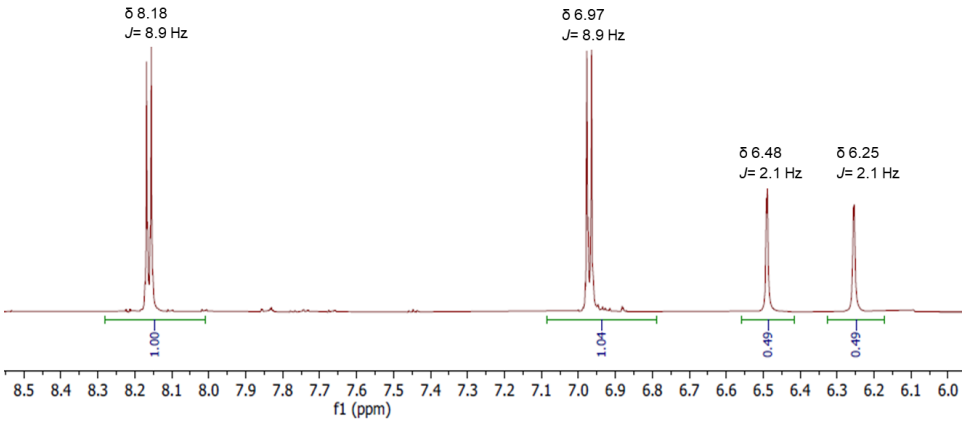


Figura 35. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QII, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos

Los patrones de acoplamiento de los hidrógenos aromáticos mencionados anteriormente (Figura 35) fueron confirmados mediante su espectro bidimensional ^{1}H (COSY), los cuales se muestran en la Figura 36. En este espectro se observa que los hidrógenos 6.25 (H6) y 6.48 (H8) ppm, se encuentran acoplados, así como los hidrógenos localizados en 6.97 (H2´) y 8.18 (H3´) ppm, también están acoplados.

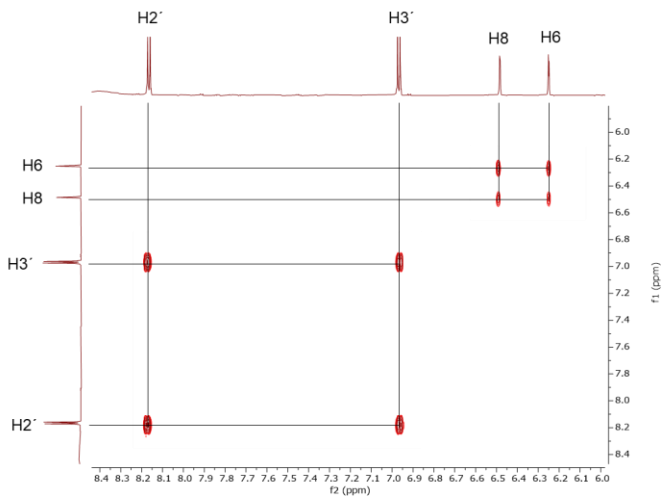


Figura 36. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QII.

Por otro lado, una expansión del espectro de RMN-^{13}C entre 185 y 90 ppm como se muestra en la Figura 37, se observaron señales para 13 carbonos, de las cuales las señales con desplazamientos químicos en 132.0 ppm y en 115.9 ppm coincidieron para dos carbonos por simetría molecular del anillo B, sumando los 15 carbonos de una aglicona que podrían asociarse a la estructura de un flavonoide. Mismo que puede ser demostrado por la presencia de una señal en 178.9 ppm característico de un grupo carbonilo de cetona (C=O) de una flavona, tal y como fue explicado en la identificación del compuesto QI.

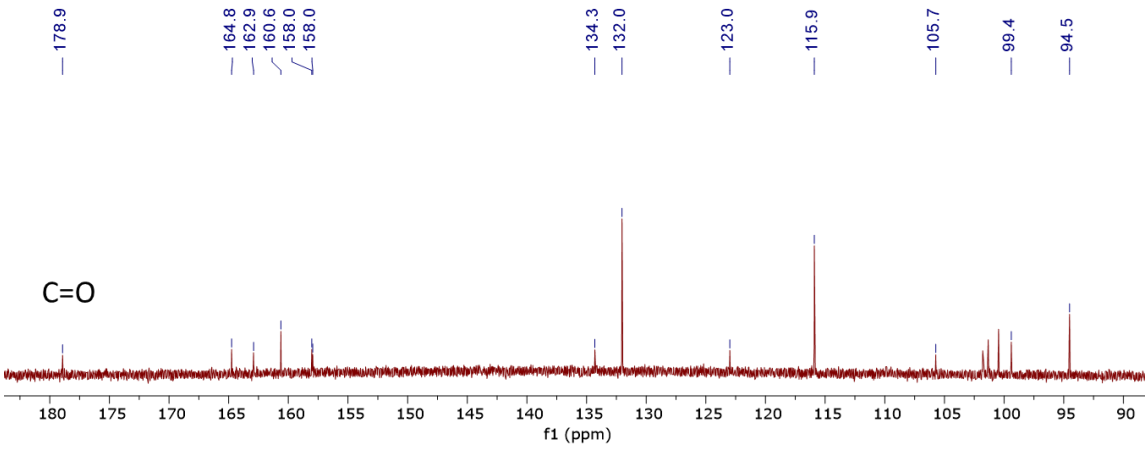


Figura 37. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C del derivado QII, mostrando la zona de carbonos aromáticos

Tomando como base los datos de los espectros de RMN-^{1}H y de ^{13}C del derivado QII, hasta el momento es posible indicar que contiene dos grupos hidroxilo libres y dos carbonos a los que están conectados las moléculas de azúcar. La numeración de anillos con posibles patrones de acoplamiento y con posible sustitución glicosídica que se ajustan con la estructura de la aglicona de un kaempferol se observa en la Figura 38.

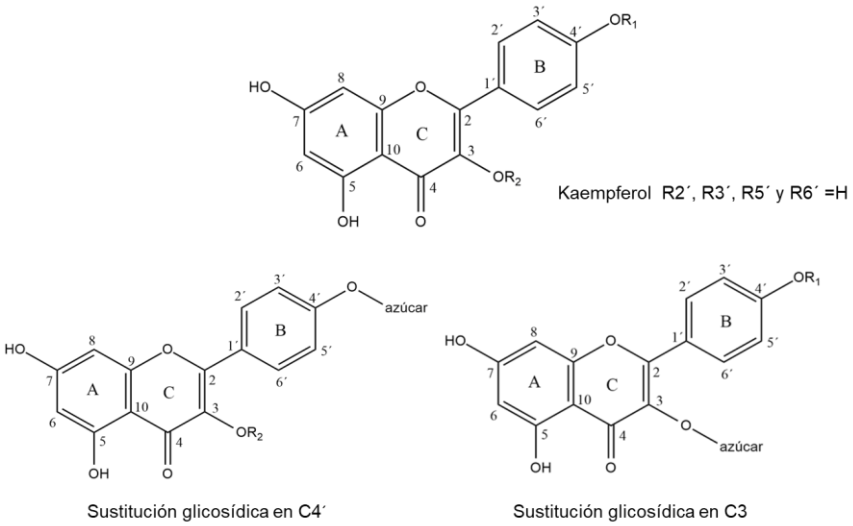


Figura 38. Posible estructura de la aglicona y de sustitución glicosídica presente en el derivado QII, aislado de quinoa.

Un análisis de las correlaciones a tres enlaces por HMBC (Figura 39) de los carbonos C4´y C3 con un hidrógeno anomérico permitió deducir que el residuo de azúcar está conectado con el carbono en la posición C3 del anillo C de su aglicona. Es así como se descarta la posibilidad de una sustitución glicosídica en el carbono C4´.

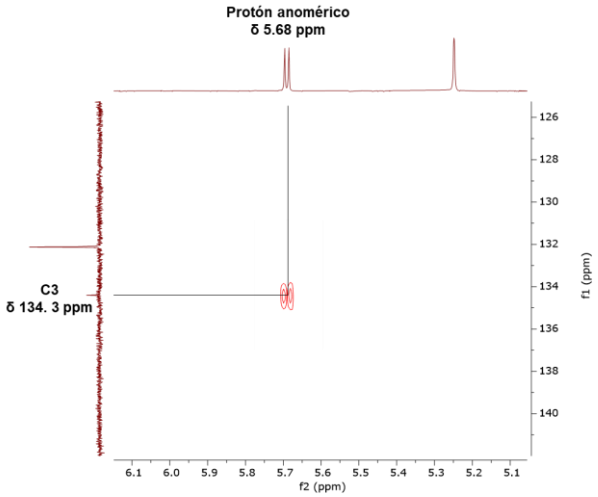


Figura 39. Expansión del espectro HMBC mostrando la conexión del C3 de la aglicona del Kaempferol y el protón de un azúcar presente en QII.

Asignación de los desplazamientos químicos de RMN del derivado QII

Una vez establecida la estructura molecular de la aglicona del derivado QII como kaempferol, se continuó con la asignación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y de ^{13}C (Cuadro 6), además de los experimentos bidimensionales heteronucleares de HMBC y HSQC y homonucleares COSY. La conformación estructural definida de un sistema flavonoide de kaempferol de QII se muestra en la Figura 38, la cual fue el punto de partida para la interpretación de los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C. En la expansión del espectro HSQC (Figura 40A) se muestran las correlaciones a un enlace entre el carbono C6 y el protón H6 a 6.25 ppm, así como este protón muestra varias correlaciones importantes a dos enlaces con el carbono base de hidroxilo C7 a 164.7 ppm y a tres enlaces con el carbono C8 a 94.5 ppm (Figura 40B). Consecutivamente, el carbono C8 muestra una correlación a un enlace en la expansión de su espectro HSQC con el hidrógeno H8 a 6.48 ppm, igualmente este último hidrógeno indica una correlación a dos enlaces con el carbono C9 a 160.6 ppm (Figura 40B)

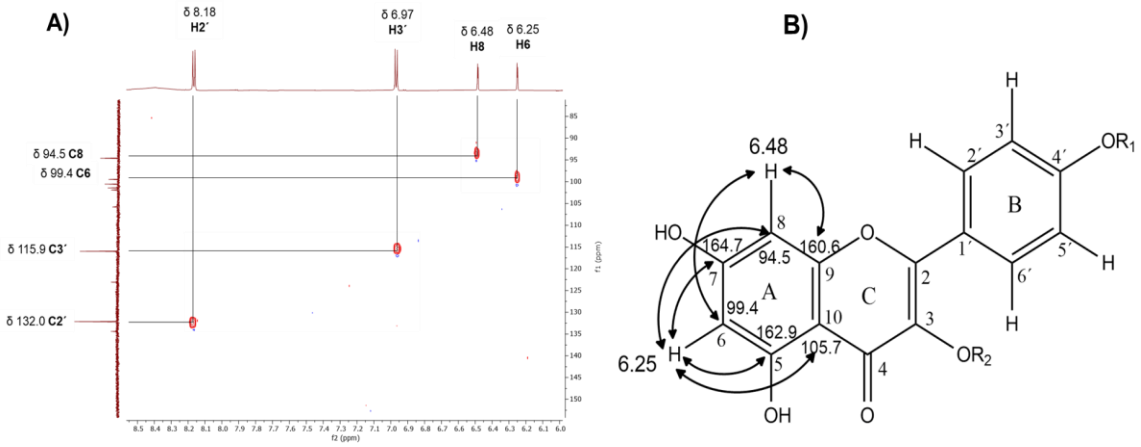


Figura 40. Expansión del espectro HSQC (Figura izquierda) que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A de la aglicona y diagrama de correlaciones HSQC y HMBC (Figura derecha) presente en el derivado QII.

Continuando con el análisis, en la Figura 41 se observa la asignación de desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C del anillo B en una expansión del espectro HMBC, en el cual se muestra una señal doble en 6.97 (H3´) ppm de constante de acoplamiento *J*= 8.9 Hz, misma que mostró correlación con los carbonos C2´ a 132.0 ppm, C4´ a 158.0 ppm y C5´ a 115.9 ppm. Una señal doble de hidrógeno a 8.18 ppm (*J*= 8.9 Hz) muestra una correlación a dos enlaces con el carbono C1´ a 123.0 ppm y a tres enlaces con el carbono C2 a 157.9 ppm.

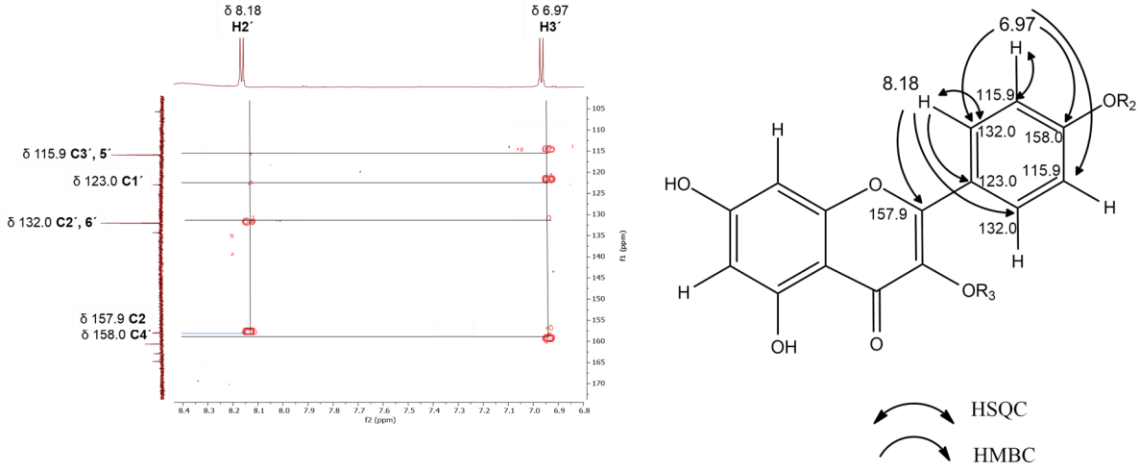


Figura 41. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QII, aislado de quinoa.

Finalmente, no es clara la asignación de la resonancia en C4´, pero al comparar datos de RMN-^{13}C en glicósidos de Kaempferol, al C4´ se asignó un desplazamiento químico de 158.0 ppm que es muy cercano al dato publicado de 161.3 ppm (Hirose et al., 2010). Además, el grupo hidroxilo de C4´no muestra conexión con un protón anomérico de algún azúcar. En tanto que, otro de los carbonos pendiente de asignar correspondiente a C3 (anillo C), cuyo desplazamiento químico es 134.3 ppm es comparable con el dato publicado para kaempferol glicosilado en C3 en 134.5 ppm (Hirose et al., 2010) y de acuerdo con su correlación a tres enlaces en el espectro HMBC se observa conexión con el

hidrógeno anomérico en 5.68 ppm, ver Figura 39, quedando asignados de esta manera los carbonos C4´y C3.

Por otro lado, en su espectro HSQC (Figura 42), también se observan las asignaciones a un enlace entre las señales a 6.97 y 8.18 ppm con los carbonos en posición *orto* C3´ a 115.9 ppm y C2´ a 132.0 ppm, respectivamente, y estos a su vez fueron asignados a los carbonos C5´y C6´ respectivamente por simetría molecular del anillo B. Por tanto, quedan asignados los desplazamientos químicos del anillo B del kaempferol presente en el derivado QII. En cuanto al anillo C de la aglicona presente en el derivado QII, la señal de resonancia en 178.9 ppm fue asignada al carbono C4 perteneciente al grupo carbonilo (C=O). Por otro lado, la señal de resonancia a 157.9 ppm muestra correlaciones a dos enlaces con la señal a 8.18 ppm del protón H2´ del anillo B, es así como esta señal se asignó al carbono C2. Las correlaciones a dos y tres enlaces deducidos de su espectro HMBC de la aglicona de QII se muestra en la Figura 42.

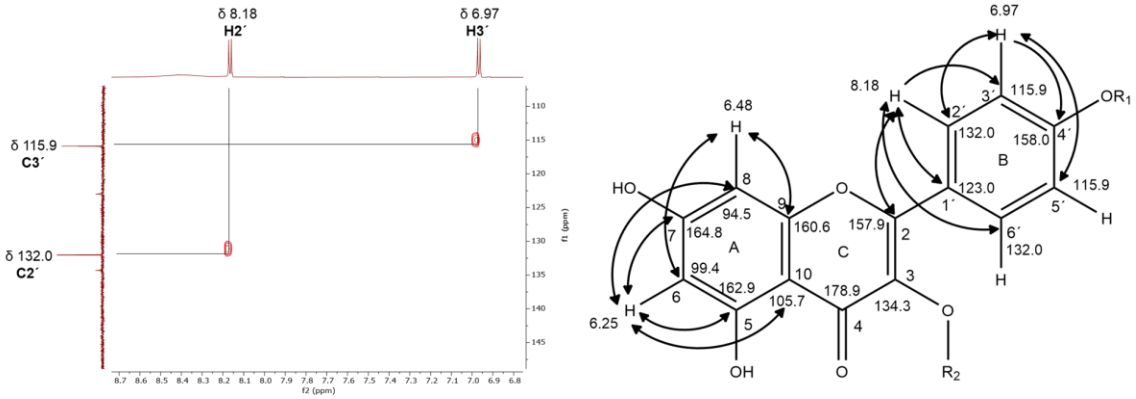


Figura 42. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos del anillo B y resumen gráfico de las correlaciones tipo HMBC de la aglicona presente en el derivado QII.

Las asignaciones de los espectros RMN de ^{1}H y de ^{13}C del derivado QII y algunas correlaciones de los espectros HMBC y COSY se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y de ^{13}C y correlaciones HMBC y COSY para la aglicona de QII en acetona-d_6

Átomo	d(^{1}H)	d(^{13}C)	HMBC	COSY
2		157.9	2', 6´	
3		134.3		
4		178.9		
5		162.9	OH, 6,	
6	6.25 d	99.4	OH	8
7		164.7	8,	
8	6.48 d	94.5	6,	6
9		160.6	8,	
10		105.7	6, OH, 8,	
1'		123.0	2'	
2'	8.18 d	132.0	3´	2'
3'	6.97 d	115.9	2'	3´
4'		158.0		
5'	6.97 d	115.9	3'	2'
6'	8.18 dd	132.0	2', 5'	3´

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C del derivado QII (Figura 43), se observó un grupo de señales en la zona de 77 a 66 ppm y de 18.5 a 17 ppm, el cual se asoció a la presencia de monosacáridos (Dini et al., 2004), y a la vez permite deducir que el derivado QII contiene tres moléculas de azúcares.

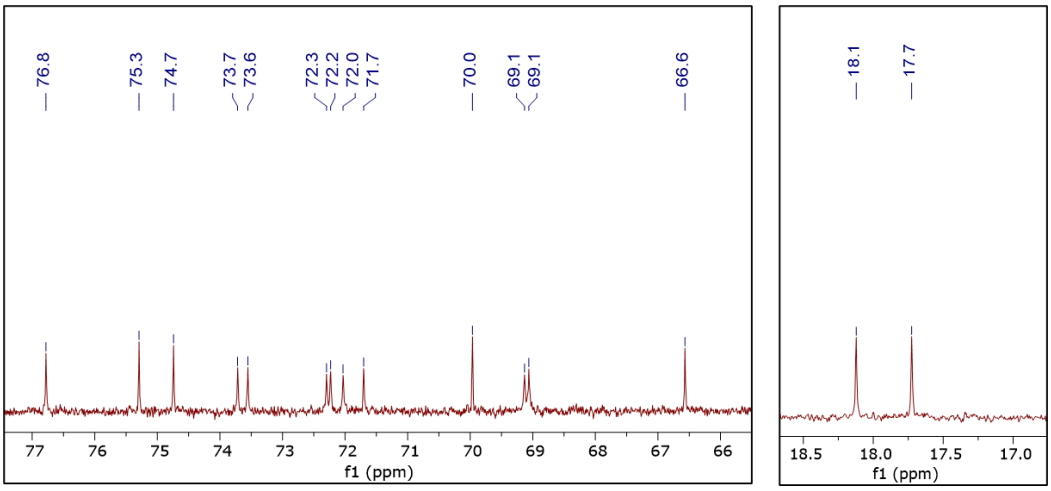


Figura 43. Expansión del espectro de RMN de ^{13}C, mostrando señales importantes de azúcares presentes en el derivado QII

Establecimiento de la conectividad y tipos de azúcares presentes en el derivado QII

De acuerdo con el análisis de la estructura de QII, este compuesto contiene un anillo de aglicona asignado como kaempferol con sustituyentes de azúcar en la posición C3. La presencia de tres hidrógenos anoméricos como indica la expansión del espectro HSQC (Figura 44) confirma la existencia de tres moléculas de azúcar.

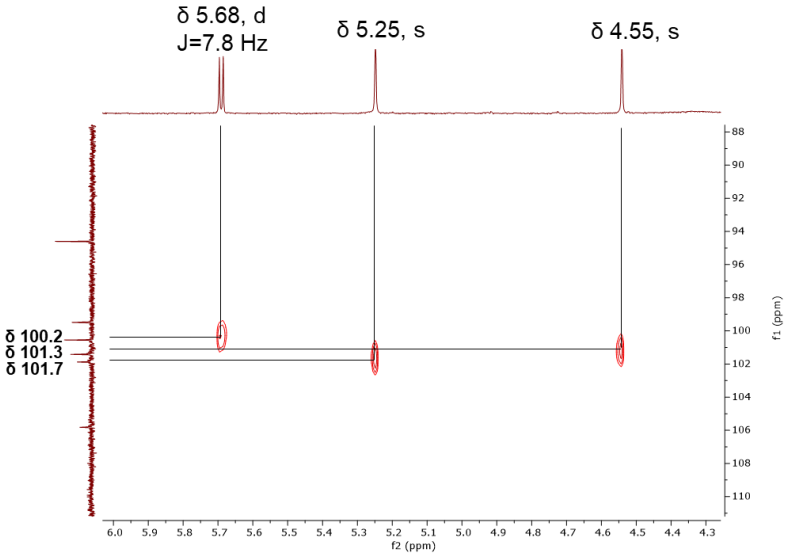


Figura 44. Expansión del espectro bidimensional HSQC de hidrógenos anoméricos de azúcares presentes en el derivado QII.

Para establecer la composición de los tres azúcares interconectados en el derivado QII, se asignó la señal a 66.6 ppm a un grupo metileno (-CH_2-), así como las señales dobles a 1.12 y a 0.94 ppm, que integran para tres hidrógenos cada una, fueron asignadas a dos grupos metilo (Figura 45).

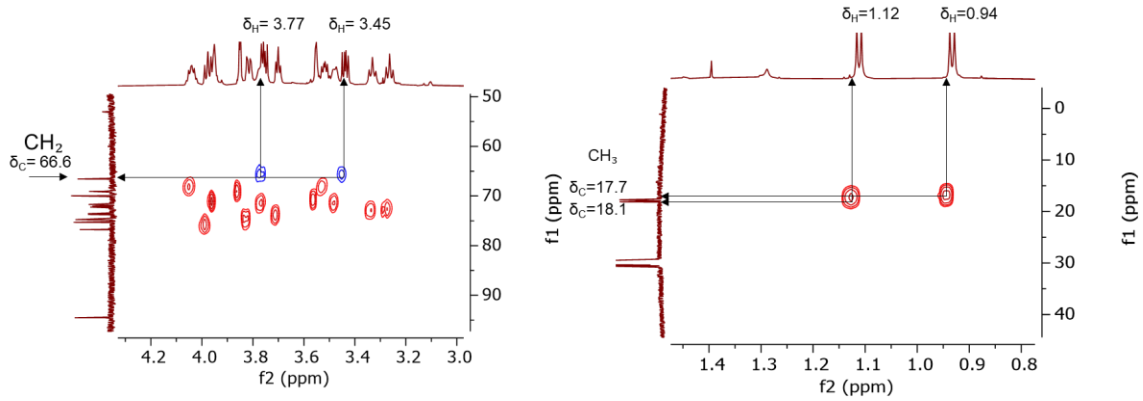


Figura 45. Expansión del espectro bidimensional HSQC de la zona de metilos y de azúcares presentes en el derivado QII.

Tomando como base la asignación de monosacáridos para el derivado QI en la sección anterior, se puede deducir que el grupo metileno se asocia con una galactosa y los grupos metilo con dos ramnosas. Además, esta deducción fue validada con los desplazamientos químicos publicados previamente para este tipo de azúcares. De igual manera, es importante mencionar que los hidrógenos anoméricos a 5.25 y 4.55 ppm, no muestran correlación a tres enlaces con ningún carbono del kaempferol. Por tanto, se deduce que los tres residuos de azúcares deben estar interconectados en el carbono C3 de la aglicona de QII.

Para establecer el modelo de estructura del derivado QII y su conexión con un residuo de azúcar, se inicia con la correlación a tres enlaces del hidrógeno anomérico a 5.68 ppm con el carbono C3 en su espectro HMBC, la cual se indicó en la Figura 39. Este hidrógeno anomérico muestra una correlación en su espectro COSY con la señal a 3.99 ppm asignada al hidrógeno sobre el carbono C2´´. Asimismo, el carbono C2´´ le corresponde un desplazamiento a 76.8 ppm de acuerdo con su espectro HSQC, y este a su vez muestra una correlación a tres enlaces con el hidrógeno anomérico a 5.25 ppm. Estas correlaciones se muestran en el resumen gráfico de correlaciones tipo HMBC y COSY insertado en la Figura 46. De esta manera, queda asignada la interconexión del segundo

residuo de azúcar. Para establecer la tercera conectividad de azúcares, se identificó una correlación a tres enlaces del grupo metileno a 66.6 ppm con el hidrógeno anomérico localizado en 4.55 ppm de otro residuo de azúcar. Las correlaciones mencionadas se muestran en la expansión del espectro HMBC (Figura 46). La asignación completa de los residuos de azúcares fue establecida mediante los espectros HSQC y HMBC a dos y tres enlaces, respectivamente. Con base en estos resultados, se determinó la estructura del compuesto QII como kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa, el cual ha sido previamente identificado en extractos polares de semillas de quinoa de origen Japonés (Hirose et al., 2010).

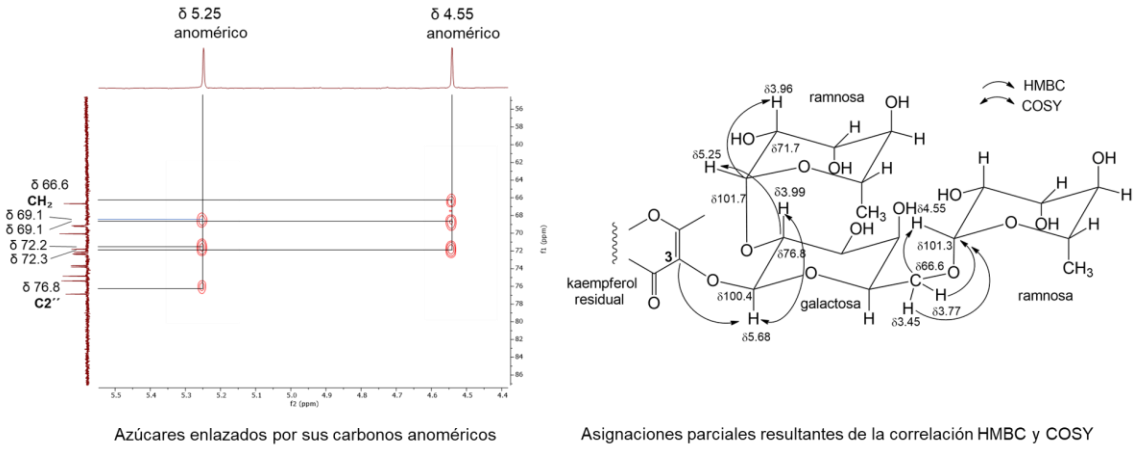


Figura 46. Asignaciones parciales de las correlaciones HMBC y COSY y expansión del espectro HMBC mostrando tres azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos de QII.

Tomando como base la información analizada para el derivado QII, se propone la estructura molecular de este compuesto, la cual se muestra en la Figura 47.

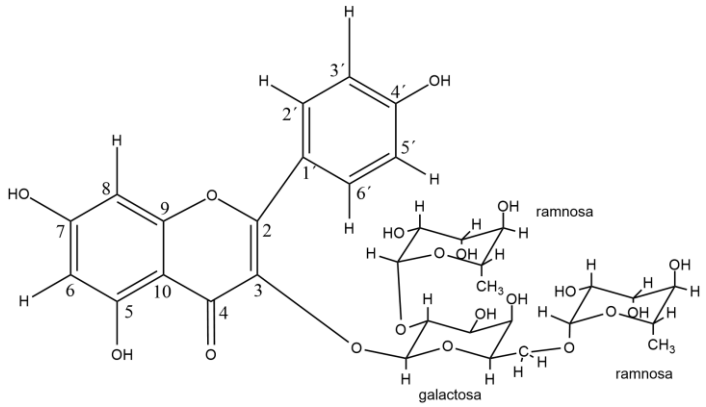


Figura 47. Estructura molecular propuesta para el derivado QII aislado de semillas de quinoa.

El Kaempferol es el segundo flavonoide más abundante en las semillas de quinoa con concentraciones desde 0.25 hasta 542 mg kg^{-1} (Tang & Tsao, 2017), no obstante, los alimentos como las espinacas, eneldo y col también concentran cantidades importantes para la dieta diaria (entre 40 y 50 mg $100g^{-1}$) (Dabeek & Marra, 2019). El Kaempferol, además de ser un potente inhibidor de radicales libres, está asociado con efectos antiinflamatorios y cardioprotectores (Dabeek & Marra, 2019), y ejerce actividades antitumorales, anticancerígenas y antibacterianas (Lin et al., 2019). Por otro lado, Balakrishnan & Schneider (2020) demostraron que los derivados de kaempferol, aislados de semillas de quinoa, presentan una baja degradación durante el paso gastrointestinal permitiendo una mayor biodisponibilidad de absorción. Bajo este contexto, las semillas de quinoa son fuentes importantes del compuesto kaempferol que las convierte en alternativas alimentarias potenciales para la dieta.

4.4.3. Elucidación estructural del compuesto QIII

El compuesto QIII obtenido de la fracción 6:4 del extracto hidroetanólico fue el resultado de sucesivas recirculaciones en el sistema de RP-HPLC, tal cual como fueron obtenidos QI y QII. Se aisló un sólido de color amarillo claro y fue soluble en agua, metanol, acetona, y acetonitrilo. En este caso, el análisis de masas

identificó un ion molecular de 615 m/z $[M+H]^+$ que se asoció a la fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ equivalente a la masa molecular calculada de 610.5. Dado que los azúcares son compuesto altamente higroscópicos, debido a la presencia en su estructura de grupos funcionales hidroxilo (OH), pueden protonarse en la matriz ácida (2,5-Dihydroxybenzoic) utilizada para la adquisición de los espectros por MALDI-TOF. Por tanto, la obtención de la masa experimental y calculada del compuesto aislado podría variar.

Para la asignación de los desplazamientos químicos del derivado QIII, se consideró el mismo procedimiento de análisis que se utilizó para la elucidación del derivado QI. El espectro de RMN de ^1H de QIII mostrado en el Figura 48, indica un conjunto de señales entre 8.0 y 6.0 ppm que fueron asignadas a cinco hidrógenos de tipo aromático. Mientras que, en la zona entre 4.0 y 3.2 ppm se observan un grupo de señales que, según su desplazamiento químico, están asociadas a hidrógenos base de oxígeno de grupo hidroxilo de azúcares.

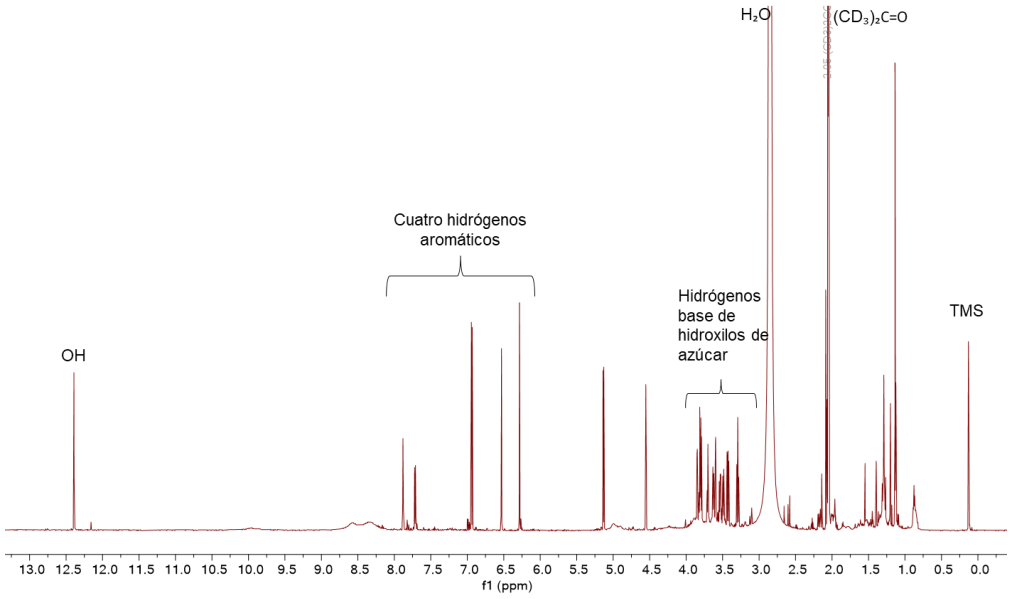


Figura 48. Espectro de RMN-^1H (700 MHz, acetona-d_6) del compuesto QIII.

En la expansión de la zona entre 8.0 y 6.0 ppm del espectro de RMN de ^{1}H (Figura 49), se observan dos señales dobles a 6.55 y 6.30 ppm. Estas señales tienen un acoplamiento meta de *J*=2.1 Hz en un anillo de benceno tetrasustituído. Asimismo, en esta zona se observa una señal doble (d) a 6.95 ppm con un acoplamiento *J*=8.5 Hz y otra señal a 7.73 ppm como doble de doble de doble (ddd) exhibiendo constantes de acoplamiento *J*= 8.5, 2.3, 1.2 Hz. Por último, se observa una señal a 7.89 ppm como doble de triple (dt) con un acoplamiento de J= 2.3 y 1.2 Hz. Las tres últimas señales muestran un patrón de acoplamiento similar al derivado QI que corresponde a otro anillo de benceno trisustituído.

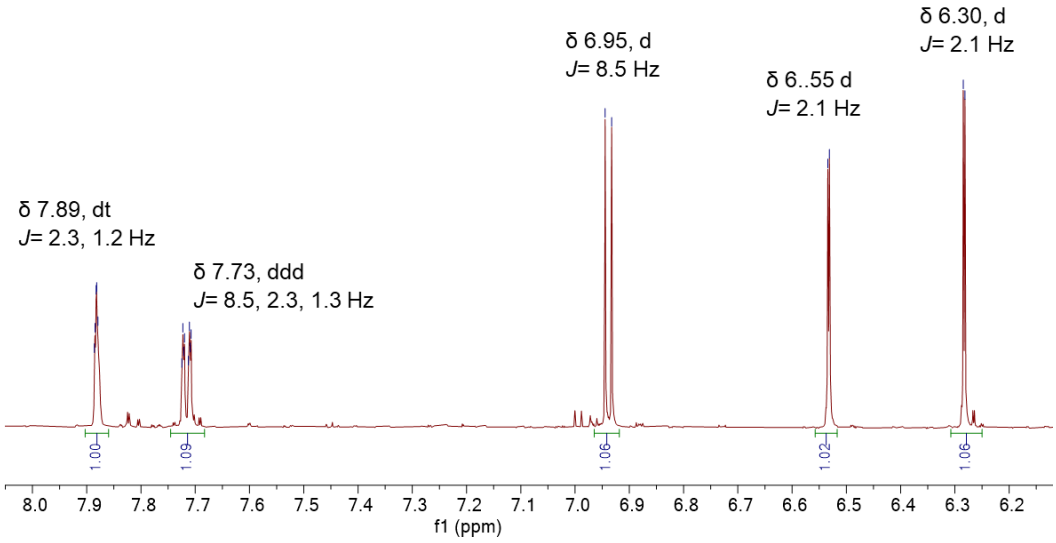


Figura 49. Expansión del espectro de RMN de ^{1}H del derivado QIII, mostrando la zona de hidrógenos aromáticos

Para confirmar los acoplamientos de los hidrógenos aromáticos de QIII, en la expansión de la zona de 8.2 a 5.9 ppm del espectro bidimensional COSY (Figura 50) se observa el patrón de acoplamiento de estos hidrógenos. En este espectro, se muestra que los hidrógenos H6 (6.30 ppm) y H8 (6.55 ppm) están acoplados, así como los hidrógenos H5´ (6.95 ppm) y H6´ (7.73 ppm). Este último protón, a su vez tiene una correlación meta con el protón H2´ (7.89 ppm).

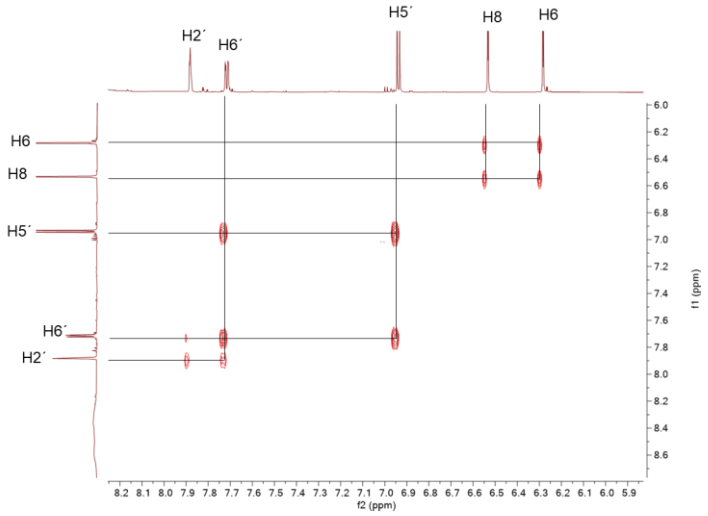


Figura 50. Expansión del espectro COSY donde se muestran los acoplamientos entre los protones aromáticos presentes en el derivado QIII.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C que se muestran en la Figura 51, se observan señales para 15 carbonos que son asociados a la estructura de un flavonoide, confirmado por la presencia de una resonancia en 179.2 ppm característico de un grupo carbonilo de cetona (C=O). Estas señales observadas son asociadas a la estructura de una quercetina, tal como se justificó en la sección anterior para el derivado QI.

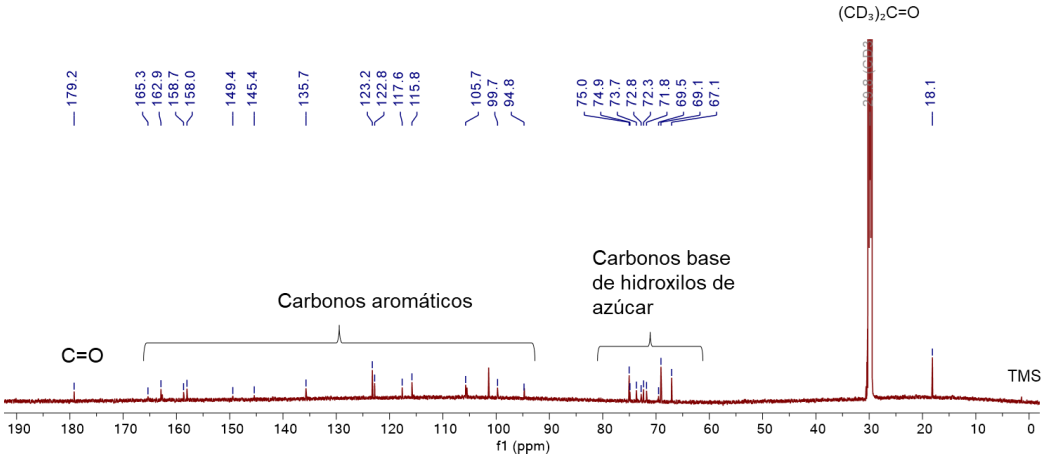


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado QIII, mostrando la zona de carbonos aromáticos y la zona de carbonos base de hidroxilos de azúcares.

Asignación de los desplazamientos químicos de RMN del derivado QIII

Una vez conocida la estructura molecular de la aglicona del derivado QIII como quercetina, se continuó la asignación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y de ^{13}C con apoyo de los experimentos bidimensionales heteronucleares HMBC y HSQC, y el homonuclear COSY. La asignación de señales para el anillo A se inició a partir de la resonancia en 6.30 ppm correspondiente al protón H6, mismo que muestra correlaciones observables en la expansión del espectro HMBC (Figura 52) a dos enlaces con los carbonos C5 a 162.9 ppm y C7 a 165.3 ppm y a tres enlaces con los carbonos C8 y C10 a 94.7 ppm y a 105. 7 ppm, respectivamente. A la vez, el protón H8 en 6.55 ppm muestra una correlación a dos enlaces con el carbono C9 a 158.0 ppm.

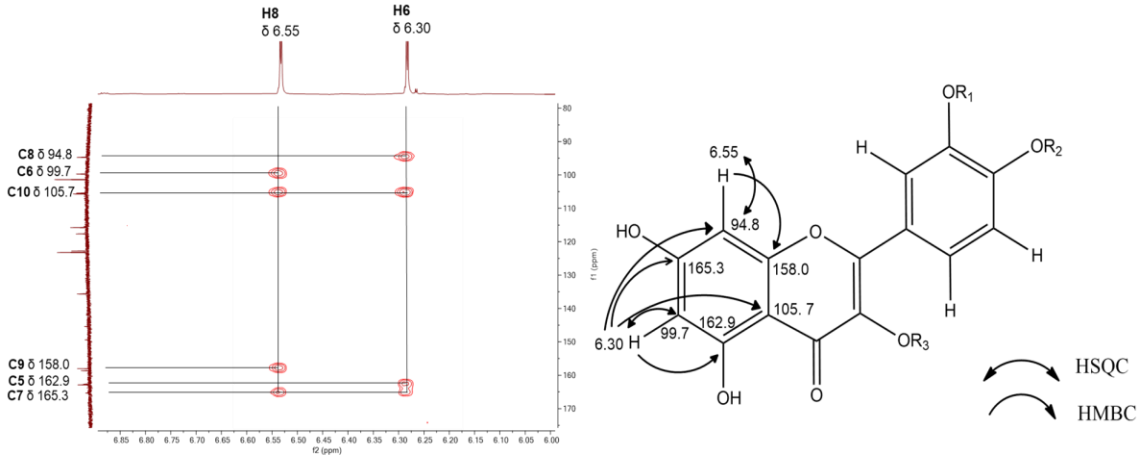


Figura 52. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones en el anillo A de la aglicona presente en el derivado QIII, aislado de quinoa.

En la expansión del espectro HSQC (Figura 53), se observan correlaciones a un enlace de los carbonos C6 y C8 con los protones H6 a 6.30 ppm y H8 a 6.55 ppm, respectivamente.

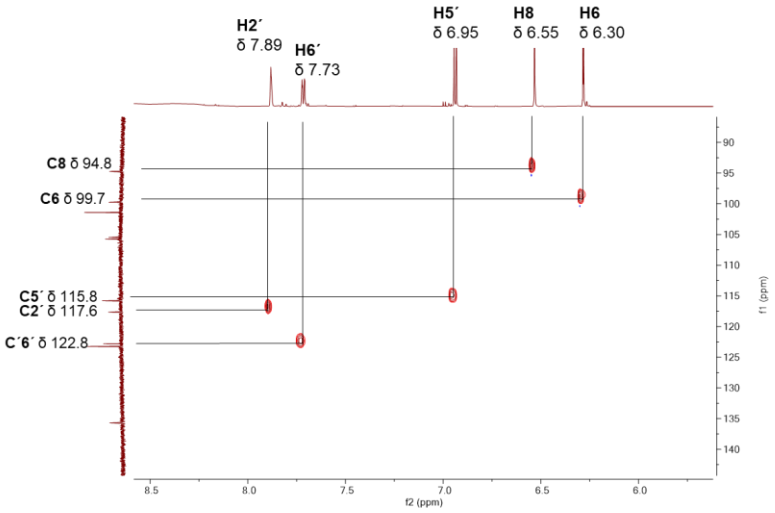


Figura 53. Expansión del espectro HSQC que muestra correlaciones a un enlace de los protones aromáticos presentes en el anillo A y B de la aglicona presente en el derivado QIII.

Continuando con la asignación de desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C del anillo B (Figura 54), se inicia con la señal doble en 6.95 ppm de constante de acoplamiento *J*= 8.5 Hz (correspondiente a la señal de C5´a 115.8 ppm en su espectro HSQC Figura 53), que mostró correlaciones a dos enlaces con los carbonos C3´(145.4 ppm), C4´(149.4 ppm) y C6´ (122.8 ppm). Asimismo, la señal a 7.89 ppm de constante de acoplamiento *J*= 8.5, 2.3, 1.1 Hz muestra correlación a un enlace con el carbono C2´ a 117.6 ppm en su espectro HSQC (Figura 53). Y a su vez, esta señal de protón observa correlaciones con los desplazamientos 145.4, 123.2, 122.8, y 158.7 ppm asignados a los carbonos C3´, C1´, C6´, y C2, respectivamente. De esta manera quedan asignados los desplazamientos químicos del anillo B de la aglicona del derivado QIII.

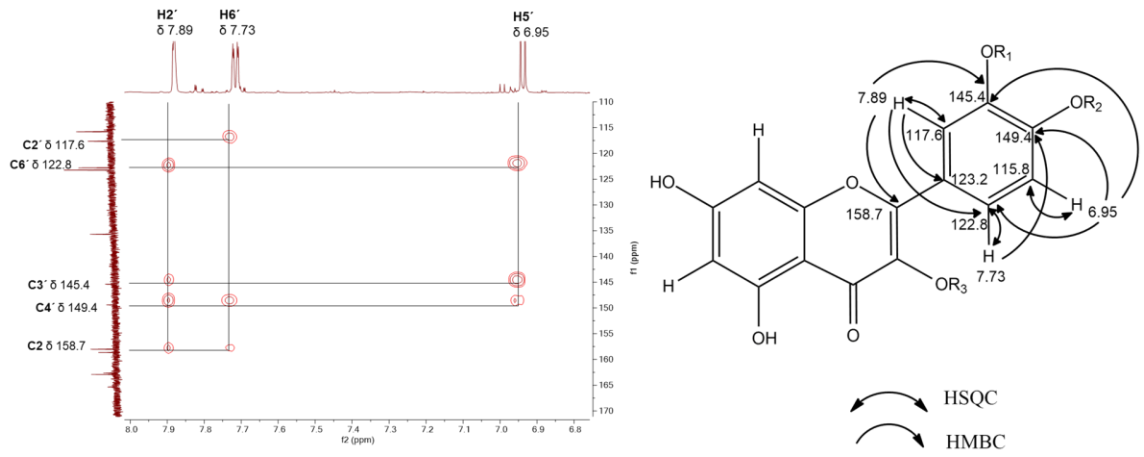
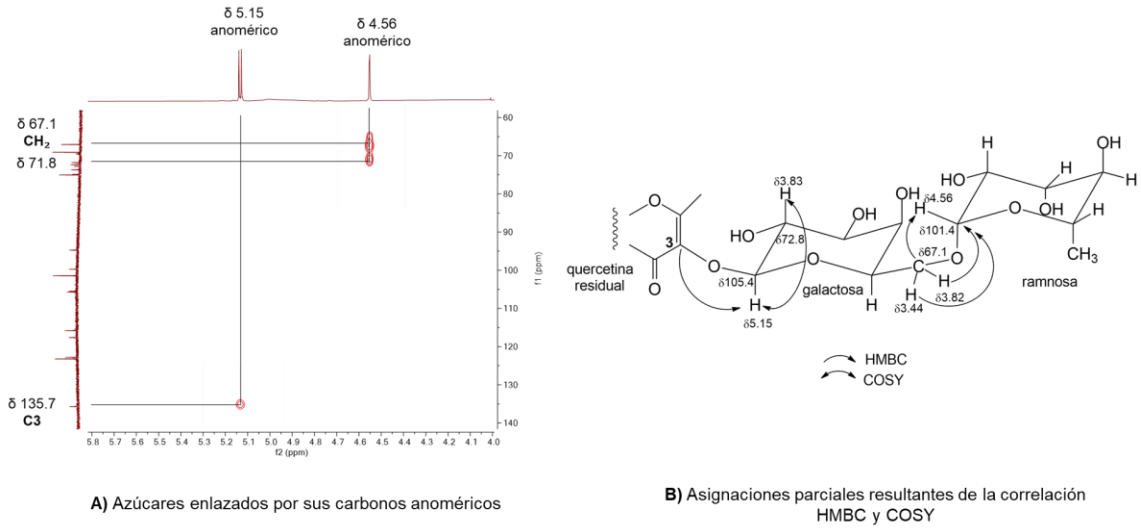


Figura 54. Expansión del espectro HMBC que muestra correlaciones de los carbonos e hidrógenos aromáticos presentes en el anillo B de la aglicona presente en el derivado QIII, aislado de quinoa.

Por último, la asignación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C de los tres carbonos del anillo C de la aglicona del derivado QIII, se inició con el desplazamiento a 179.2 ppm, el cual fue asignado al carbono C4 característico del grupo carbonilo (C=O). De igual manera, la señal a 158.7 ppm muestra una correlación en su espectro HMBC (Figura 54) con la señal a 7.89 y 7.73 ppm correspondiente a los protones H2´ y H6´del anillo B, la cual fue asignada al carbono C2. Finalmente, la señal a 135.7 ppm que no muestra acoplamiento con protones de los anillos A ni el B, fue asignado al carbono C3.

Tomando como base estos resultados y la información analizada para el derivado QI en la sección anterior, se pudo deducir que el derivado QIII muestra un anillo de aglicona asignado como quercetina con un sitio de glicosilación, por lo tanto, dos grupos de azúcar están conectadas en forma lineal. Esto fue evidenciado en el espectro HMBC (Figura 55) donde se muestra la presencia de dos hidrógenos anoméricos de azúcar y sus interconexiones.



A) Azúcares enlazados por sus carbonos anoméricos

B) Asignaciones parciales resultantes de la correlación HMBC y COSY

Figura 55. Expansión del espectro HMBC (A) mostrando correlaciones con el carbono C3 y con el CH_2 y el anomérico de otro azúcar y asignaciones parciales de las correlaciones HMBC y COSY (B) de QIII.

En dicha expansión se deduce que el derivado QIII contiene dos azúcares, de las cuales el hidrógeno anomérico de azúcar a 5.15 ppm esta correlacionada a tres enlaces con la señal a 135.7 ppm, asignado al carbono C3. Mientras que, el hidrógeno anomérico de azúcar localizado a 4.56 ppm indica una conexión lineal con la resonancia del grupo metileno ($-CH_2$) a 67.1 ppm. La estructura molecular completa del derivado QIII, se muestra en la Figura 56.

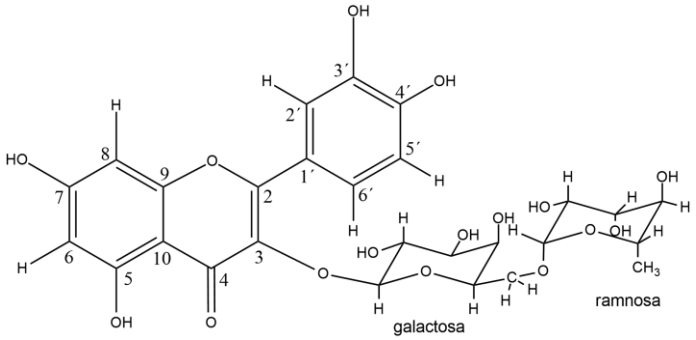


Figura 56. Estructura molecular propuesta para el derivado QIII aislado de semillas de quinoa.

Los experimentos bidimensionales HMBC, HSQC, y COSY permitieron completar las interconexiones a dos y tres enlaces entre carbonos e hidrógenos de azúcares contenidos en el derivado QIII. Finalmente se estableció al derivado QIII como una quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa **(3)**. Es importante mencionar, que el derivado QIII es un nuevo producto natural. Los desplazamientos químicos de la estructura molecular de la aglicona del derivado QIII se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H y ^{13}C y correlaciones HBC y COSY para la aglicona de QIII en acetona-d_6.

Átomo	d(^{1}H)	d(^{13}C)	HMBC	COSY
2		158.7	2', 6´	
3		135.7	Protón anomérico	
4		179.2		
5		162.9	OH, 6,	
6	6.30 d	99.7	8	8
7		165.3	8,	
8	6.55 d	94.8	6,	6
9		158.0	8,	
10		105.7	6, OH, 8,	
1'		123.2	2'	
2'	7.89 dt	117.6	6´	6'
3'		145.4	2' 5´	
4'		149.4	OH	
5'	6.95 d	115.8	3' 6´	6'
6'	7.73 ddd	122.8	2', 5'	5´, 2´

La quercetina se caracteriza por la capacidad de capturar radicales libres que provocan reacciones de oxidación en cadena, las cuales inducen daños a moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Soobrattee et al., 2005). La actividad antioxidante de la quercetina juega un rol importante en la prevención de padecimientos a causa de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer, entre otras más (Lin et al., 2019). Estas propiedades biológicas acreditan a la quercetina y sus derivados como agentes nutracéuticos (Das et al., 2012). Las fuentes mayoritarias de quercetina en la forma 3-O-glicósido son principalmente en cebollas, manzanas, té y vino tinto (Dabeek & Marra, 2019).

4.5. Conclusiones

Se estudió a las semillas de quinoa cultivada en los Andes del Ecuador, de las cuales se aislaron tres flavonoides, dos denominados como quercetina 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa **(1)**, y kaempferol 3-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa, **(2)** identificados previamente y uno nuevo conocido como quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa **(3)**. La elucidación estructural de estos compuestos se estableció por resonancia magnética nuclear con los experimentos de correlación homonucleares y heteronucleares, además de la comparación de sus datos con los publicados para compuestos similares.

4.6. Literatura citada

Balakrishnan, G., & Schneider, R. G. (2020). Quinoa flavonoids and their bioaccessibility during in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Cereal Science*, *95*(May). https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103070

Dabeek, W. M., & Marra, M. V. (2019). Dietary quercetin and kaempferol: bioavailability in humans. *Nutrients*, *11*, 2288.

Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(2), 173–183. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4

Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2004). Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chemistry*, *84*(2), 163–168. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00185-7

Graf, B. L., Rojas-Silva, P., Rojo, L. E., Delatorre-Herrera, J., Baldeón, M. E., & Raskin, I. (2015). Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(4), 431–445. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12135

Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, *2*(3), 27. https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556

Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T., & Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of Chenopodium quinoa seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*, *119*(4), 1300–1306.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.008

Lee, S., Lee, J., Lee, H., & Sung, J. (2019). Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(11), 1–9. https://doi.org/10.1111/jfbc.13002

Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019). Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. *Molecules*, *24*(13). https://doi.org/10.3390/molecules24132512

Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology*, *137*(February), 111178. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111178

Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (Chenopodium quinoa Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, *111*(July 2017), 38–46. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006

Pelter, A.; Ward, R.S.; Gray, T.I (1976). The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Flavonoids and Related Compounds. *Journal Chemical Society*, Perkin I, 23, 2475-2483

Pereira, E., Cadavez, V., Barros, L., Encina-Zelada, C., Stojković, D., Sokovic, M., … Ferreira, I. C. F. R. (2020). Chenopodium quinoa Willd. (quinoa) grains: A good source of phenolic compounds. *Food Research International*, *137*(May), 109574. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109574

Shridhar G et al., 2015. (2015). Modern Diet and its Impact on Human Health. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, *05*(06), 1–4. https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000430

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *579*(1–2), 200–213. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023

Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P. X., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterisation of phenolics , betanins and antioxidant activities in seeds of three Chenopodium quinoa Willd . genotypes. *Food Chemistry*, *166*, 380–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018

Tang, Y., & Tsao, R. (2017). Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a

review. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(7), 1–16. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600767

Usvalampi, A., Maaheimo, H., Tossavainen, O., & Frey, A. D. (2018). Enzymatic synthesis of fucose-containing galacto-oligosaccharides using β-galactosidase and identification of novel disaccharide structures. *Glycoconjugate Journal*, *35*(1), 31–40. https://doi.org/10.1007/s10719-017-9794-3

Wu, N., Chen, S., Ye, X., Li, G., Yin, L., & Xue, C. (2014). Identification of fucans from four species of sea cucumber by high temperature 1H NMR. *Journal of Ocean University of China*, *13*(5), 871–876. https://doi.org/10.1007/s11802-014-2287-0

Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(9), 1874–1905. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400

5. CONCLUSIONES GENERALES

La quinoa blanca de Ecuador presentó la concentración más alta de proteína (16.5 %), sin embargo, la quinoa blanca cultivada en México presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos y una mayor actividad antioxidante. En las tres colectas estudiadas, se encontró que los aminoácidos libres más abundantes fueron: arginina, ácido glutámico y alanina.

A partir del extracto hidroetanólico de las semillas de quinoa, colectadas en Ecuador, se aislaron e identificaron tres flavonoides, uno conocido como quercetina 3-O-(2´´,6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**1)** y dos nuevos, identificados como: kaempferol 4´-O-(2´´, 6´´-di-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**2**) y quercetina 3-O-(6´´-O-α-ramnopiranosa)-β-galactopiranosa (**3**). La estructura de estos compuestos se determinó comparando sus datos de resonancia magnética nuclear con los publicados para compuestos similares, mientras que, la posición de los azúcares en las agliconas fue establecida mediante los espectros de correlación homonuclear COSY y heteronucleares HMBC y HSQC.