



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE**

TESIS DOCTORAL

**Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de
compuestos bioactivos de maíz morado (*Zea mays* L.) cultivado en
Ecuador**

**(Characterization of germination conditions to favor the identification of phytochemical
compounds, functional properties and antioxidant activity of Andean purple corn seeds
(*Zea mays* L.) in Ecuador)**

DOCTORANDO

Don. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO

DIRECTORES DE TESIS

PROF. DR. ANTÓN RAFAEL GARCÍA MARTÍNEZ

PROF. DR. WILMAN ISMAEL CARRILLO TERÁN

CÓRDOBA, 2022

TITULO: *Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (Zea mays L.) cultivado en Ecuador*

AUTOR: *Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

POSTGRADO EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE

**Condiciones de germinación para potenciar la acumulación
de compuestos bioactivos de maíz morado (*Zea mays* L.)
cultivado en Ecuador**

Tesis presentada por Don. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba (España)

Director

Dr. Antón Rafael
García Martínez

Director

Dr. Willian Ismael
Carrillo Terán



**D. ANTÓN RAFAEL GARCÍA MARTÍNEZ, CATEDRÁTICO DE
UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL DE
LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (Zea mays L.) cultivado en Ecuador*”, que se recoge en la siguiente memoria y de la que es autor Don. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO, ha sido realizada bajo mi dirección, cumpliendo las condiciones exigidas para que el mismo pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Lo que suscribo como director de dicho trabajo y a los efectos oportunos, en Córdoba a 25 de febrero de dos mil veinte y tres.

Fdo. Dr. Antón Rafael García Martínez



UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE AMBATO

**D. WILMAN ISMAEL CARRILLO TERÁN, PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD
TECNICA DE AMBATO /ECUADOR**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada *“Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (Zea mays L.) cultivado en Ecuador”*, que se recoge en la siguiente memoria y de la que es autor Don. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO, ha sido realizada bajo mi dirección, cumpliendo las condiciones exigidas para que el mismo pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Lo que suscribo como director de dicho trabajo y a los efectos oportunos, en Córdoba a 25 de febrero de dos mil veinte y tres.

Fdo. Dr. Wilman Ismael Carrillo Terán



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria
Camino de Vera s/n
46022 Valencia (España)
Telf. 0034 963877540
Fax. 0034 963877549
Email: depagf@upvnet.upv.es

Dr. BORJA VELÁZQUEZ MARTÍ, director del Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICO

que el profesor **EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO** ha realizado una estancia en nuestro departamento en el periodo comprendido entre el 1 de septiembre de 2021 y el 1 de octubre de 2021, centrándose su trabajo en el desarrollo de proyectos asociados a la colaboración en docencia e investigación propiciados por el programa Ventus, ADSIDEO y MERIDIES de la UPV vinculados a la transferencia de tecnología para el desarrollo y sostenibilidad de las poblaciones vulnerables de la Provincia Bolívar de Ecuador.

Para que conste a todos los efectos firmo en Valencia, a 1 de octubre de 2021.

Atentamente





UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Master en Zootecnia y
Gestión Sostenible:
Ganadería ecológica
e integrada



DR. ANTÓN RAFAEL GARCÍA MARTÍNEZ, PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA (ESPAÑA) Y RESPONSABLE DEL GRUPO DE INVESTIGACION EN ECONOMIA Y GESTION DE SISTEMAS AGROALIMENTARIOS

INFORMA:

Que D. Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro con número de cedula/pasaporte 1803015484, Personal e Investigador de la Universidad Estatal de Bolívar (Ecuador), alumno del Programa de Doctorado de Recursos Naturales y Gestión Sostenible de la Universidad de Córdoba, y

Que el dentro de programación de actividades presenciales para el curso académico 2018/2019 ha realizado en la Universidad de Córdoba una estancia de investigación durante el **periodo comprendido entre el 1 al 30 de abril de 2019.**

Que durante su estancia ha desarrollado una labor de investigación en el Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba, profundizando en

Las condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado

En aquellos aspectos relativos a:

- Fraccionamiento de aislados proteicos de maíz morado
- Obtención de polifenoles y antocianinas totales

Asimismo, durante su estancia perfeccionara apartados de la tesis, tales como

- Tabulación de datos y construcción de una base de datos.
- Análisis estadístico.

Lo que hago constar a fin de que surta los efectos oportunos por ambas partes, en Córdoba a 02 de abril de 2019.

Fdo.: Prof. Dr. Antón Rafael García Martínez





TÍTULO DE LA TESIS:

Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (*Zea mays* L.) cultivado en Ecuador

DOCTORANDO: Don. Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

INFORME RAZONADO DEL LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la Tesis el doctorando ha profundizado en la caracterización del maíz púrpura andino en la Zona de la Sierra de Ecuador. En una primera etapa se ha verificado la germinación de esta variedad de maíz en condiciones laborales y en huertos. Por otra parte, se ha profundizado en el conocimiento de las condiciones físico químicas de germinación, su composición final y su valor biológico.

Parámetros, tales como: Total Anthocyanin Content TAC, Protein Solubility PS, Water Absorption Capacity WAC, Oil Absorption Capacity OAC, así como la capacidad antioxidante fueron fundamentales para el desarrollo del presente estudio. Finalmente, como otra fortaleza de la Tesis, se identificaron flavonoles y fenoles ácidos para visualizar posibles alimentos funcionales.

Durante el desarrollo del programa el doctorando ha tenido además un proceso de maduración personal importante. Por una parte, con cargo a fondos concursales, fue capaz de proponer y desarrollar el laboratorio de Química y Biotecnología de la Universidad Estatal de Bolívar. Este proceso fue costoso e ingente ya que además del diseño, la obra civil, etc., se abordó la puesta en marcha y calibración de las diferentes tecnologías. Montar un laboratorio de estas características de la nada hasta su funcionamiento rutinario conlleva una serie de capacidades y habilidades que trascienden al documento académico y muestran el nivel de excelencia alcanzado por el aspirante.

Asimismo, ha adquirido las habilidades y competencias necesarias para poder abordar la problemática del sector desde una perspectiva holística; por una parte, desde la orientación investigadora, con toda su secuencia metodológica y, por otra parte, la aplicada a la resolución de problemas sectoriales de modo solvente.

La Tesis cierra los distintos capítulos con una discusión, donde además se descende al nivel de tecnologías, que se evalúan de modo desagregado y con gran utilidad en el medio. La Tesis no constituye un cierre de la investigación sino un punto de inicio ya que abre la metodología de análisis a otras fases del proceso y a otras dimensiones de la empresa (ambiental, social y toma de decisiones).

El Doctorando presenta un manuscrito con los siguientes indicadores de calidad: 2 artículos JCR, congresos nacionales e internacionales y 1 estancia de investigación en el extranjero.

Córdoba, 08 de marzo de 2023

Artículos de investigación:

Vilcacundo, E., García, A., Vilcacundo, M., Morán, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2020). Antioxidant purple corn protein concentrate from germinated andean purple corn seeds. *Agronomy*, 10(9), 1–16.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10091282>

Vilcacundo, E., Montalvo, V., Sanaguano, H., Moran, R., Carrillo, W., & García, A. (2022). Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates. *Agronomy*, 12(9).

<https://doi.org/10.3390/agronomy12092217>

Conferencista en Congresos:

Vilcacundo, E., (agosto 2022). Condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (*Zea maíz* L). IX Congreso Internacional de Ciencia Tecnología Innovació y Emprendimiento CTIE 2022. Guaranda Ecuador.

Vilcacundo, E., (diciembre 2020). Germinados de maíz púrpura (*Zea mays* L.): actividad antioxidante y antimicrobiana de semillas e hidrolizados. II Congreso Internacional de Desarrollo Universitario CIDU 2020. Quevedo Ecuador.

Vilcacundo, E., (diciembre 2019). Effect of Germination of Seeds Andean Purple Corn in the Production of Corn Protein Concentrate with Antioxidant Activity. VI Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Emprendimiento VI CTIE. Guaranda Ecuador.

Vilcacundo, E., (noviembre 2018). Obtención y aprovechamiento de hidrolizados de proteínas de origen animal y vegetal. V Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología, Innovación y Emprendimiento V CTIE. Guaranda Ecuador.

Vilcacundo, E., (noviembre 2018). Obtención y aprovechamiento de hidrolizados de proteínas de origen animal y vegetal con capacidad antimicrobiana y antioxidante para diferentes usos en la agroindustria. IV Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad CIBB 2018. Guayaquil Ecuador.

Cursos:

Uso de Software para la Interpretación de datos potenciales para Artículos Científicos (ATLAS. TI), 7 de julio al 6 de agosto del 2022. Vicerrectorado de Investigación y Vinculación. Universidad Estatal de Bolívar.

Uso de bases de datos empleadas para la publicación de artículos científicos de alto impacto, 6 de junio al 6 de julio del 2022. Vicerrectorado de Investigación y Vinculación. Universidad Estatal de Bolívar.

Escritura y Publicación de Artículos Científicos: Normativa, Aspectos Generales e Indexación de Alto Impacto, 18 al 25 de **febrero del 2021**. Vicerrectorado de Investigación y Vinculación. Universidad Estatal de Bolívar.

Curso Internacional de Cultura de la Investigación on-line. Modalidad Ingeniería y Empresa, 29 de junio al 20 de **septiembre del 2020**. Universidad Internacional de la Rioja.

Curso de Innovación y Emprendimiento, 26 al 30 de **agosto del 2019**. Fundación México - Estados Unidos para la Ciencia. Universidad Católica Santiago de Guayaquil.

Curso Taller Evaluación de la Incertidumbre, 10 al 12 de **diciembre del 2020**. Sistemas de Mantenimiento Calidad y Laboratorio.

Curso Taller Validación de Métodos, 03 al 05 de **diciembre del 2020**. Sistemas de Mantenimiento Calidad y Laboratorio.

Curso Taller Norma NTE INEN ISO/IEC, 10 al 12 de **noviembre del 2020**. Sistemas de Mantenimiento Calidad y Laboratorio.

Estancias de investigación:

Estancia de Investigación en el Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria de la *Universidad Politécnica de Valencia, España*, durante el periodo comprendido entre 1 de septiembre a 1 de octubre de 2021, con la finalidad de recibir transferencia de tecnología para el desarrollo y sostenibilidad de las poblaciones vulnerables de la provincia Bolívar de Ecuador.

Estancia de Investigación en el Departamento de Producción Animal de la *Universidad de Córdoba, España*, durante el periodo comprendido entre el 1 al 30 de abril del 2019, con la finalidad de profundizar sobre puesta a punto de metodologías de laboratorio, tabulación y construcción de bases de datos.

Agradecimientos

No habría podido lograr esta meta sin el apoyo de mi director, el Dr. Antón García Martínez de la Universidad de Córdoba, y mi mentor, el Dr. Ismael Carrillo, así como distintas instituciones y personas entre colegas, amigos y familia. Deseo dedicar mi trabajo y agradecerles por el respaldo brindado. Sin embargo, mencionar a cada uno de ellos requeriría muchas páginas. Por lo tanto, también quiero agradecer a todos aquellos a quienes no mencionaré en los siguientes párrafos.

- *Un agradecimiento especial para la Universidad de Córdoba (España), y al programa de Doctorado de Recursos Naturales y Gestión Sostenible. A la Universidad Politécnica de Valencia y a su Departamento de Ingeniería Rural. A la Universidad Estatal de Bolívar, al Vicerrectorado de Investigación y Vinculación y al Centro de Investigación por su valiosa colaboración al facilitarme los materiales y equipos necesarios para la realización del presente trabajo de Investigación*
- *Al Dr. Carlos Ribadeneira Zapata Vicerrector de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar por confiar en mí y en mi equipo de trabajo. Sin su apoyo nada de esto sería posible*
- *Al equipo del grupo AGROPROBIOPEP por su inigualable colaboración desde la parte técnica y científica.*

Quiero agradecer a los amigos que he hecho en este camino y que han sido parte fundamental de mi proceso de formación: Roberto Morán, María Fernanda Quinteros, Alejandra Barrionuevo y José Luis Altuna.

Por último, un agradecimiento eterno a mis padres, mis hermanos, mi esposa y mis hijos. Gracias por sembrar en mí la semilla de la constancia, por inculcarme valores y una buena educación, valiosas herramientas que me han permitido llegar donde estoy. Son parte de este sueño.

Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

Index

Index	1
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Justificación	9
1.2. Objetivo General.....	13
1.3. Objetivos Específicos	13
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Introducción.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Químicos reactivos	23
3.2. Material vegetal	24
3.3. Análisis proximal.....	24
3.4. Germinación de semillas de maíz morado	24
3.5. Concentrado Fenólico de proteína de maíz morado (PCPC) de semillas germinadas.....	25
3.6. Electroforesis (PCPC).....	26
3.7. PCPC Cuantificación total del contenido fenólico (TPC)	28
3.8. Ensayo de actividad antioxidante por el método ABTS	29
3.9. Ensayo de actividad antioxidante por el método de poder antioxidante de reducción férrica FRAP	30
3.10. Análisis estadístico	31
3.11. Hidrólisis Gastrointestinal de PCPC25 y PCPC35	31
3.12. Composición Elemental de PCPC25, PCPC35 e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) y Cuantificación del Contenido Proteico	33
3.13. Contenido total de antocianinas (TAC)	33
3.14. Contenido total de proantocianinas (TPAC).....	34
3.15 Contenido total de flavonoides (TFC)	34
3.16 Contenido total de flavonoles (TFLC).....	35

3.17. Análisis de biocompuestos de PCPC e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase reversa-espectrometría de masas (RP-UPLC-MS).....	35
3.18. Propiedades Funcionales de PCPCs e Hidrolizados Gastrointestinales.....	37
3.18.1. Solubilidad de proteínas (PS).....	37
3.18.2. Capacidad de Absorción de Aceite (OAC)	38
3.18.3. Capacidad de absorción de agua (WAC)	39
3.19 Análisis estadístico	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. Análisis proximal de harina de maíz.....	43
4.2 Germinación (%) de Semillas de Maíz Morado.....	43
4.3 Perfil de proteína PCPC	46
4.4. Cuantificación del contenido de proteínas PCPC	48
4.5. Contenido de TPC de PCPC germinados.....	50
4.6. Actividad antioxidante de los PCPC germinados por métodos ABTS y FRAP	54
4.7. Análisis de Perfil Proteico de PCPC e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	57
4.8. Composición Elemental de PCPCs e Hidrolizados y Cuantificación del % Hidrólisis de Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)	59
4.9. Contenido de Compuestos Fenólicos de PCPCs e Hidrolizados Gastrointestinales (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	61
4.10. Identificación de compuestos de ácido fenólico y flavonol de PCPC e hidrolizados.....	64
4.11. Evaluación de Propiedades Funcionales	66
4.11.1. Solubilidad Proteica (PS) de Concentrado de Proteína Morada de Maíz (PCPC) e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	66
4.11.2 Cuantificación de %WAC y %OAC de PCPC25, PCPC35 e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)	68
4.12. Actividad antioxidante de PCPC e hidrolizados gastrointestinales	70
5. DISCUSIÓN GLOBAL	75

6.	CONCLUSIONES.....	83
7.	RESUMEN.....	87
8.	SUMMARY.....	91
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	95
10.	ANEXOS.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de maíz morado cultivadas en el Centro de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar Ecuador.....	23
Figura 2. Protocolo de germinación de semillas de maíz morado en condiciones controladas.....	25
Figura 3. Obtención de concentrados fenólicos de proteína de maíz morado por punto de precipitación isoelectrico.	26
Figura 4. Electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cuantificación por peso molecular en foto-documentador.....	27
Figura 5. Cuantificación del contenido total de polifenoles.....	28
Figura 6. Medición de la actividad antioxidante por ABTS.....	29
Figura 7. Medición de la actividad antioxidante por el método FRAP.	30
Figura 8. Obtención de hidrolizados de proteína de maíz morado por simulación gastrointestinal.....	32
Figura 9. Análisis elemental de muestras de concentrados e hidrolizados de maíz morado (C, H, S, N).	33
Figura 10. Determinación de biocompuestos por cromatografía líquida de Ultra alta resolución UPLC con detector de masas. Cromatograma de Quercetina.....	36
Figura 11. Ensayo de solubilidad de concentrados proteicos de maíz morado.	38
Figura 12. Ensayo para determinar la capacidad de absorción de aceite.	39
Figura 13. Fotografías de germinación de maíz morado andino. (a) germinación de semillas de maíz morado a 20 °C durante 72, 96, 120, 144 y 168 h; (b) germinación de semillas de maíz morado a 25 °C durante 72, 96, 120, 144 y 168 h; (c) germinación de semillas de maíz morado a 30 °C, 35 °C y 40 °C durante 168 h.....	44
Figura 14. Análisis del perfil proteico de concentrados fenólicos de proteína de maíz morado (PCPC) por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). (a) PCPC no germinado obtenido a (pH 8.0 y pH 10 extracción alcalina) y diferentes pHs de precipitación; (b) PCPC germinado a (pH 8,0 alcalino y pH 4,0 de precipitación) durante 72 h; (c) PCPC germinado a (pH 10 y pH 4,0 de precipitación) durante 72 h.	47
Figura 15. Análisis de perfil proteico de PCF, PCPC25, PCPC35 e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) por electroforesis SDS-PAGE. PCF (harina de maíz morado), PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C). GH25 (hidrolizado gástrico de PCPC25), DH25 (hidrolizado duodenal de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico de PCPC35) y DH35 (hidrolizado duodenal de PCPC35). ..	57
Figura 16. Perfil de componentes fenólicos de PCPC35 por UPLC-QDa. (1) apigenina; (2) 7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavona; (3) (+) Catequina; (4) quercetina; (5) Dihidroquercetina/Taxifolina; (6) miricetina; (7) ácido p-cumárico 4-O-glucósido; y (8) ácido gálico 4-O-glucósido.	64
Figura 17. El %PS de PCF, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados a diferentes pH (a) PCPC25 e	

hidrolizados gástricos y duodenales; (b) PCPC35 e hidrolizados gástricos y duodenales. PCF (harina de maíz morado), PS (proteína de solubilidad), PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C), PCF (harina de maíz morado), GH25 (hidrolizado gástrico obtenido de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico obtenido de PCPC35), DH25 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC25) y DH35 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC35)..... 67

Figura 18. Productores de maíz en la Provincia de Bolívar Ecuador..... 75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de germinación a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura de semillas de maíz morado andino.	44
Tabla 2. Contenido de proteína PCPC en maíz morado andino germinado.....	49
Tabla 3. Contenido fenólico total (TPC) de PCPC germinados.....	51
Tabla 4. Actividad antioxidante de PCPC por el método del ácido 2,2-azinobis, 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).	55
Tabla 5. Actividad antioxidante de PCPC por el método del poder antioxidante reductor	55
Tabla 6. Composición elemental, cuantificación de proteína de PCPCs e hidrolizados y grado de hidrólisis de hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35	60
Tabla 7. Cuantificación de biocompuestos de PCF, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	62
Tabla 8. Identificación de componentes fenólicos de PCF, PCPCs y sus hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	65
Tabla 9. Propiedades funcionales de PCF púrpura, PCPC25, PCPC35 e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).....	68
Tabla 10. Actividad antioxidante de PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados gastrointestinales (GH25, DH25, GH35 y DH35) por métodos ABTS, FRAP y DPPH.....	70

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

El maíz (*Zea mays* L.) es un cereal perteneciente a la familia Poaceae, contiene carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. El maíz morado por su parte agrupa un conjunto de variedades con el fruto de color morado que se desarrollan fundamentalmente en los Andes de Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador.

En general el maíz morado es una variedad ancestral que aporta una cantidad importante de carbohidratos, alrededor del 75%, un 10% de proteína y azúcares. Las sustancias minerales están constituidas por P (0,43%), K (0,40%), Mg (0,16%) S (0,14%) y otros minerales 0,27%. Existen cantidades significativas de caroteno 4,85 mg/Kg., vitamina A 4188,71 mg/Kg., tiamina 4,54 mg/Kg., riboflavina 1,32 mg/Kg., niacina 14,11 mg/Kg., ácido pantotéico 7,41 mg/kg y vitamina E 24,71 mg/kg (Urango, 2018). Esta variedad de maíz se describe como alimento funcional y saludable y podría contener antioxidantes naturales que retarden el envejecimiento celular, principalmente por los mecanismos de acción de la cianidina-3- β -glucósido, pelargonidina-3- β -glucósido, peonidina-3- β -glucósido, ácidos fenólicos, quercetina y hesperidina (Guillén-sánchez et al., 2014)

Por otra parte, los germinados son brotes de plantas que se han cultivado durante un corto período de tiempo, generalmente de 3 a 7 días, a partir de semillas, granos o legumbres. Son ricos en nutrientes, como vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes, se han estudiado por su posible efecto beneficioso para la salud humana. Se ha demostrado que los germinados tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antidiabéticas, neuroprotectoras y cardioprotectoras. Otras investigaciones afirman que los germinados pueden mejorar la función cognitiva, reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ayudar a prevenir ciertos tipos de cáncer (Núñez-Gastélum et al., 2022)

En la industria de los germinados, se utilizan técnicas de cultivo especializadas para garantizar que los germinados sean seguros y estén libres de bacterias y otros patógenos, deben ser cultivados en ambientes controlados para evitar la contaminación cruzada y se monitorea cuidadosamente el agua, la temperatura y la humedad para garantizar su calidad y seguridad. La industria de los germinados también está innovando en nuevas variedades

de germinados para satisfacer la creciente demanda del mercado. Se están produciendo germinados de diferentes tipos de semillas, granos y legumbres, y se están desarrollando nuevas técnicas de cultivo para aumentar la producción y mejorar la calidad de los germinados (Liu et al., 2022)

Los aislados proteicos por su parte, se utilizan ampliamente en la industria alimentaria y de la nutrición deportiva como suplementos nutricionales para aumentar la ingesta de proteínas y mejorar el rendimiento físico y la recuperación muscular después del ejercicio. También se utilizan en la elaboración de alimentos procesados y enriquecidos con proteínas, como barras de proteínas, batidos, bebidas y productos cárnicos. Los aislados proteicos son una fuente importante de proteínas de alta calidad, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento y reparación del tejido muscular y otros tejidos del cuerpo. Además, se ha demostrado que el consumo de proteínas en cantidades adecuadas contribuye a la saciedad y al mantenimiento del peso corporal saludable (Sahni et al., 2020)

Asimismo, el proceso de obtención de los aislados proteicos incluye varios pasos, como la extracción de la proteína de la fuente original, su purificación y concentración, y la eliminación de otros componentes no deseados. El resultado es una proteína en polvo con un alto porcentaje de proteína y baja en grasas y carbohidratos (Senadheera et al., 2023)

Con respecto a los polifenoles, son un grupo de compuestos químicos que se encuentran en plantas y se caracterizan por tener estructuras químicas que contienen múltiples grupos fenólicos. Los polifenoles son un tipo de antioxidante y se han estudiado por su posible efecto beneficioso para la salud. Existen muchos tipos de polifenoles, pero algunos de los más comunes son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los taninos. Se encuentran en alimentos como frutas, verduras, té, vino tinto, cacao y algunos frutos secos (Álvarez-Sala Walther et al., 2000)

Los polifenoles tienen varias funciones importantes en las plantas, incluyendo la protección contra el estrés ambiental, la regulación del crecimiento y el desarrollo, y la defensa contra patógenos y depredadores. En cuanto a la salud humana, se ha investigado ampliamente sobre los posibles beneficios de los polifenoles. Algunos estudios sugieren que los polifenoles pueden tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias,

antitumorales, antidiabéticas, neuroprotectoras y cardioprotectoras. Además, se ha demostrado que pueden mejorar la función cognitiva, reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ayudar a prevenir ciertos tipos de cáncer. (Valenzuela Landaeta & Espinoza Piombo, 2012)

Es importante destacar que la mayoría de los estudios sobre los efectos de los polifenoles se han realizado en modelos animales o en estudios observacionales en humanos, y se necesitan más investigaciones para confirmar los beneficios potenciales de los polifenoles para la salud humana. Sin embargo, se sabe que una dieta rica en frutas, verduras y otros alimentos que contienen polifenoles puede ser beneficiosa para la salud en general.

En cuanto a las bioactividades o actividades biológicas, se definen como las respuestas biológicas que se producen cuando una molécula o compuesto químico interactúa con células, tejidos u organismos completos. Estas respuestas pueden ser de diferentes tipos y niveles de complejidad, desde una simple interacción molecular hasta la regulación de procesos celulares y metabólicos complejos. Las bioactividades son de gran importancia en diferentes áreas de la biología, la biotecnología y la medicina (Guo et al., 2023).

Entre las bioactividades más comunes que se evalúan en la investigación biológica se encuentran la actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante, neuroprotectora, entre otras. La evaluación de estas bioactividades puede realizarse mediante diferentes métodos, como ensayos *in vitro* e *in vivo*, y su resultado permite determinar la capacidad de una molécula o compuesto para interactuar con sistemas biológicos y producir una respuesta biológica específica (Ye et al., 2022).

Surge la importancia de las investigaciones que permitan mejorar la comprensión sobre el proceso de envejecimiento humano. Algunos autores lo definen como el resultado del daño acumulativo en las células y tejidos del organismo, y depende tanto de factores intrínsecos y extrínsecos, como el material genético de cada individuo, su estilo de vida y el entorno que le rodea, entre los factores responsables del daño acumulativo que conducen al envejecimiento cabe destacar los oxidantes biológicos, ya sean producidos endógenamente o exógenamente (Díaz-Hung & González Fragueta, 2014)

El daño producido por los Radicales Libres (RL) al ser humano, implica la génesis o exacerbación de numerosos procesos de enfermedades crónicas no transmisibles. Es también considerable el número de estudios que reconocen el efecto beneficioso de la dieta sobre la longevidad y en los procesos de enfermedades propias del envejecimiento y vinculadas a Estrés Oxidativo (EO).

Son múltiples las reacciones redox necesarias para el buen funcionamiento del organismo humano, aunque en varias de ellas se producen continuamente RL. Estos compuestos, altamente inestables y reactivos atacan componentes celulares causando daño sobre proteínas, lípidos y el ADN. A pesar de que el organismo dispone de mecanismos de defensas naturales contra los RL inevitablemente las defensas suelen no ser suficientes y el daño oxidativo va acumulándose en el tiempo (Galicia-Moreno & Gutiérrez-Reyes, 2014)

Ante el estrés oxidativo el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente, desencadenando diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la reducción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia del neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento entre otros (Bello-Medina et al., 2022).

Actualmente, existe un interés generalizado por la búsqueda de agentes antioxidantes naturales con baja toxicidad y de fácil manejo para la industria. En muchos países se están desarrollando alimentos funcionales, productos nutraceúticos y otros, con un alto valor nutricional y que puedan ejercer actividades biológicas sobre el organismo humano, ayudando a prevenir enfermedades en el mismo.

Yang & Zhai. (2010) evaluaron la capacidad antioxidante de los granos y marlo de “maíz morado” utilizando los métodos DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) y TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), y a su vez comparándolos con BHT (hidroxitolueno butilado). Se encontró que la mayor capacidad antioxidante fue aquella presentada por el marlo, seguida por los granos y por último el BHT.

Recientes investigaciones reportan la existencia de cianidina 3 - glucósido en el grano del maíz morado, como la principal antocianina (flavonoide) contenida en este fruto. Otras antocianinas identificadas fueron cianidina 3-(6"- malonil glucósido) y peonidina 3-glucósido. La cianidina 3-glucósido, una importante antocianina presente en el maíz morado, suprime el 7,12-dimethylbenzo antraceno, el cual induce a la carcinogénesis mamaria. El maíz morado podría actuar en cierta medida como un agente quimioterapéutico prometedor (Chatham et al., 2020)

La obtención de productos derivados de matrices vegetales con actividades farmacológicas asociadas a radicales libres puede ayudar a reducir y prevenir los riesgos de enfermedades cardiometabólicas. Estas plantas se convierten en la alternativa natural de elección al poseer compuestos con alta capacidad antioxidante como los fenoles y polifenoles. Varias investigaciones validan las propiedades farmacológicas del maíz morado, ya que contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres, estrés oxidativo y la carcinogénesis, siendo este tipo de alimentos útiles para su aplicación industrial (Kowalczyk et al., 2021; Liu et al., 2011)

Surge por tanto la necesidad de profundizar en el conocimiento de las propiedades nutricionales y biológicas del maíz morado. La caracterización química y el conocimiento de las condiciones de germinación de esta variedad favorecería su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. Por otra parte, su estudio y puesta en valor contribuye a los objetivos mundiales de desarrollo sostenible (1 y 8 entre otros) y podrían mejorar las expectativas económicas de desarrollo de los grupos campesinos del Ecuador.

1.2. Objetivo General

El objetivo general del presente estudio es determinar las condiciones de germinación para potenciar la acumulación de compuestos bioactivos de maíz morado (*Zea mays* L.) de Ecuador.

1.3. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- a) Determinar las condiciones de germinación de semillas de maíz morado andino para producir concentrado de proteína de maíz morado y evaluar su

actividad antioxidante

b) Evaluar las propiedades funcionales de los compuestos fitoquímicos del concentrado de proteína de maíz morado germinado y sus hidrolizados gastrointestinales

c)

Todos los objetivos propuestos nos ayudarán a determinar bajo qué condiciones el proceso de germinación de maíz morado permite obtener harina concentrada, hidrolizados de proteína y observar si se puede potenciar su actividad antioxidante así como sus propiedades funcionales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

La revisión bibliográfica se ha elaborado a partir de los siguientes artículos, así como del material presentado en diferentes congresos.

Published as:

Vilcacundo, E., García, A., Vilcacundo, M., Morán, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2020). Antioxidant purple corn protein concentrate from germinated Andean Purple corn seeds. Agronomy, 10(9), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10091282>

Vilcacundo, E., Montalvo, V., Sanaguano, H., Moran, R., Carrillo, W., & García, A. (2022). Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates. Agronomy, 12(9).
<https://doi.org/10.3390/agronomy12092217>

Estos artículos fueron publicados dentro del Special Issue Bioactive Compounds in Cereal Grain: Nutraceutical Properties and Health Benefits)

El maíz pertenece a la Familia Poaceae y al Género Zea (Cuevas-Rodríguez et al., 2006; Ul-Allah et al., 2020). Hay varios tipos de granos de maíz con diferentes colores, como amarillo, azul, marrón, verde y morado. El maíz morado, también llamado maíz púrpura, es un cultivo nativo de la región andina de América del Sur que se cultiva en Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina (Mrad et al., 2014; Z. Yang & Zhai, 2010).

El maíz es un cultivo de cereales ampliamente distribuido en todo el mundo desde la latitud 58° N a 40° S, desde nivel del mar hasta más de 3000 m de altitud y en áreas con una precipitación anual entre 250 mm y 5000 mm. Los países con mayor producción de maíz en el mundo son USA con 30%, China 15%, UE 14%, Brasil 4% e India 3% (Kabir et al., 2019).

El maíz se utiliza para la alimentación animal y humana por su composición química y alto valor nutritivo. Los granos de maíz tienen un alto contenido de almidón (72 %), 7–13 % de contenido de proteína, 2,5 % de fibra y 4,8 % de contenido de aceite. Los granos de maíz tienen un contenido importante de vitaminas y minerales (Carrillo et al., 2017; Cuevas-Rodríguez et al., 2004; Govender et al., 2008; Moreira et al., 2015; Y. Wang et al., 2008)

La germinación es un proceso biológico que permite a las plantas utilizar semillas para conservar especies. Con este proceso se ponen en marcha una serie de mecanismos que permiten el crecimiento de un embrión. Los embriones inician la germinación con la entrada de agua y finalizan con la elongación del eje embrionario-terminal. Durante este complejo proceso, diferentes compuestos biológicos de las semillas sufren procesos de catabolismo y síntesis (Han et al., 2020; López-Martínez et al., 2017; X. F. Wang et al., 2005). En las primeras etapas, muchos de los fitocompuestos se utilizan para el crecimiento del embrión. Se activa la síntesis de nuevos fitocompuestos utilizados para diferentes propósitos incluyendo mecanismos de protección. Además, durante la germinación, las semillas reducen algunos componentes que se consideran antinutrientes (ácido fítico y lectinas) (Aguilera et al., 2013; V. Benítez et al., 2013; Mwikya et al., 2001; Sokrab et al., 2012).

A nivel biotecnológico, los germinados se utilizan para generar bancos de germoplasma. Durante muchos años, los germinados han atraído el interés de la industria alimentaria por el valor nutricional de sus componentes y sus propiedades biológicas como la actividad antioxidante (Carrillo et al., 2016). Los compuestos antioxidantes se utilizan en la industria alimentaria para preservar los alimentos procesados contra la oxidación de lípidos (L. Piñuel et al., 2019; Saito et al., 2003; R. Vilcacundo et al., 2017). Estudios recientes han demostrado sus efectos inhibidores contra ciertas enfermedades como el cáncer (Gawlik-Dziki et al., 2013; Nieva-Echevarría et al., 2015). Por lo tanto, existe un interés considerable en la búsqueda de compuestos naturales con propiedades antioxidantes (Das & Singh, 2015; R. Vilcacundo et al., 2017; Rubén Vilcacundo et al., 2018)

Diferentes extractos naturales obtenidos de plantas que contienen principalmente polifenoles, flavonoides, carotenos y antocianinas han sido descritos en la literatura

científica por su alta actividad antioxidante (Lao et al., 2017; Q. Zhang et al., 2019)

Los germinados pueden ser una alternativa natural para obtener compuestos con capacidad antioxidante (polifenoles y proteínas). Se han descrito diferentes brotes con actividades biológicas, lentejas (*Lens culinaris*), soja (*Glycine max*), amaranto (*Amaranthus caudatus*), quinua (*Chenopodium quinoa*) y frijoles (*Phaseolus vulgaris*) (Cornejo et al., 2019; de Souza Rocha et al., 2015; Dueñas et al., 2015; González-Montoya et al., 2018; López-Amorós et al., 2006; Mamilla & Mishra, 2017)

Piñuel et al., 2019 describieron aislados proteicos de germinados e hidrolizados obtenidos a partir de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) con alta capacidad antioxidante (Lucrecia Piñuel, Boeri, et al., 2019)

2.1. Introducción

Los cereales se encuentran entre los alimentos más cultivados en todo el mundo y juegan un papel importante en la dieta humana y la alimentación animal. Dentro de los cultivos de cereales, el maíz o maíz (*Zea mays* L.) representa uno de los cultivos más importantes para la alimentación mundial debido a su valor nutricional. Las semillas de maíz tienen un alto contenido de almidón (72 %), contenido de proteínas (7–13 %), fibra total (2,5 %) y contenido de aceite (4,8 %) (Moreira et al., 2015; Rouf Shah et al., 2016; Salvador-Reyes & Clerici, 2020).

Las semillas de maíz morado contienen vitaminas y minerales importantes para la dieta. En el último informe de la Base de Datos de Estadísticas Corporativas de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT), se indica que Ecuador tenía 686.896 hectáreas cultivadas con cereales con una producción total de cereales de 2.689.665 toneladas en 2020. Un área de 341.301 hectáreas se destinó al maíz, logrando una producción de 1.304.884 toneladas y un rendimiento de 38.233 hg/ha en 2020. Estos datos reflejan la importancia de este cultivo para el Ecuador y la alimentación de la población.

Las variedades de maíz pigmentado, como el maíz morado o el maíz morado, son muy valoradas por su alto contenido en compuestos fenólicos, como flavonoides y

antocianinas. Estas variedades se cultivan en la región de los Andes de América del Sur en Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina. Los extractos de antocianina de maíz morado se han utilizado para colorear postres y bebidas caseras, como la chicha morada y la mazamorra morada, dos bebidas típicas de la región andina (FAO, 2013; FAOSTAT, n.d.; Lao & Giusti, 2016).

Suriano et al. (2021) han descrito el contenido de compuestos fenólicos para maíz morado con valores de contenido total de proantocianinas (TPA) de 1381 $\mu\text{g/g}$, DW), contenido total de antocianinas (TAC) (780 $\mu\text{g/g}$ DW), contenido total de flavonoides (TFC) (1998 $\mu\text{g/g}$ DW) y contenido total de polifenoles (TPC) (4047 $\mu\text{g/g}$ DW) (Suriano et al., 2021).

Está ampliamente descrito en la literatura que los compuestos fenólicos son responsables de diferentes actividades biológicas de los alimentos. La actividad antioxidante es una de las actividades biológicas más estudiadas de los tipos de compuestos. El uso de compuestos naturales es una alternativa a los antioxidantes artificiales debido a su baja toxicidad y ausencia de efectos nocivos para la salud (Ávila-Román et al., 2021; Mahfuz et al., 2021; Rahman et al., 2022)

Los concentrados de proteínas en polvo (PCP) se utilizan como suplementos dietéticos y en el procesamiento de alimentos y están disponibles en una amplia variedad de sabores y formas, como batidos, barras, refrigerios y geles. El PCP se produce utilizando un método de filtración empujando las proteínas a través de un filtro, que permite el paso del agua, los minerales y otros materiales orgánicos.

Las proteínas, que son de gran tamaño molecular, son retenidas por el filtro, lo que da como resultado proteína pulverizada. PCP contienen cantidades significativas de carbohidratos y grasas. El PCP se puede utilizar para obtener polvo de aislado de proteína (PIP) mediante filtraciones sucesivas (Gharibzahedi & Smith, 2021; Jia et al., 2021; Kalman, 2014; Morr & Ha, 1993; H. Wang et al., 2004). Los PCP y PIP de origen animal más utilizados en la industria alimentaria son el concentrado de proteína de suero (WPC) y el aislado de proteína de suero (WPI) obtenidos a partir de proteínas de suero de leche (Kumar et al., 2018)

El concentrado de proteína de soja (SPC) es el PCP de origen vegetal más utilizado. Este PCP se produce a partir de harina de soja desgrasada sin los hidratos de carbono solubles en agua, pero con fibra. Este PCP contiene un 70 % de proteínas (Malav et al., 2015; O'Flynn et al., 2021; Singh et al., 2008). PCP y PIP tienen buenas propiedades funcionales y biológicas. Por su composición, las semillas de maíz morado pueden ser una buena alternativa para obtener PCP y PIP con buenas propiedades funcionales y biológicas. Pueden ser una fuente vegetal económica de proteínas y son fáciles de cultivar en diferentes zonas climáticas. Suelen tener un alto porcentaje de solubilidad proteica, buena absorción de agua y aceite. Se han reportado diferentes PCP y PIP con capacidad antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria.

La digestibilidad de las proteínas es un aspecto de gran interés a evaluar. Existen modelos de simulación gastrointestinal que permiten simular las condiciones fisiológicas de hidrólisis de proteínas alimentarias. Durante el proceso de hidrólisis, las secuencias peptídicas son liberadas por la acción de enzimas que pueden mejorar las propiedades funcionales y biológicas de los PCP y PIP.

PIP tiene niveles muy bajos de carbohidratos y grasas, conteniendo exclusivamente proteínas puras. La extracción alcalina seguida de precipitación isoeléctrica es una forma de obtener PCP y PIP de forma sencilla, rápida y económica. Los SPI se producen comúnmente usando esta técnica (Momen et al., 2021; L. Wu et al., 2021; J. Yang et al., 2021)

El maíz morado puede ser una fuente de proteína adecuada para obtener PCP con un alto contenido en compuestos fenólicos, especialmente antocianinas, lo que resulta en una alta actividad antioxidante. Además, PC y PI de origen vegetal suelen tener un alto grado de digestibilidad, lo que facilita la biodisponibilidad de los aminoácidos (Khalesi & FitzGerald, 2021).

Las fuentes de origen vegetal son mucho más sostenibles que las fuentes de origen animal porque se utilizan menos recursos naturales en su producción y son menos dañinas para el medio ambiente. Se prevé que para 2030, la población mundial será de alrededor de 8.600 millones de personas, y para 2050, podría ser de 10.000 millones de personas. Este aumento de la población produce un aumento de la demanda de proteína de origen animal

estimada en torno al 70%. Por estas razones, se deben buscar nuevas fuentes de proteína dietética que sean sostenibles y justas para el medio ambiente. Los cultivos tienen que hacer frente a las dificultades del cambio climático; por lo tanto, es de gran importancia contar con información sobre proteínas y otros compuestos vegetales, así como información sobre los cultivos y su capacidad de adaptación a los cambios ambientales (Aimutis, 2022; Aschemann-Witzel et al., 2021; Henchion et al., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Published as:

Vilcacundo, E., García, A., Vilcacundo, M., Morán, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2020). Antioxidant purple corn protein concentrate from germinated andean purple corn seeds. Agronomy, 10(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091282>

3.1. Químicos reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: Folin-Ciocalteu, estándar de ácido gálico, 2, 20-Azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 6-Hidroxi-2 El ácido ,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (estándar Trolox) obtenidos de la marca de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Figura 1. Semillas de maíz morado cultivadas en el Centro de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar Ecuador.



3.2. Material vegetal

Se recolectaron semillas de maíz morado andino (*Zea mays* L., racimo de uva INIAP-199) de 40 plantas de maíz del cultivo cultivado por la Universidad Estatal de Bolívar (Guaranda), y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), (Quito). El cultivo se realizó en la ciudad de Guaranda, Bolívar en Ecuador a una altitud de 2800 msnm, latitud sur 01°34'15'' y longitud oeste 79°0'02''.

La temperatura media anual del sitio es de 13° C con 75% de humedad. La cosecha se realizó a mano una vez que las semillas alcanzaron la madurez fisiológica y comercial. Las semillas se descascararon manualmente y se secaron en un tendedero al aire libre hasta alcanzar una humedad del 14%. Luego, se almacenaron en recipientes de plástico.

3.3. Análisis proximal

La composición química de la harina de maíz morado se analizó según protocolos estándar. La grasa se analizó según AOAC 2003.06:2012, humedad AOAC 925.10:2012 [37], fibra INEN 522:2013, ceniza INEN 520:2013 [38] y proteína con el método Dumas

3.4. Germinación de semillas de maíz morado

Semillas de maíz morado andino se germinaron según la metodología descrita por (Paucar-Menacho et al., 2017). Cien semillas se sumergieron para desinfección en solución de hipoclorito de sodio al 0,1% (1:5 p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Luego, las semillas se sumergieron en agua destilada (1:5 p/v) a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, las semillas hidratadas se introdujeron a la cámara de clima constante BINDER KBF 240 (LabReCo, Horsham, PA, USA) sobre papel filtro húmedo, con sistema de circulación de agua para mantener siempre húmedas las semillas. La germinación se realizó en la oscuridad con duraciones de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h. Se realizaron tres repeticiones para cada condición de germinación. Se calculó el porcentaje de germinación a cada tratamiento de germinación. El porcentaje de germinación = (% semillas normales + % semillas anormales + % semillas muertas) = 100%. Las semillas

normales fueron evaluadas como buenas si, las raíces primarias y las raíces secundarias crecen bien; el hipocótilo crece bien; plúmula con buen desarrollo, con hojas bien desarrolladas y cotiledón sano. Las semillas anormales se evaluaron como raíz primaria dañada y ausencia de raíces secundarias y cotiledones y hojas deformadas, necróticas o dañadas por infecciones.

Figura 2. Protocolo de germinación de semillas de maíz morado en condiciones controladas.



3.5. Concentrado Fenólico de proteína de maíz morado (Purple Corn Protein Concentrates PCPC) de semillas germinadas.

Semillas de maíz morado andino germinadas y sin germinar se molieron en un molino de

laboratorio Perten 120 (Perten Instruments, Hägersten, Suecia) hasta obtener una harina (<500 mm). La harina de maíz morado desgrasada (10 g) fue suspendida en 100 ml de agua Milli-Q. El pH de la solución se ajustó a pH 8,0 y pH 10,0 con NaOH 2,0 M. La solución obtenida se agitó durante 60 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 60 min a 4°C. El precipitado obtenido se separó y descartó (fibra, cenizas y carbohidratos). El pH del sobrenadante se ajustó a pH 4,0, pH 5,0 y pH 6,0 con HCl 1N. Las soluciones sobrenadantes se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 30 min a 4°C. El pH del precipitado obtenido se ajustó a pH 7,0 utilizando una solución de NaOH 0,5 M. Las muestras de PCPC producidas se secaron mediante una técnica de liofilización y se congelaron y almacenaron a -80°C (Acosta et al., 2016). El contenido de proteína PCPC se calculó por el método Dumas utilizando un analizador macro elemental (Elemental Vario Macro Cube, Langensfeld, Alemania). El porcentaje de proteína se determinó con la ecuación % de proteína = $6.25 \times \% N$, donde 6.25 es el factor de conversión y N es el porcentaje de nitrógeno determinado por el instrumento (Serrano et al., 2013).

Figura 3. Obtención de concentrados fenólicos de proteína de maíz morado por punto de precipitación isoeléctrico.

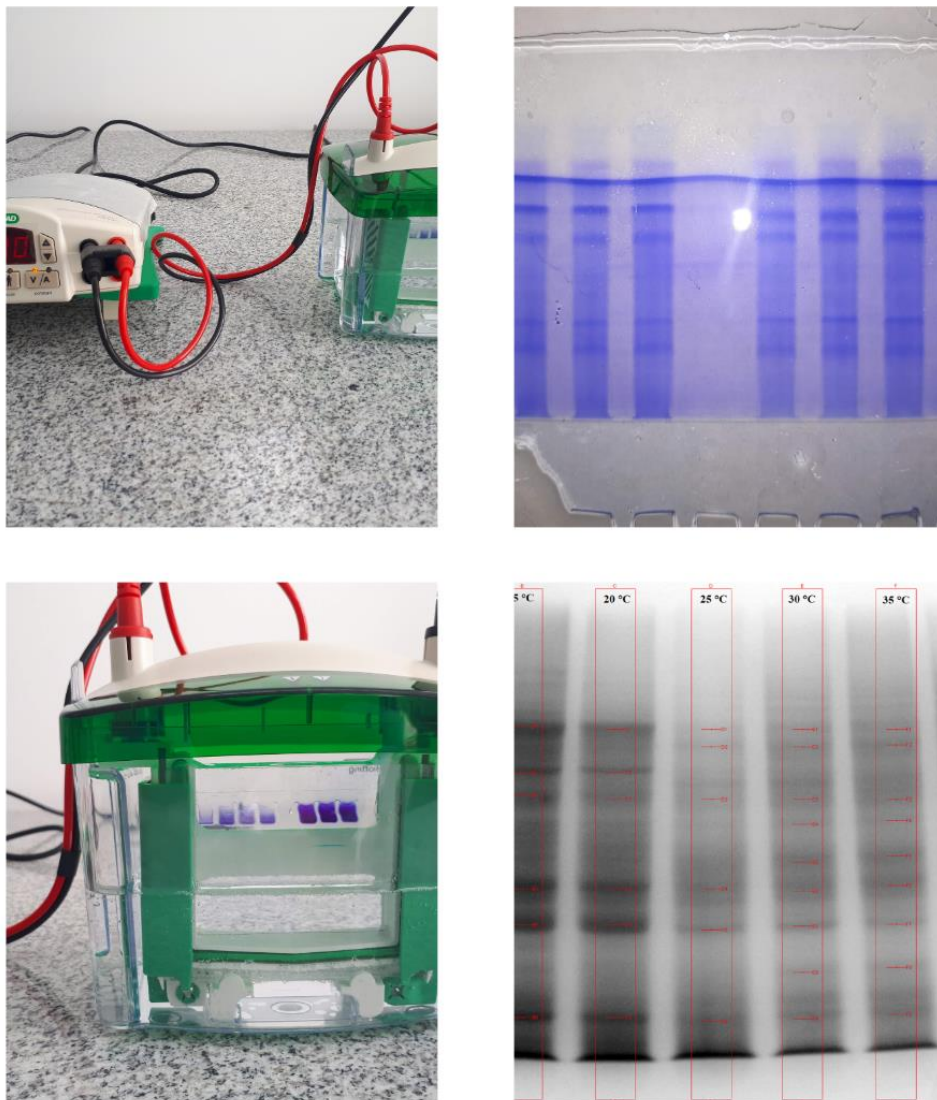


3.6. Electroforesis (PCPC)

El perfil de proteínas PCPC se caracterizó mediante el método de electroforesis en gel de

poliacrilamida dodecyl sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE) utilizando un sistema de electroforesis de células mini proteicas (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los geles se prepararon con una concentración de 12,00% de poliacrilamida. El teñido de geles de poliacrilamida se realizó utilizando una solución Coomassie Brilliant Blue G-250 durante 24 h con batido. El peso molecular de la proteína PCPC se calculó con la ayuda de un sistema documentador de imágenes en gel (Analytic Jena Tower, Jena, Alemania). Se utilizó un marcador de patrón con pesos moleculares de 10 kDa–200 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Poveda et al., 2016).

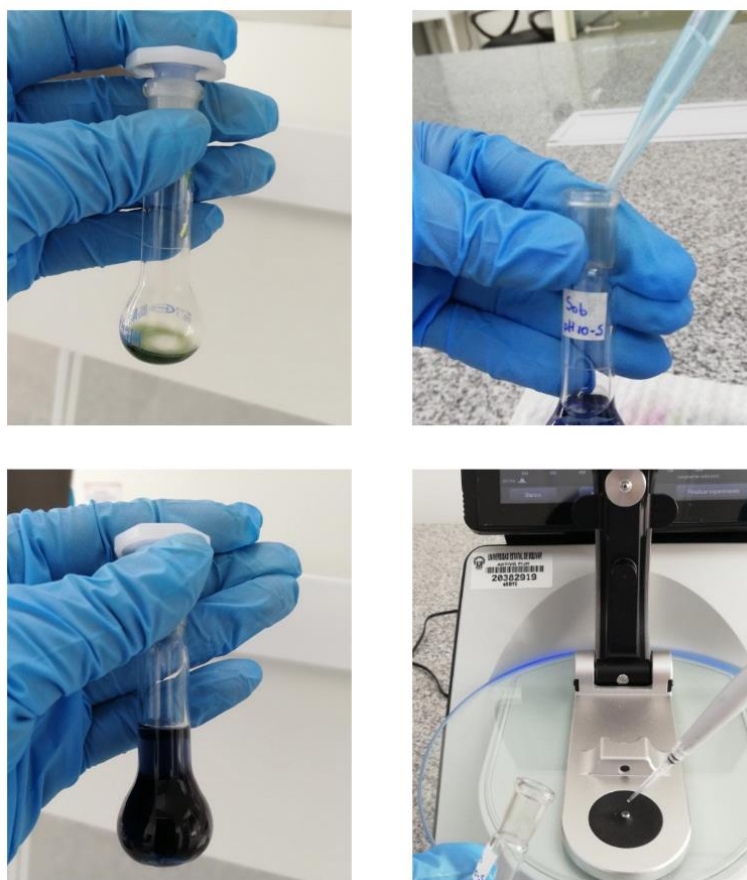
Figura 4. Electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cuantificación por peso molecular en foto-documentador.



3.7. PCPC Cuantificación total del contenido fenólico (Total Phenolic Content TPC)

Para el análisis de TPC se extrajeron en todas las muestras de PCPC. El TPC se extrajo con metanol (70%) de PCPC liofilizado y se agitó durante 5 min, seguido de una técnica de ultrasonido durante 10 min. Los extractos fueron centrifugados, filtrados y calibrados. Se tomó una alícuota de la solución separados y mezclados con agua destilada, reactivo de Folin Ciocalteau y con carbonato de sodio (20%). Los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias estadísticas de las muestras se evaluaron con análisis ANOVA de una vía ($p < 0,05$) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se presentaron con una letra diferente. La absorbancia de las muestras se midió a 765 nm. La cuantificación de TPC se realizó con una curva de calibración estándar de ácido gálico (GA). La curva estándar obtenida fue ($y = 0,0021x + 0,0033$, $R^2 0,9982$). Los resultados de TPC se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico GAE/g de PCPC, DW (Lara et al., 2017).

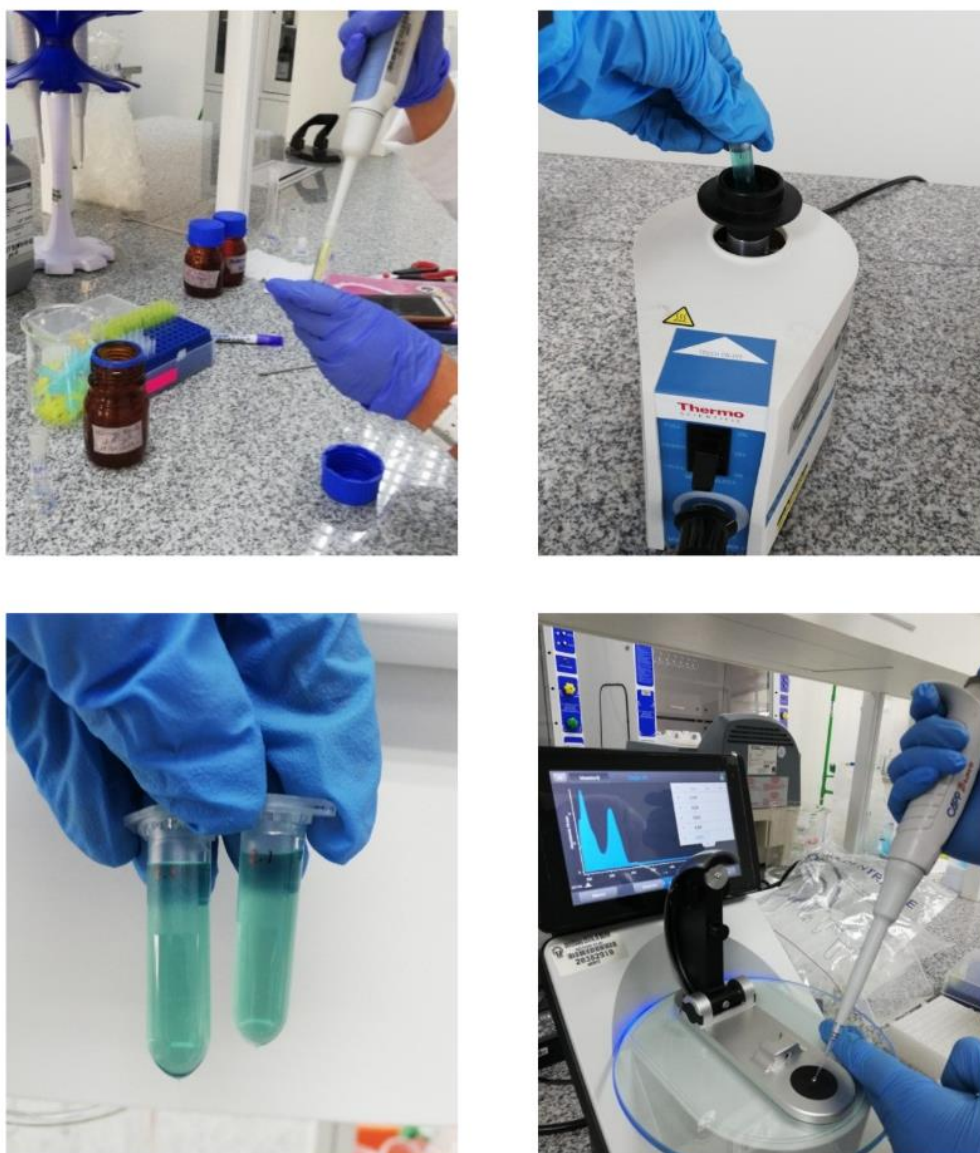
Figura 5. Cuantificación del contenido total de polifenoles.



3.8. Ensayo de actividad antioxidante por el método ABTS (2, ácido 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic).

Los PCPC germinados (200 μ L) se mezclaron con 3800 μ l de solución de ABTS (compuesta por solución de ABTS 7 mM con solución de persulfato de potasio 2,45 mM en proporción 1:1) y luego se diluyeron con tampón fosfato hasta obtener una absorbancia de $1,1 \pm 0,01$ a 743 nm. Para la determinación de las concentraciones se realizó una curva de calibración con la solución estándar Trolox (200 μ mol a 1000 μ mol). La curva obtenida fue ($y = 0,012x + 0,2089$, $R^2 = 0,9901$). Los datos se expresaron como μ mol de equivalentes de trolox TE/g PCPC, DW (Boeri et al., 2020)

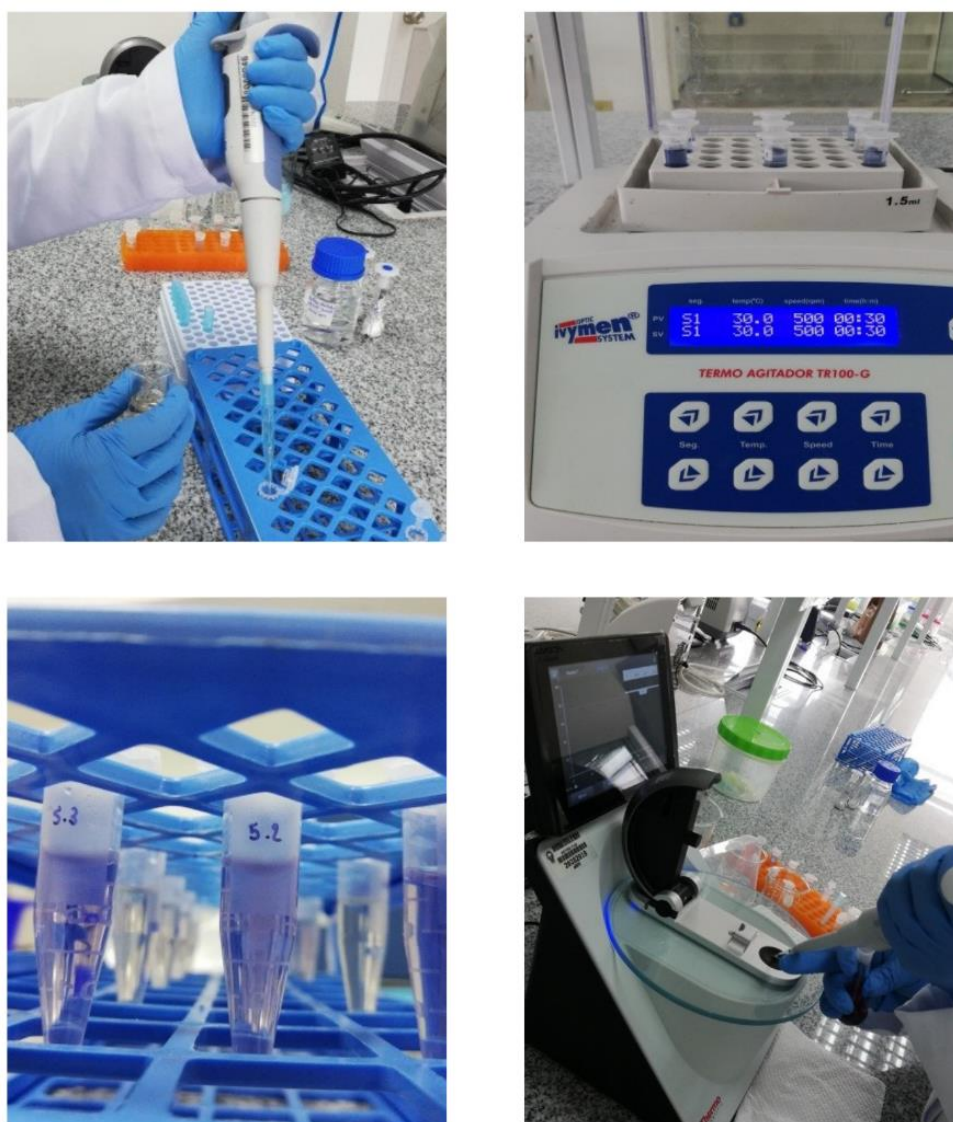
Figura 6. Medición de la actividad antioxidante por ABTS.



3.9. Ensayo de actividad antioxidante por el método de poder antioxidante de reducción férrica FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Los PCPC germinados (1 ml) se mezclaron con 2,5 ml de solución tampón de pH 6,6. Se agregaron 5 mL de solución de ferrocianuro de potasio al 1%. La muestra se incubó en baño maría a 50°C durante 20 min. Luego se agregaron 2.5 mL de solución de ácido tricloroacético al 10%, 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de cloruro férrico al 1%. Las muestras y los estándares se homogeneizaron en un vórtex y se dejaron reposar durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia de las soluciones a 700 nm (Zambrano et al., 2020).

Figura 7. Medición de la actividad antioxidante por el método FRAP.



3.10. Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias estadísticas de las muestras se evaluaron con análisis ANOVA de una cola ($p < 0,05$) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se presentaron con una letra diferente.

Fases del ensayo 2: Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates.

3.11. Hidrólisis Gastrointestinal de PCPC25 y PCPC35 (Purple Corn Protein Concentrate seeds germinated at 25 °C and 35 °C for 5 days).

Muestras seleccionadas a partir de los mejores resultados obtenidos en los ensayos anteriores se sometieron a etapas de hidrólisis gástrica y duodenal. Se usaron PCPC (10 mg, DW) para inducir la hidrólisis gastrointestinal.

Paso 1: El paso de hidrólisis gástrica (GH) implicó la enzima pepsina a pH 3,0 durante 120 min disuelta en un fluido gástrico simulado (SGF) (0,035M NaCl) con agitación continua. La mezcla se calentó a 80°C durante 5 min para detener la reacción de la enzima pepsina.

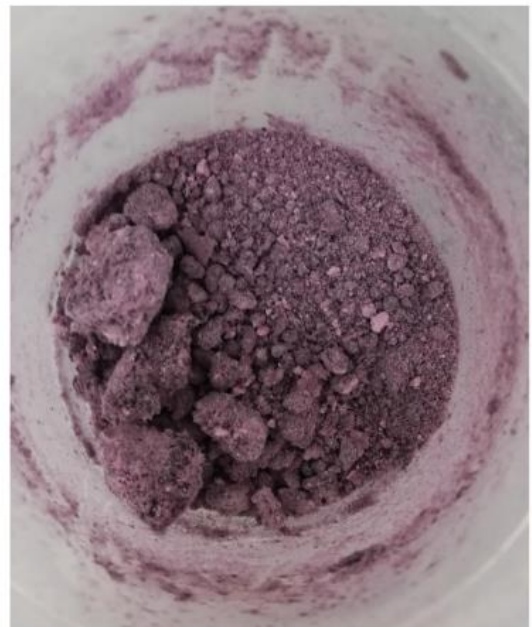
Paso 2: El paso de hidrólisis duodenal (DH) implicó pancreatina a pH 7,0 durante 120 min disuelta en un fluido duodenal simulado (SDF) (CaCl 2 más sales biliares) con agitación continua. Luego, se tomó 1 mL del hidrolizado gástrico de PCPC y se mezcló con 1 mL de la mezcla de pancreatina. La mezcla se calentó a 90°C durante 10 min para detener la reacción de pancreatina. Los hidrolizados gastrointestinales se congelaron a -80°C y se liofilizaron hasta su uso (Minekus et al., 2014).

Las muestras de hidrolizados gástricos se denominaron de la siguiente manera: GH25 (hidrolizados gástricos obtenidos de PCPC25) y GH35 (hidrolizados gástricos obtenidos de PCPC35). Las muestras de los hidrolizados duodenales se denominaron de la siguiente manera: DH25 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC25) y DH35 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC35).

El nitrógeno (N) no digerido se determinó finalmente por el método Dumas utilizando un analizador elemental (Vario Macro Cube, Elementar, Hanau, Alemania). La digestibilidad se calculó como % de digestibilidad = (%N en PCPC - %N no digerido en hidrolizado)/%N en

PCPC $\times 100$ (Aboubacar et al., 2001).

Figura 8. Obtención de hidrolizados de proteína de maíz morado por simulación gastrointestinal.



3.12. Composición Elemental de PCPC25, PCPC35 e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) y Cuantificación del Contenido Proteico

El contenido de carbono (C), hidrógeno (H), azufre (S) y nitrógeno (N) se determinó mediante el método de combustión Dumas utilizando un analizador elemental (Vario Macro Cube, Elementar, Hanau, Alemania). El instrumento se calibró con una muestra de un estándar de sulfonamida. Se colocó una cantidad de 20 mg de PCPC e hidrolizados liofilizados en cápsulas de aluminio. Las cápsulas se insertaron en el mecanismo de inyección de muestra para ser transformadas de C, H, S y N a su forma gaseosa por calcinación. Los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de proteína de las muestras se calculó utilizando la Ecuación (1):

$$(1) \% \text{ Proteína} = F \times \%N$$

donde F es el factor de conversión 6,25 y %N es el porcentaje de nitrógeno calculado por el instrumento.

Figura 9. Análisis elemental de muestras de concentrados e hidrolizados de maíz morado (C, H, S, N).



3.13. Contenido total de antocianinas (TAC)

La TAC se determinó por espectrofotometría UV-visible, siguiendo la metodología de diferencial de pH descrita por Rapisarda et al. [31]. Se mezcló una cantidad de 0,3 g de PCPC liofilizado con 5mL de tampón pH 1,0 (KCl 0,2N y HCl 0,2N) y se agitó durante 5 min. Luego,

la mezcla se sonificó en un baño de ultrasonido Cole-Parmer 8892 (Cole-Parmer, Chicago, IL, EE. UU.) y finalmente se centrifugó a $2700 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se separó y se transfirió a un balón volumétrico ámbar de 25 mL. Este procedimiento se repitió tres veces más y la solución se llevó al volumen con la solución tampón de pH 1,0. La extracción con tampón pH 4,5 (CH₃COONa 1M y HCl 1N) se llevó a cabo utilizando el mismo proceso. La cuantificación del TAC se realizó midiendo la absorbancia en las muestras (pH 1,0 y 4,5) a dos longitudes de onda (510 nm y 700 nm) en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 2600 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La absorbancia (A) se calculó mediante las diferencias de absorbancia entre pH 1,0 y pH 4,5 usando la Ecuación (2). Luego, el contenido de TAC se determinó usando la Ecuación (3).

$$(2) A = [(A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}]$$

$$(3) TAC = A \times MW \times DF \times 100/\epsilon \times W$$

donde A = diferencia de absorbancia pH 1,0–pH 4,5, MW = peso molecular del cloruro de cianidina-3-glucósido (484,84 g/mol), DF = factor de dilución, ϵ = coeficiente de extinción molar y W = peso de la muestra. Los resultados de TAC se expresan en miligramos de cloruro de cianidina-3-glucósido (cy-3-glu) por gramo de peso seco (PS), (mg cy-3-glu/100 g PS).

3.14. Contenido total de proantocianinas (TPAC)

El TPAC se cuantificó mediante un ensayo de ácido butanol. Se mezcló una cantidad de 250 μ L de muestra liofilizada (1 mg/mL) con 3,25 mL de n-butanol-HCl en proporción (50:50, v/v) en un tubo de ensayo. A continuación, se añadieron 0,2 ml (sulfato amónico de hierro II al 2% disuelto en HCl 2M). Luego, los tubos se calentaron a 95°C durante 50 min. La absorbancia de la solución roja se midió a una longitud de onda de 550 nm.

La cuantificación de TFC se realizó mediante una curva de calibración con (0-100 μ g/mL de catequina). La curva obtenida fue $y = 0,0004x - 0,0059$ ($R^2 = 0,9961$). Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos de equivalentes de catequina por gramo de TPA sobre peso seco (PS) de muestra (mg CE/g PS) (Amarowicz Ryszard and Pegg, 2006).

3.15 Contenido total de flavonoides (TFC)

El TFC se determinó por espectrofotometría UV-visible, utilizando el método propuesto por (Zhishen et al., 1999). Se disolvieron PCPCs y harina de maíz morado en la mezcla de

metanol y agua (70:30 v/v). Este paso se repitió varias veces hasta agotar el material vegetal. Se mezcló 1 mL del extracto diluido con 4 mL de agua destilada y se homogeneizó. Luego, 0,3 mL de nitrito de sodio al 5% (p/v) y 0,3 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v)), dejando reposar la muestra durante 5 min después de la adición de cada reactivo. Posteriormente se agregaron 2mL de NaOH 1N y se aumentó el volumen a 10 mL con agua destilada desionizada. En esta reacción se formó un cromóforo rosa; su absorbancia se midió a 490 nm con un espectrofotómetro Shimadzu modelo 2600 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La cuantificación de TFC se realizó mediante una curva de calibración con (0-100 mg rutina R/L). La curva obtenida fue $y = 0,0092x - 0,0042$ ($R^2 = 0,9936$). Los resultados se expresan en miligramos de equivalentes de rutina (RE) por gramo de peso seco (PS), (mg RE/100 g PS).

3.16 Contenido total de flavonoles (TFLC)

El contenido de TFLC se determinó utilizando la metodología propuesta por Ramos-Escudero et al. (2011). Se disolvieron PCPCs y harina de maíz morado en la mezcla de metanol y agua (70:30 v/v). Este paso se repitió varias veces hasta agotar el material vegetal. Se mezcló una cantidad de 500 μ L de la muestra con 500 μ L de $AlCl_3$ al 20% y 1500 μ L de CH_3COONa al 50%. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 2 h; la absorbancia de la reacción se midió a una longitud de onda de 415 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific.). Se usó una curva de calibración estándar de rutina en el rango de (10 a 100 ppm). La curva obtenida fue ($y = 0.0029x - 0.0008$, $R^2 = 0,9993$). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de rutina (RE) contenidos en 100 g de peso seco (PS) (mg RE/100 g PS).

3.17. Análisis de biocompuestos de PCPC e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase reversa-espectrometría de masas (RP-UPLC-MS)

Las muestras de PCPC e hidrolizados se diluyeron 10 veces con agua destilada desionizada, se agitaron y centrifugaron a $5000 \times g$ durante 5 min. Luego, se retiró 1 ml del sobrenadante y se filtró a través de un filtro de membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) 0,45 μ M en viales.

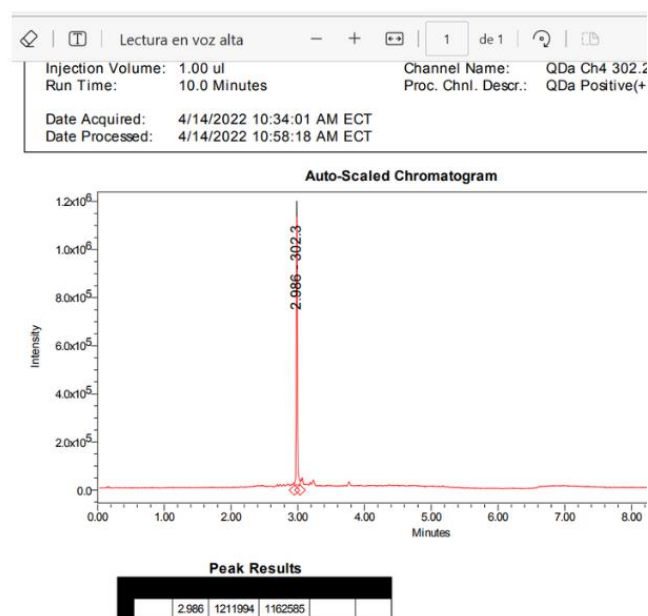
Los componentes fenólicos de bajo peso molecular se midieron mediante la técnica RP-UPLC-MS. Se utilizó UPLC-MS en un detector de masas Acquity H-Class UPLC-QDa (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) con interfaz de ionización por electropulverización. Las

muestras se analizaron mediante una columna ACQUITY UPLC ®BEH C18 (aguas de 2,1 mm × 50 mm × 1,7 µm de tamaño de partícula) a 45°C. Para este análisis se utilizaron prefiltros de 0,2 µm instalados al frente de la columna. Se inyectaron extractos de 10 µL de volumen y se eluyeron a 0,8 mL/min con un gradiente lineal de 1 a 95% de disolvente B (metanol) en disolvente A (agua Milli-Q) durante 5,5 min, luego en modo isocrático (95% del disolvente B) durante 1 min y finalmente se devolvió a las condiciones iniciales.

El espectrómetro de masas, operado en modo positivo, se configuró para escanear el ion hijo de 50 a 650 m/z. Los parámetros de espectrometría de masas optimizados utilizados fueron los siguientes: voltaje capilar, 0,8 kV; tensión de cono, 30 V; energía de colisión, 15 V; temperatura de la fuente, 450°C; y temperatura de desolvatación, 140°C. Se utilizó nitrógeno como gas de desolvatación y cono con un caudal de 760 L/h.

Se utilizó argón como gas de colisión a un caudal de 0,1 ml/min. Se utilizó el detector ACQUITY QDa. Se utilizaron estándares de catequina, epicatequina, quercetina y ácido gálico como configuración para el control de la respuesta iónica seleccionada (SIR) de cada componente. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el software Empower 3.0 (Waters Co. Milford, MA, EE. UU.) (Racine et al., 2019).

Figura 10. Determinación de biocompuestos por cromatografía líquida de Ultra alta resolución UPLC con detector de masas. Cromatograma de Quercetina.



3.18. Propiedades Funcionales de PCPCs e Hidrolizados Gastrointestinales

Las propiedades funcionales de PCPCs e hidrolizados gastrointestinales se evaluaron según los métodos descritos por Quinteros et al. (2022). Se determinaron la solubilidad de la proteína (% PS), la capacidad de absorción de agua (% WAC) y la capacidad de absorción de aceite (% OAC).

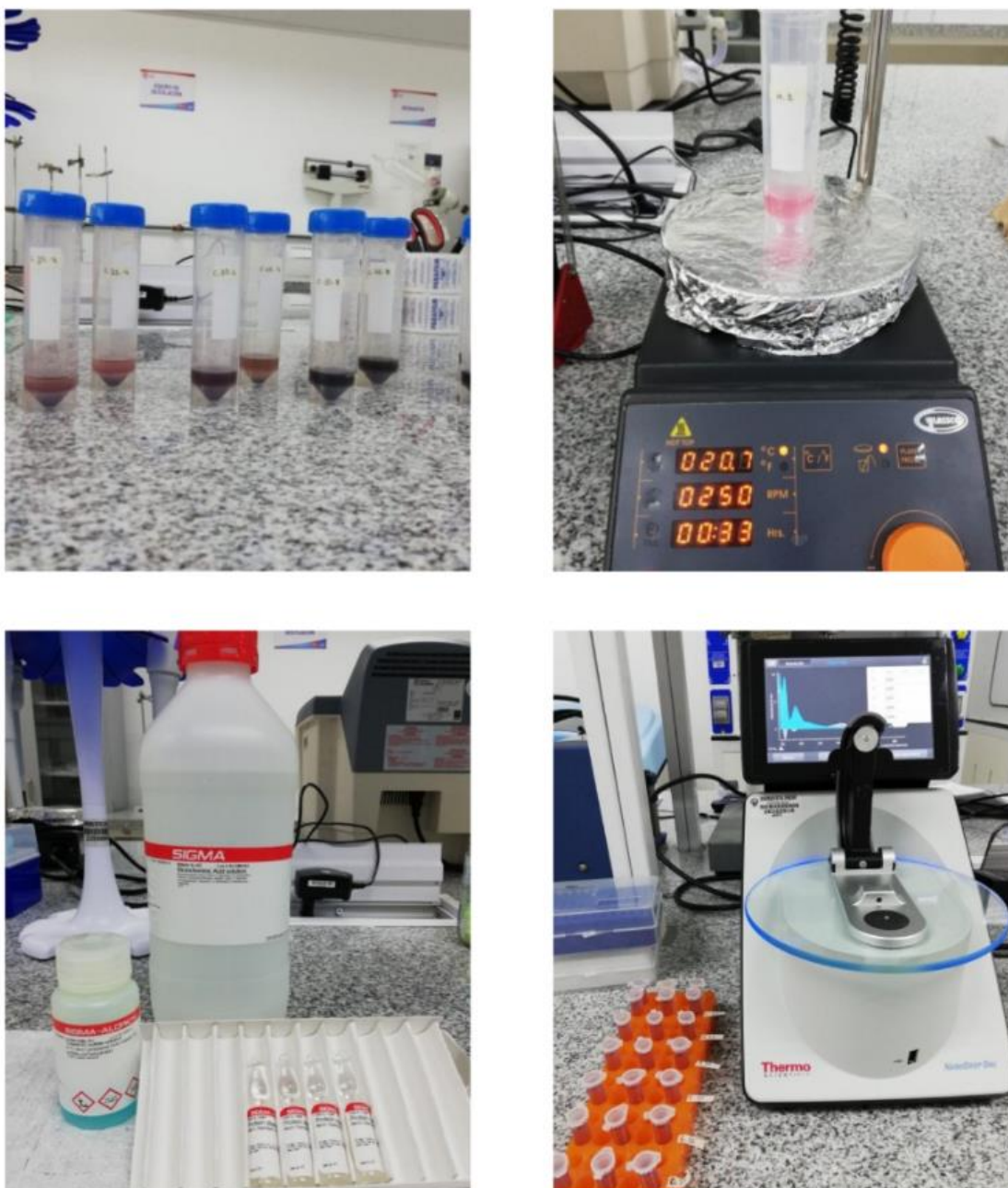
3.18.1. Solubilidad de proteínas (PS)

Los PCPC y sus hidrolizados gastrointestinales (0,2 % p/v, con base en el contenido de proteína en peso de cada muestra) se disolvieron en agua destilada desionizada y el pH de la suspensión se ajustó a pH 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 usando soluciones 0,025N HCl y NaOH. Las suspensiones se agitaron durante 1 h y se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 15 min utilizando una centrífuga (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania).

El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó mediante el kit de ensayo de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) utilizando proteína estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en diferentes concentraciones (0,125 a 2,0 mg/mL). PS se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ PS} = (\text{contenido de proteína del sobrenadante} / \text{contenido de proteína total en la muestra}) \times 100$$

Figura 11. Ensayo de solubilidad de concentrados proteicos de maíz morado.

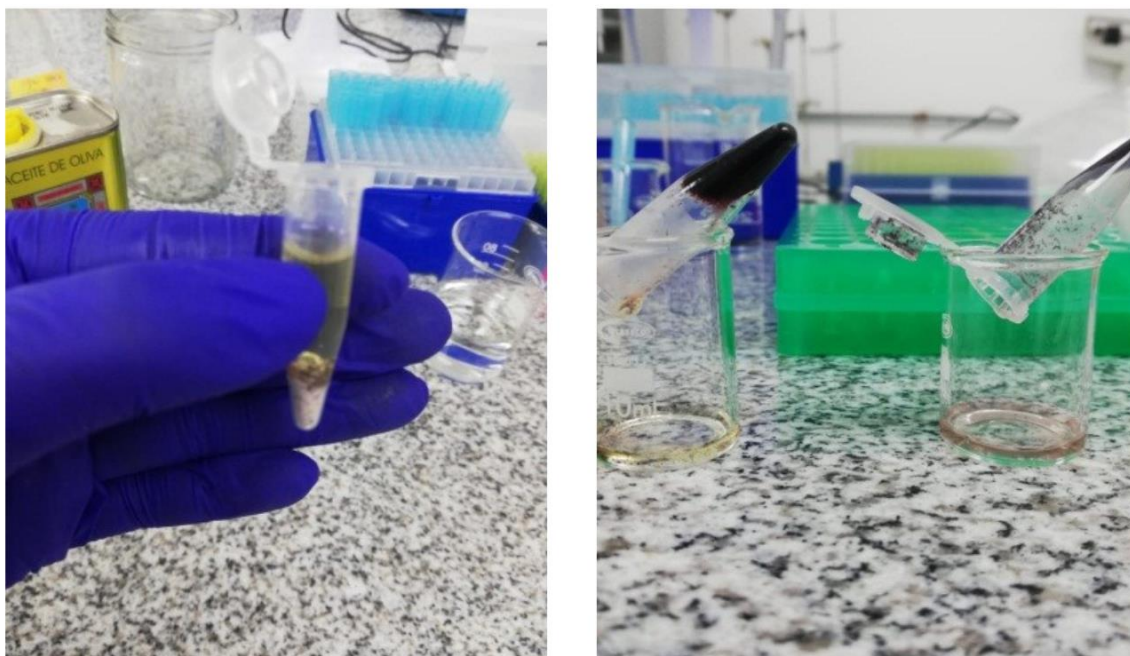


3.18.2. Capacidad de Absorción de Aceite (OAC)

Los PCPC y sus hidrolizados gastrointestinales se disolvieron en aceite de girasol (proporción 1:10 p/v) en un tubo previamente pesado. Las suspensiones se homogeneizaron durante 1 min utilizando un vortex y luego cada 5 min hasta los 30 min. Luego, las suspensiones se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 15 min utilizando una centrífuga (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania). Luego, se drenó el aceite, se inclinó el tubo durante 10 min y se pesó. Los resultados de % OAC se calcularon usando la Ecuación (5):

$$(5) (\%) \text{ OAC} = [(muestra \text{ de peso} + \text{aceite}/muestra \text{ de peso}] \times 100$$

Figura 12. Ensayo para determinar la capacidad de absorción de aceite.



3.18.3. Capacidad de absorción de agua (WAC)

Los PCPC y sus hidrolizados gastrointestinales se disolvieron en agua destilada desionizada en una relación (1:10, p/v) en un tubo previamente pesado. La mezcla se homogeneizó durante 30 s cada 10 min 5 veces. Luego, la mezcla se centrifugó a $4000 \times g$ durante 20 min utilizando una centrífuga (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania). Los tubos se drenaron en un ángulo de 45° durante 10 min y luego se pesaron. El %WAC se calculó utilizando la Ecuación (6):

$$(6) (\%) \text{ WAC} = [(W2 - W1) / W0] \times 100$$

donde $W0$ es el peso de la muestra, $W1$ es el peso del tubo de centrífuga con la muestra y $W2$ es el peso del tubo de centrífuga con los sedimentos.

3.19 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en el manuscrito como media \pm desviación estándar (DE). Todos los ensayos tenían tres repeticiones ($n = 3$). Las diferencias estadísticas de las muestras

utilizadas en este estudio se evaluaron con un análisis ANOVA de una vía ($p < 0,05$) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se expresaron con diferentes letras en superíndice en las tablas y figuras. Este análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Stargraphics.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto al objetivo específico 1: Determinar las condiciones de germinación de semillas de maíz morado andino para producir concentrado de proteína de maíz morado y evaluar su actividad antioxidante

4.1. Análisis proximal de harina de maíz

El análisis proximal de la harina de maíz morado mostró que el contenido de proteína fue $8,58 \pm 0,07\%$, contenido de grasa $5,73 \pm 0,10\%$, contenido de cenizas $0,02 \pm 0,00\%$, contenido de humedad $11,70 \pm 0,05\%$, contenido de fibra $2,91 \pm 0,26\%$ y contenido de carbohidratos $71,06 \pm 0,16\%$. Su composición depende de las condiciones ambientales de los cultivares, temperatura, variedad y tipo de semillas (semillas amarillas, blancas, negras, azules y moradas).

(Trehan et al., 2018) reportaron la composición química de tres variedades de harinas de maíz blanco, amarillo y morado. Informaron un contenido de grasa para la harina de maíz amarillo (2,85–5,23%), la harina de maíz blanco (2,03–4,95%) y la harina de maíz morado (1,70–4,61%). Informaron el contenido de proteína de la harina de maíz amarillo, blanco y morado (8,44–8,70%), (8,73–9,54%) y (9,53–9,88%), respectivamente (Trehan et al., 2018). Mansilla et al. reportaron diferentes genotipos de cultivares de maíz morado de Argentina con contenidos de proteína entre 9,48% a 11,50% y contenidos de grasa entre 6,72% y 8,21%. Los resultados del contenido de proteína de la harina de maíz morado reportados en este estudio fueron inferiores a los informados por los otros investigadores, mientras que el contenido de grasa fue mayor.

4.2 Germinación (%) de Semillas de Maíz Morado

Maíz morado andino (100 semillas) se pusieron en proceso de germinación en la incubadora por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h y 168h a 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. La Tabla 1 mostró el porcentaje de germinación obtenido en diferentes condiciones. Los porcentajes de germinación se obtuvieron con valores entre $0,00 \pm 0,00$ y $63,33 \pm 7,23$. Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron a la temperatura de 25°C con valores de germinación entre 42,00% y 63,33%.

Las semillas incubadas a 15°C por 24h a 96h no mostraron germinación. A las 120h presentaron un $6,00 \pm 0,58\%$ de germinación. Estos valores aumentaron con un tiempo de germinación de 168h, presentando el mayor porcentaje con un valor de 63.33%. El incremento en % de germinación fue proporcional al aumento en el tiempo de incubación de las semillas para germinar. A medida que aumenta la temperatura de germinación, el porcentaje de germinación disminuye. Las tasas de germinado obtenidas a 40°C variaron entre 9,33% y 26,00%. Estos fueron los valores más bajos de germinación obtenidos.

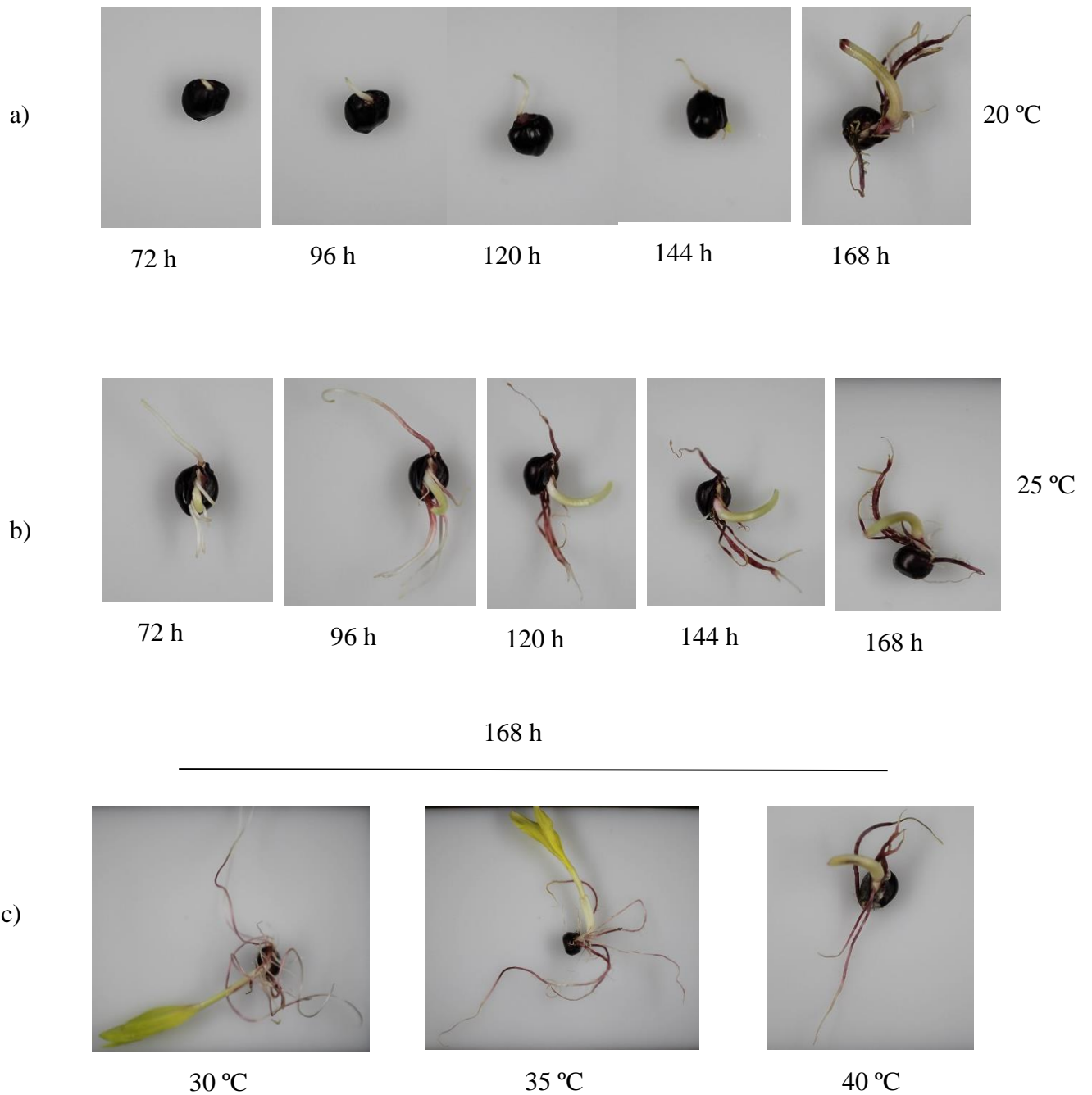
Tabla 1. Porcentaje de germinación a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura de semillas de maíz morado andino.

% de germinación de semillas de maíz morado						
Tiempo (h)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,33 ± 0,58 ^a	9,00 ± 3,56 ^a	20,67 ± 4,04 ^a	9,33 ± 2,08 ^a
48	0,00 ± 0,00	3,33 ± 0,71 ^a	42,00 ± 7,55 ^b	33,00 ± 3,54 ^b	36,67 ± 4,73 ^b	22,67 ± 2,08 ^b
72	0,00 ± 0,00	24,00 ± 6,24 ^b	52,67 ± 8,74 ^c	37,00 ± 3,54 ^b	38,00 ± 5,29 ^b	23,33 ± 2,52 ^b
96	0,00 ± 0,00	38,67 ± 4,62 ^c	54,00 ± 8,19 ^c	41,00 ± 3,54 ^c	38,67 ± 5,69 ^b	23,33 ± 2,52 ^b
120	6,00 ± 0,58 ^a	46,47 ± 7,43 ^d	58,67 ± 8,39 ^d	41,00 ± 3,54 ^c	38,67 ± 5,69 ^b	23,33 ± 2,52 ^b
144	6,00 ± 0,58 ^a	53,33 ± 4,51 ^e	60,00 ± 8,66 ^d	41,00 ± 3,54 ^c	40,00 ± 4,58 ^c	26,00 ± 2,00 ^c
168	6,00 ± 0,58 ^a	56,00 ± 4,58 ^e	63,33 ± 7,23 ^e	41,00 ± 3,54 ^c	40,00 ± 4,58 ^c	26,00 ± 2,00 ^c

Los resultados obtenidos presentan diferencias significativas a $p < 0,05$ cuando se comparan con la incubación temperatura con el tiempo de incubación de la germinación de las semillas de maíz morado andino. gobernador, (Govender et al., 2008) reportaron porcentajes de germinación de variedades amarillas y blancas del norte de KwaZulu-Natal y el sur de Mozambique con valores de 18,70 a 100 % dependiendo de la variedad. El proceso de germinación se realizó a 25°C durante 7-11 días (Govender et al., 2008).

Figura 13. Fotografías de germinación de maíz morado andino. (a) germinación de semillas de maíz morado a 20 °C durante 72, 96, 120, 144 y 168 h; (b) germinación de semillas de

maíz morado a 25 °C durante 72, 96, 120, 144 y 168 h; (c) germinación de semillas de maíz morado a 30 °C, 35 °C y 40 °C durante 168 h.



En la figura 13 se muestran las fotografías registradas de los germinados de maíz morado andino obtenidos en diferentes temperaturas y diferentes tiempos de germinación.

La Figura 13 a, b mostraron las semillas germinadas en 20°C y 25°C durante 72h, 96h, 120h, 144h y 168h de incubación. Todas las semillas mostraron claros signos de germinación con

levantamiento de los cotiledones y elongación de las radículas. La figura 1c mostró la semilla de maíz morado germinada a 30°C, 35°C y 40°C durante 168h. En las fotos, una clara germinación. se observa el proceso y los embriones presentan elongación de las radículas. Granos germinados a 30 °C y 35 °C tienen hojas y raíces claras. El maíz morado germinado a 40 °C obtenido al mismo tiempo mostró un retraso en la germinación.

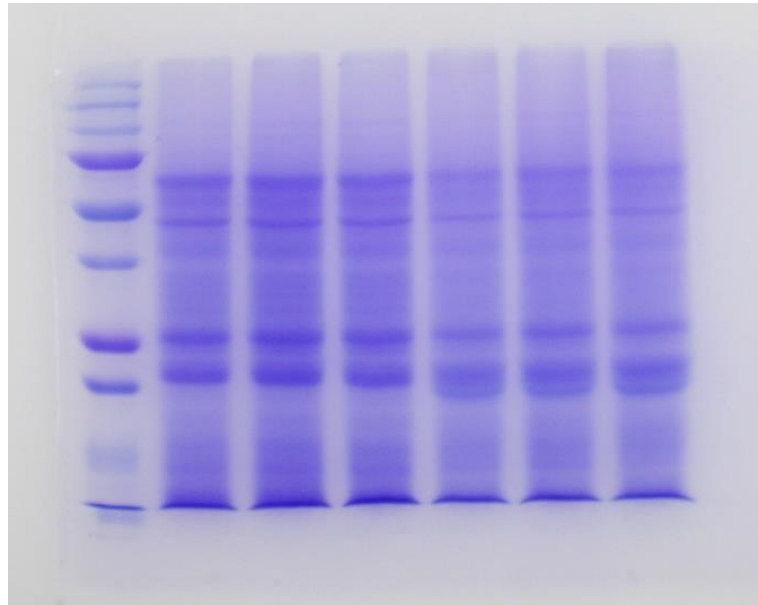
4.3 Perfil de proteína PCPC

Una vez germinadas, las semillas de maíz morado andino se utilizaron para obtener harina. La harina se utilizó para obtener concentrados proteico-fenólicos por extracción alcalina (pH 8,0 y pH 10,0) seguida de precipitación isoeléctrica (pH 4,0, pH 5,0 y pH 6,0). Una vez obtenidas las PCPC, se analizó su perfil proteico mediante la técnica SDS-PAGE. La figura 2 muestra el perfil de proteína PCPC. Figura 2 mostró el perfil PCPC de semillas no germinadas (control).

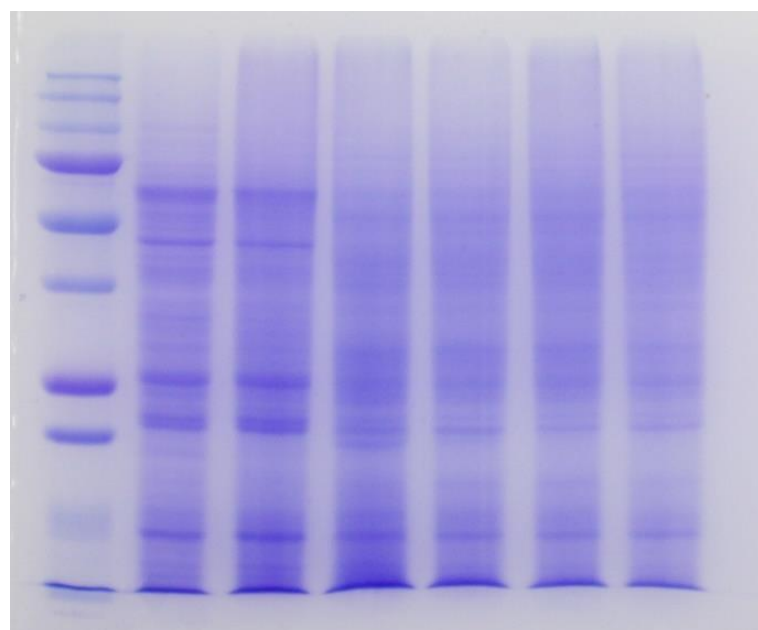
En el gel de poliacrilamida se observaron seis bandas con pesos moleculares de 14,50 kDa, 20,12 kDa, 25,18 kDa, 41,85 kDa, 59,59 kDa y 65,87 kDa. Estas bandas corresponden a albúminas, globulinas y glutelina. Las prolaminas del maíz se denominan zeínas y representan alrededor del 60,00 % de la proteína de las semillas de maíz (peso fresco). Las zeínas se pueden dividir en cuatro subfamilias: α (19 y 22 kDa), γ (50, 27 y 16 kDa), β (15 kDa) y δ (18 y 10 kDa) (Coleman & Larkins, 1999; Esen, 1987; Y. Wu & Messing, 2014).

El perfil de proteína de los PCPC no germinados producidos a pH 8,0 y pH 10,0 a diferentes pH de precipitación (pH 4,0, pH 5,0 y pH 6,0) fue el mismo (Figura 2a). Los PCPC (pH 8,0 y 10 alcalinos y pH 4,0 precipitación isoeléctrica) obtenidos de semillas germinadas a 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C durante 72 h presentaron las mismas bandas con pesos moleculares idénticos a los identificados en el PCPC no germinado con valores de 14.50 kDa, 20.12 kDa, 25.18 kDa, 41.85 kDa, 59.59 kDa y 65.87 kDa (Figura 2 b,c).

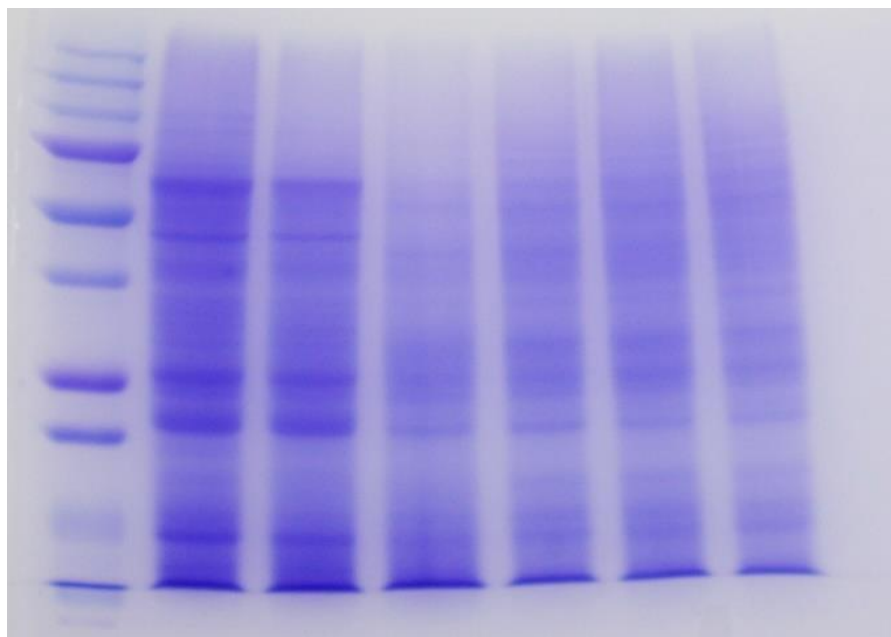
Figura 14. Análisis del perfil proteico de concentrados fenólicos de proteína de maíz morado (PCPC) por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). (a) PCPC no germinado obtenido a (pH 8.0 y pH 10 extracción alcalina) y diferentes pHs de precipitación; (b) PCPC germinado a (pH 8,0 alcalino y pH 4,0 de precipitación) durante 72 h; (c) PCPC germinado a (pH 10 y pH 4,0 de precipitación) durante 72 h.



a) PCPC No- Germinado



b) 72 h PCPC Germinado



c) 72 h PCPC Germinado

4.4. Cuantificación del contenido de proteínas PCPC

El contenido de proteína presente en los PCPC obtenidos de semillas germinadas a las 72 h, 120 h y 168 h incubadas a 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C se cuantificó mediante el Método Dumas. Tabla 2 resume los resultados obtenidos del análisis de cuantificación de proteínas. La concentración de proteína en los PCPC varía entre 9,38 % (8,0–6,0 pH (alcalino-Ip)) y 33,56 % (10,0–4,0 pH (alcalino-Ip)); estos valores corresponden a PCPC germinados a 25 °C. El valor más alto se obtuvo después de 168 h de incubación.

Los PCPC obtenidos a los dos pH de extracción (pH 8,0 y pH 10,0) presentan valores porcentuales de proteína similares. Se observaron pequeñas diferencias en PCPC de brotes 72 h/25 °C, 120 h/20 °C y 120 h/25 °C. Los valores más altos obtenidos fueron PCPC 168 h/25 °C con valores de 29,06 %, 30,00 % y 33,56 %; PCPC 168 h/30 °C presentó valores de 23,75 %, 27,53 % y 29,38 %; PCPC 168 h/35 °C presentó porcentajes de 23,80 %, 27,60 % y 29,40 %. Todos los PCPC obtenidos a partir de semillas de maíz germinadas a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas presentaron valores porcentuales de proteína superiores al porcentaje de harina de maíz proveniente de semillas de maíz sin germinar (8,53%). El análisis estadístico indica diferencias significativas cuando se compara el tiempo de germinación con los pH alcalinos y la precipitación isoelectrica <0,05.

Tabla 2. Contenido de proteína PCPC en maíz morado andino germinado.

pH (alkaline- <i>I</i> p)	72 h	120 h	168h
% Proteína germinada 15 °C			
8.0-4.0	25.16 ± 0.57 ^b	21.81 ± 0.18 ^a	24.00 ± 0.53 ^c
8.0-5.0	24.09 ± 0.22 ^a	21.97 ± 0.22 ^a	23.06 ± 0.44 ^b
8.0-6.0	24.00 ± 0.09 ^a	21.94 ± 0.09 ^a	21.06 ± 0.45 ^a
10.0-4.0	27.16 ± 0.13 ^c	24.88 ± 0.00 ^c	25.31 ± 0.62 ^d
10.0-5.0	26.34 ± 0.04 ^c	24.34 ± 0.14 ^c	23.91 ± 0.49 ^b
10.0-6.0	24.34 ± 0.75 ^a	22.00 ± 0.35 ^b	23.06 ± 0.32 ^b
% Proteína germinada 20 °C			
8.0-4.0	23.16 ± 0.04 ^b	18.63 ± 0.18 ^b	25.72 ± 0.04 ^c
8.0-5.0	22.56 ± 0.00 ^b	23.44 ± 0.09 ^d	16.84 ± 0.04 ^a
8.0-6.0	20.31 ± 0.09 ^a	16.50 ± 0.00 ^a	22.08 ± 0.02 ^b
10.0-4.0	23.50 ± 0.00 ^b	27.06 ± 0.17 ^e	28.19 ± 0.00 ^d
10.0-5.0	22.97 ± 0.13 ^b	24.22 ± 0.13 ^d	24.48 ± 0.07 ^c
10.0-6.0	20.09 ± 0.05 ^a	21.88 ± 0.08 ^c	22.53 ± 0.04 ^b
% Proteína germinada 25 °C			
8.0-4.0	17.78 ± 0.13 ^c	10.69 ± 0.18 ^a	22.16 ± 3.14 ^b
8.0-5.0	18.69 ± 0.09 ^d	9.44 ± 0.18 ^a	19.09 ± 0.13 ^a
8.0-6.0	18.25 ± 0.18 ^d	9.38 ± 0.09 ^a	19.75 ± 0.35 ^a
10.0-4.0	14.88 ± 0.17 ^b	27.50 ± 0.09 ^d	33.56 ± 1.94 ^d
10.0-5.0	13.19 ± 0.04 ^a	16.88 ± 0.08 ^c	29.06 ± 1.33 ^c
10.0-6.0	13.00 ± 0.18 ^a	12.47 ± 0.04 ^b	30.00 ± 0.44 ^c
% Proteína germinada 30 °C			
8.0-4.0	26.56 ± 0.09 ^d	26.44 ± 0.18 ^d	23.75 ± 0.09 ^c
8.0-5.0	25.19 ± 0.22 ^c	24.38 ± 0.00 ^c	21.00 ± 0.09 ^b
8.0-6.0	22.66 ± 0.09 ^a	21.44 ± 0.27 ^a	18.38 ± 0.00 ^a
10.0-4.0	26.25 ± 0.00 ^d	27.28 ± 0.13 ^d	29.38 ± 0.09 ^e
10.0-5.0	26.75 ± 0.18 ^d	26.50 ± 0.00 ^d	27.53 ± 0.14 ^d
10.0-6.0	24.19 ± 0.00 ^b	23.71 ± 0.14 ^b	19.31 ± 0.00 ^a
% Proteína germinada 35 °C			
8.0-4.0	26.60 ± 0.00 ^d	26.50 ± 0.18 ^c	23.80 ± 0.09 ^c
8.0-5.0	25.20 ± 0.18 ^c	24.34 ± 0.04 ^b	21.06 ± 0.19 ^b
8.0-6.0	22.60 ± 0.04 ^a	21.44 ± 0.00 ^a	18.40 ± 0.20 ^a
10.0-4.0	26.25 ± 0.09 ^d	27.25 ± 0.35 ^c	29.40 ± 0.00 ^e
10.0-5.0	25.53 ± 0.18 ^c	26.56 ± 0.27 ^c	27.60 ± 0.19 ^d
10.0-6.0	24.19 ± 0.00 ^b	23.75 ± 0.00 ^b	19.35 ± 0.09 ^a
% Proteína germinada 40 °C			
8.0-4.0	21.94 ± 0.88 ^b	22.75 ± 0.09 ^a	24.53 ± 0.49 ^c
8.0-5.0	20.63 ± 0.09 ^b	22.22 ± 0.13 ^a	19.94 ± 1.06 ^b
8.0-6.0	13.47 ± 2.25 ^a	22.31 ± 0.09 ^a	15.60 ± 2.96 ^a
10.0-4.0	28.56 ± 0.35 ^d	26.38 ± 0.35 ^b	21.34 ± 0.04 ^b
10.0-5.0	27.03 ± 1.64 ^d	23.66 ± 0.75 ^a	21.91 ± 0.04 ^b
10.0-6.0	24.13 ± 1.77 ^c	22.34 ± 2.87 ^a	14.06 ± 0.27 ^a

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar ($n = 3$) y se evaluaron mediante Anova unidireccional y prueba de Turquía ($p < 0,05$). Las diferencias estadísticas se indicaron con letras diferentes.

La semilla de maíz tiene albúminas proteicas que representan el 8,00 % de la proteína, DW. Las proteínas de las albúminas son solubles en una solución de agua. Las proteínas globulinas representan el 9,00 % de las proteínas solubles en sales y las proteínas glutelinas representan el 40,00 % de las proteínas, DW, las cuales son solubles en soluciones alcalinas (Mertz et al., 1964).

PCPC presentó albúminas, glutelinas y proteínas globulínicas. Se utilizaron semillas normales de maíz morado en este estudio para obtener PCPC germinadas. Los contenidos de proteína reportados en este trabajo están en línea con los valores reportados en la literatura para diferentes concentrados de proteína de zeína. El concentrado de proteína de maíz se utiliza para aplicaciones industriales como adhesivos, plásticos biodegradables, recubrimientos (comestibles, resistentes a la humedad) para productos alimenticios, polvos cosméticos, fibras dietéticas, fibras textiles, pesticidas microencapsulados, microesferas, formulaciones de tabletas de matriz de acción prolongada, sistema de suministro de nutrientes para rumiantes, edulcorantes de alta potencia, fijador del cabello y otros fines industriales (Esen, 1986; Lai et al., 1997; Mathiowitz et al., 1991; Morawsky et al., 1996; Peres & Correa, 1996; Sharif et al., 2019; Shukla & Cheryan, 2001; Swallen, 1941; Trezza & Vergano, 1994; J. Y. Wang et al., 1991; M. Zhang et al., 1997).

4.5. Contenido de TPC de PCPC germinados

El contenido de TPC se determinó en PCPC de semillas de púrpura andina germinadas durante 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 122 h, 144 h y 168 h a 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C. Tabla 3 mostró el valor de TPC en PCPC germinados. El PCPC germinado tuvo un alto contenido de TPC con un rango de 350,95 a 1820 mg GAE/g PCPC, DW, el PCPC germinado/72 h/25 °C tuvo un valor alto de 1820,00 mg GAE/g PCPC, DW. PCPC/72 h/25 °C tuvo un valor de TPC alto en los dos grupos (pH 8,0 y pH 10) con 1820,00, 1803,00 y 1746,00 mg GE/g PCPC, DW para el grupo obtenido a pH 8,0 de extracción y 1550,00,

1736,00 y 1426,00 mg GAE/g PCPC, DW para el grupo pH 10. PCPC/168 h/35 °C presentó un valor de TPC de 989,05–1605,71 mg GAE/g PCPC, DW. Los valores de TPC obtenidos a tiempos de germinación más largos y temperatura más alta tuvieron valores más altos de contenido de TPC. El pH alcalino (pH 8.0 y pH 10.0) afecta el contenido de TPC. Se observaron diferencias significativas a $p < 0.05$ cuando se comparó pH vs tiempo de germinación.

Tabla 3. Contenido fenólico total (TPC) de PCPC germinados.

TPC (mg GAE/g PCPC, DW)							
pH	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
TPC de germinado a 15 °C							
8.0-4.0	910.48 ± 0.02 ^b	834.29 ± 0.02 ^b	1248.57 ± 0.11 ^d	1170.00 ± 0.11 ^b	900.95 ± 0.04 ^a	1205.71 ± 0.03 ^c	1289.05 ± 0.03 ^d
8.0-5.0	1029.52 ± 0.01 ^c	734.29 ± 0.01 ^a	1158.10 ± 0.03 ^c	1167.62 ± 0.04 ^b	943.81 ± 0.03 ^b	755.71 ± 0.01 ^a	1112.86 ± 0.03 ^b
8.0-6.0	710.48 ± 0.01 ^a	712.86 ± 0.01 ^a	812.86 ± 0.01 ^a	898.57 ± 0.02 ^a	1143.81 ± 0.02 ^d	1243.81 ± 0.03 ^d	886.67 ± 0.05 ^a
10.0-4.0	948.57 ± 0.01 ^b	1460.48 ± 0.01 ^e	1243.81 ± 0.03 ^d	1379.52 ± 0.04 ^c	1172.38 ± 0.01 ^e	1329.52 ± 0.03 ^e	1381.90 ± 0.02 ^e
10.0-5.0	1177.14 ± 0.02 ^d	1074.76 ± 0.01 ^d	1134.29 ± 0.06 ^c	1370.00 ± 0.02 ^c	1165.24 ± 0.02 ^e	1458.10 ± 0.05 ^f	1574.76 ± 0.05 ^f
10.0-6.0	1058.10 ± 0.01 ^c	984.29 ± 0.01 ^c	936.67 ± 0.03 ^b	1400.95 ± 0.04 ^d	998.57 ± 0.06 ^c	962.86 ± 0.02 ^b	1196.19 ± 0.04 ^c
TPC de germinado a 20 °C							
8.0-4.0	540.32 ± 0.01 ^b	613.33 ± 0.00 ^b	1248.57 ± 0.11 ^d	1170.00 ± 0.1 ^b	900.95 ± 0.04 ^a	1205.71 ± 0.03 ^c	1289.05 ± 0.03 ^d
8.0-5.0	621.27 ± 0.01 ^c	699.05 ± 0.01 ^c	1158.10 ± 0.03 ^c	1167.62 ± 0.04 ^b	943.81 ± 0.03 ^b	755.71 ± 0.01 ^a	1112.86 ± 0.03 ^b
8.0-6.0	416.51 ± 0.01 ^a	554.60 ± 0.01 ^a	812.86 ± 0.01 ^a	898.57 ± 0.02 ^a	1143.81 ± 0.02 ^c	1243.81 ± 0.03 ^c	886.67 ± 0.05 ^a
10.0-4.0	694.29 ± 0.01 ^d	741.90 ± 0.01 ^d	1243.81 ± 0.03 ^d	1379.52 ± 0.04 ^c	1172.38 ± 0.01 ^c	1329.52 ± 0.03 ^d	1381.90 ± 0.02 ^e
10.0-5.0	656.19 ± 0.01 ^d	591.11 ± 0.01 ^a	1134.29 ± 0.06 ^c	1370.00 ± 0.02 ^c	1165.24 ± 0.02 ^c	1458.10 ± 0.05 ^e	1574.76 ± 0.05 ^f
10.0-6.0	614.92 ± 0.01 ^c	762.54 ± 0.01 ^d	936.67 ± 0.03 ^b	1400.95 ± 0.04 ^d	998.57 ± 0.06 ^c	962.86 ± 0.02 ^b	1196.19 ± 0.04 ^c
TPC de germinado a 25 °C							
8.0-4.0	453.33 ± 0.03 ^b	536.67 ± 0.02 ^c	1820.00 ± 0.01 ^d	1491.43 ± 0.03 ^e	1100.95 ± 0.09 ^d	1258.10 ± 0.01 ^c	1529.52 ± 0.02 ^f
8.0-5.0	350.95 ± 0.04 ^a	522.38 ± 0.03 ^c	1803.33 ± 0.05 ^d	1217.62 ± 0.09 ^b	920.00 ± 0.05 ^b	1081.90 ± 0.01 ^a	1250.95 ± 0.02 ^b
8.0-6.0	1577.14 ± 0.04 ^f	508.10 ± 0.03 ^b	1746.19 ± 0.06 ^c	1212.86 ± 0.17 ^b	781.90 ± 0.04 ^a	1136.67 ± 0.01 ^b	1155.71 ± 0.03 ^a
10.0-4.0	660.48 ± 0.01 ^d	493.81 ± 0.02 ^b	1550.95 ± 0.10 ^b	1398.57 ± 0.05 ^d	1541.43 ± 0.04 ^f	1620.00 ± 0.00 ^e	1315.24 ± 0.01 ^c
10.0-6.0	617.62 ± 0.01 ^c	531.90 ± 0.01 ^d	1736.67 ± 0.03 ^b	1284.29 ± 0.04 ^d	1265.24 ± 0.06 ^c	1362.86 ± 0.02 ^b	1436.67 ± 0.04 ^c

5.0	0.05 ^c	0.02 ^c	0.08 ^c	± 0.09 ^c	0.01 ^e	± 0.06 ^d	0.03 ^e
10.0-	1172.38	384.29 ±	1429.52 ±	1003.33	972.38 ±	1284.29	1355.71 ±
6.0	± 0.04 ^e	0.02 ^a	0.03 ^a	± 0.03 ^a	0.03 ^c	± 0.03 ^c	0.02 ^d

TPC de germinado a 30 °C

8.0-	1143.81	993.81 ±	1217.62 ±	1222.38	1324.76 ±	1277.14	1265.24 ±
4.0	± 0.02 ^b	0.04 ^b	0.02 ^c	± 0.05 ^b	0.03 ^c	± 0.01 ^b	0.06 ^b
8.0-	1179.52	1150.95 ±	1229.52 ±	1441.43	1196.19 ±	1258.10	1343.81 ±
5.0	± 0.04 ^c	0.03 ^e	0.18 ^c	± 0.02 ^e	0.02 ^b	± 0.01 ^b	0.03 ^c
8.0-	1179.52	920.00 ±	927.14 ±	1003.33	1015.24 ±	950.95 ±	979.52 ±
6.0	± 0.04 ^c	0.01 ^a	0.02 ^a	± 0.01 ^a	0.02 ^a	0.01 ^a	0.04 ^a
10.0-	1486.67	1155.71 ±	1284.29 ±	1391.43	1472.38 ±	1386.67	1389.05 ±
4.0	± 0.03 ^c	0.03 ^d	0.05 ^c	± 0.07 ^d	0.02 ^e	± 0.01 ^d	0.07 ^d
10.0-	1158.10	1008.10 ±	1346.19 ±	1481.90	1408.10 ±	1358.10	1631.90 ±
5.0	± 0.01 ^b	0.05 ^b	0.06 ^d	± 0.02 ^e	0.05 ^d	± 0.01 ^c	0.03 ^e
10.0-	1022.38	1103.33 ±	1191.43 ±	1300.95	1329.52 ±	1365.24	1393.81 ±
6.0	± 0.03 ^a	0.01 ^c	0.06 ^b	± 0.01 ^c	0.02 ^c	± 0.01 ^c	0.03 ^d

TPC de germinado a 35 °C

8.0-	1500.95	1170.00 ±	1355.71 ±	1396.19	1289.05 ±	1424.76	1448.57 ±
4.0	± 0.03 ^b	0.01 ^c	0.01 ^c	± 0.04 ^d	0.05 ^b	± 0.04 ^e	0.03 ^c
8.0-	1715.24	979.52 ±	1227.14 ±	1298.57	1467.62 ±	1210.48	1436.67 ±
5.0	± 0.06 ^e	0.02 ^a	0.02 ^b	± 0.04 ^c	0.06 ^c	± 0.04 ^b	0.05 ^c
8.0-	1131.90	1074.76 ±	1010.48 ±	936.67 ±	889.05 ±	984.29 ±	989.05 ±
6.0	± 0.03 ^a	0.02 ^b	0.02 ^a	0.03 ^a	0.03 ^a	0.04 ^a	0.03 ^a
10.0-	1708.10	1484.29 ±	1455.71 ±	1070.00	1446.19 ±	1272.38	1605.71 ±
4.0	± 0.02 ^e	0.02 ^d	0.02 ^d	± 0.00 ^b	0.02 ^c	± 0.02 ^c	0.05 ^d
10.0-	1620.00	1648.57 ±	1872.38 ±	1446.19	1534.29 ±	1289.05	1605.71 ±
5.0	± 0.00 ^d	0.01 ^e	0.01 ^f	± 0.04 ^e	0.05 ^d	± 0.05 ^c	0.02 ^d
10.0-	1593.81	1667.62 ±	1767.62 ±	1510.48	1446.19 ±	1327.14	1174.76 ±
6.0	± 0.03 ^c	0.02 ^e	0.02 ^e	± 0.01 ^f	0.03 ^c	± 0.04 ^d	0.03 ^b

TPC de germinado a 40 °C

8.0-	1150.95	1120.00 ±	605.71 ±	774.76 ±	917.62 ±	917.62 ±	917.62 ±
4.0	± 0.04 ^c	0.06 ^b	0.02 ^a	0.04 ^c	0.03 ^b	0.03 ^b	0.03 ^b
8.0-	896.19 ±	912.86 ±	743.81 ±	703.33 ±	955.71 ±	955.71 ±	955.71 ±
5.0	0.04 ^b	0.04 ^a	0.04 ^c	0.03 ^b	0.05 ^c	0.05 ^c	0.02 ^c
8.0-	755.71 ±	1110.48 ±	691.43 ±	674.76 ±	824.76 ±	824.76 ±	824.76 ±
6.0	0.06 ^a	0.07 ^b	0.06 ^b	0.06 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.08 ^a
10.0-	1298.57	1424.76 ±	1077.14 ±	850.95 ±	974.76 ±	974.76 ±	974.76 ±
4.0	± 0.04 ^e	0.09 ^d	0.03 ^d	0.03 ^d	0.02 ^c	0.02 ^c	0.01 ^c
10.0-	1236.67	1177.14 ±	1079.52 ±	953.33 ±	1279.52 ±	1279.52	1279.52 ±
5.0	± 0.04 ^d	0.01 ^c	0.02 ^d	0.06 ^e	0.05 ^e	± 0.05 ^e	0.01 ^e
10.0-	1327.14	1053.33 ±	1070.00 ±	924.76 ±	1117.62 ±	1117.62	1117.62 ±
6.0	± 0.00 ^f	0.03 ^c	0.03 ^d	0.05 ^e	0.03 ^d	± 0.03 ^d	0.03 ^d

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (n = 3) y se evaluaron mediante Anova unidireccional y prueba de Turquía (p < 0,05). Las diferencias estadísticas se indicaron con letras diferentes.

Mansilla et al. (2020) describieron el crecimiento del maíz morado en Argentina con valores de TPC entre 438,00 y 1933,00 mg GAE/100g, DW. (Trehan et al., 2018)

describieron el contenido de TPC de tres variedades de semillas de maíz amarillas, blancas y moradas: maíz amarillo (1170,00–1640,00 mg GAE/g de muestra), maíz blanco (903,00–1332,00 mg GAE/g de muestra) y maíz morado (1223,00–1843,00 mg GAE/g Muestra). De la Parra et al. (2007) describieron el contenido de TPC de cinco variedades diferentes de semillas de maíz amarillo, blanco, rojo, azul y alto contenido de carotenoides con valores de 260,70–320,10 mg GAE/100 g DW. Mora-Rochin et al. (2010) reportaron un contenido de TPC de harina de maíz blanco (167.40 mg GAE/100 g, PS), maíz azul (142.10 mg GAE/100 g PS), maíz rojo (140.70 mg GAE/100 g PS), y maíz amarillo (137,70 mg GAE/100 g DW). Los concentrados de PCPC de granos germinados aumentaron el contenido de TPC en comparación con el contenido de TPC informado para la harina de maíz morado.

El pH de precipitación isoelectrica (pH 4.0, pH 5.0 y pH 6.0) utilizado para precipitar las proteínas permite el aislamiento de una cantidad considerable de componentes fenólicos. Los PCPC continúan manteniendo una coloración púrpura que indica su presencia en concentrados de proteínas. El fenólico total se puede separar de los PCPC con extracciones repetidas de metanol. Seis procesos de extracción consecutivos permitieron aislar el 100,00% de los componentes fenólicos presentes en los PCPCs a partir de semillas germinadas. Todos los PCPC probados en este trabajo con extracción alcalina y precipitación isoelectrica tenían un alto contenido de TPC. Se deben realizar trabajos futuros en HPLC-MS-MS para identificar los componentes fenólicos presentes en los PCPC y determinar si existen diferencias en el fenólico en función del pH de extracción y el pH de precipitación.

(Lucrecia Piñuel, Vilcacundo, et al., 2019) describieron concentrado de proteína de frijol rojo (RBPC) de *Phaseolus vulgaris* con alta actividad antioxidante (ABTS y FRAP) y capacidad para inhibir la peroxidación lipídica en el modelo de pez cebra. Informaron que RBPC tenía un alto contenido de TPC con valores de 135,57–521,66 mg GAE/g por muestra. RBPC mostró actividad antioxidante por ABTS con valores de 81,55–257,12 μ mol TE/g de muestra dependiente del pH analizado y un valor de FRAP de 45,16–95,80 dependiente del pH analizado. Informaron que la actividad antioxidante de RBPC podría deberse a la presencia de polifenoles en RBPC.

A la luz de la discusión anterior, consideramos que en los concentrados proteicos obtenidos de plantas se debe considerar la presencia de fenoles en las muestras y su posible influencia en las actividades biológicas que se evalúan. Por ello, decidimos denominarlos concentrados fenólicos de proteína de maíz morado (PCPC).

4.6. Actividad antioxidante de los PCPC germinados por métodos ABTS y FRAP

Los PCPC germinados obtenidos a pH 10,0 de extracción alcalina y pH 4,0 de precipitación, 48–168 h y temperaturas de incubación de 20–40 °C se utilizaron para evaluar la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y FRAP. Tabla 4 mostró los valores de actividad antioxidante de PCPCs por el método ABTS. Los valores de actividad antioxidante de los PCPC variaron entre 175,37 μmol y 804,35 $\mu\text{mol TE/g PCPC}$, rango DW. PCPC/35 °C presentó valores superiores entre 196,42 μmol a 804,35 $\mu\text{mol TE/g PCPC}$, DW. El valor más alto se registró para PCPC/144 h/35 °C. En general, los altos valores de actividad antioxidante estuvieron relacionados con la alta temperatura y el tiempo de germinación. Al comparar los grupos de temperaturas vs tiempos de germinación se observaron diferencias estadísticas.

(Trehan et al., 2018) reportaron actividad antioxidante de harinas de maíz amarillo, blanco y morado por el método ABTS y DPPH. Informaron valores de 3,81–4,92 $\mu\text{mol TE/mg}$ de harina de maíz amarillo, 3,88–4,53 $\mu\text{mol TE/mg}$ de harina de maíz blanco y 4,18–4,83 $\mu\text{mol TE/mg}$ de harina de maíz morado. Informaron sobre la actividad antioxidante de la harina de maíz morado utilizando el método DPPH con valores de 0,77–0,84 $\mu\text{mol TE/mg}$ de harina de maíz morado. Estos autores reportaron actividades antioxidantes de panecillos elaborados con harinas de maíz amarillo, blanco y morado, pero con valores más bajos que las harinas.

Tabla 4. Actividad antioxidante de PCPC por el método del ácido 2,2-azinobis, 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).

ABTS ($\mu\text{mol TE/g PCPC, DW}$)						
Germinado PCPC-pH10.0/pH4.0						
Time (h)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
24	365,20 \pm 0.01 ^d	323,90 \pm 0.01 ^c	240,45 \pm 0.01 ^b	497.00 \pm 0.05 ^d	564.44 \pm 0.09 ^a	619.18 \pm 0.05 ^f
48	364,20 \pm 0.01 ^d	348,62 \pm 0.01 ^c	242,08 \pm 0.01 ^b	246.02 \pm 0.05 ^a	407.71 \pm 0.10 ^d	546.10 \pm 0.02 ^e
72	618,48 \pm 0,04 ^c	531.55 \pm 0.02 ^d	496.20 \pm 0.03 ^c	453.34 \pm 0.03 ^c	506.91 \pm 0.06 ^e	215.52 \pm 0.06 ^a
96	603,87 \pm 0,03 ^c	234.06 \pm 0.01 ^b	246.06 \pm 0.03 ^b	417.63 \pm 0.03 ^b	196.42 \pm 0.03 ^a	498.61 \pm 0.05 ^d
120	407,04 \pm 0,01 ^b	197.87 \pm 0.06 ^a	570.97 \pm 0.07 ^d	493.02 \pm 0.04 ^d	402.75 \pm 0.09 ^c	404.77 \pm 0.07 ^b
144	283,54 \pm 0,05 ^a	562.68 \pm 0.02 ^e	175.37 \pm 0.01 ^a	547.58 \pm 0.02 ^e	804.35 \pm 0.08 ^e	488.44 \pm 0.05 ^d
168	490,21 \pm 0,08 ^b	571.49 \pm 0.09 ^e	603.60 \pm 0.03 ^e	278.57 \pm 0.06 ^a	235.10 \pm 0.04 ^b	470.05 \pm 0.01 ^c

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3) y se evaluaron mediante Anova unidireccional y prueba de Turquía (p < 0,05). Las diferencias estadísticas se indicaron con letras diferentes.

Tabla 5. Actividad antioxidante de PCPC por el método del poder antioxidante reductor férrico (FRAP).

FRAP ($\mu\text{mol TE/g PCPC, DW}$)						
Germinado PCPC pH 10.0-pH 4.0						
Time (h)	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
24	257,98 \pm 0.01 ^c	208,58 \pm 0.01 ^a	154,86 \pm 0.01 ^a	155.52 \pm 0.03 ^a	168.25 \pm 3.33 ^a	173.61 \pm 0.01 ^a
48	243,44 \pm 0.01 ^c	243,40 \pm 0.01 ^b	165,11 \pm 0.02 ^a	454.86 \pm 0.01 ^a	771.68 \pm 0.67 ^c	611.19 \pm 0.09 ^c
72	741,49 \pm 0.09 ^d	770.21 \pm 0.21 ^d	678.18 \pm 0.10 ^d	815.04 \pm 0.20 ^c	922.25 \pm 0.52 ^d	628.94 \pm 0.70 ^c
96	807,29 \pm 0.09 ^e	339.15 \pm 0.36 ^b	335.36 \pm 0.91 ^c	750.69 \pm 0.44 ^b	349.39 \pm 0.02 ^a	552.42 \pm 0.59 ^b
120	100,46 \pm 0.21 ^a	286.71 \pm 0.69 ^c	772.85 \pm 0.29 ^c	877.92 \pm 0.36 ^d	747.02 \pm 0.09 ^c	452.69 \pm 0.06 ^a
144	121,00 \pm 0,21 ^b	751.10 \pm 0.49 ^d	236.10 \pm 1.52 ^b	984.83 \pm 0.38 ^e	363.58 \pm 0.51 ^a	699.23 \pm 3.17 ^d
168	120,01 \pm 0.21 ^b	800.83 \pm 0.30 ^e	817.12 \pm 0.55 ^e	762.63 \pm 0.13 ^b	435.30 \pm 0.38 ^b	701.44 \pm 0.35 ^e

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3) y se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y prueba de Turquía (p < 0,05). Las diferencias estadísticas se indicaron con letras diferentes.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de las PCPCs por el método FRAP. Las muestras mostraron valores con 100.46 a 984.83 μmol

TE/g PCPC, DW. El valor más alto se observó para PCPC/144 h/30 °C con 984,83 μ mol TE/g PCPC, DW. El PCPC germinado a 35 °C presentó valores entre 168.25 μ mol a 922.25 μ mol TE/g PCPC, DW. En general, se observaron mayores actividades antioxidantes para un comportamiento similar a altas temperaturas y altos tiempos de germinación presentando mayor actividad antioxidante.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas cuando los grupos de temperaturas se compararon con los tiempos de incubación en $p < 0,05$. (Coco & Vinson, 2019) informaron actividad antioxidante del grano crudo de 8,73 a 13,40 mg de catequina/g para nueve variedades de maíz mediante el método FRAP. El grano crudo se sometió a simulación de digestión in vitro. La actividad antioxidante se evaluó por el método FRAP. Encontraron un valor de 0,76 mg de catequina/g de muestra. (Z. Yang & Zhai, 2010) reportaron actividad antioxidante del contenido total de antocianinas (TAC) aislado de granos de maíz morado usando los métodos DPPH, FRAP y TEAC (16.20 mmol y 18.70 mmol de FeSO₄ /g PS).

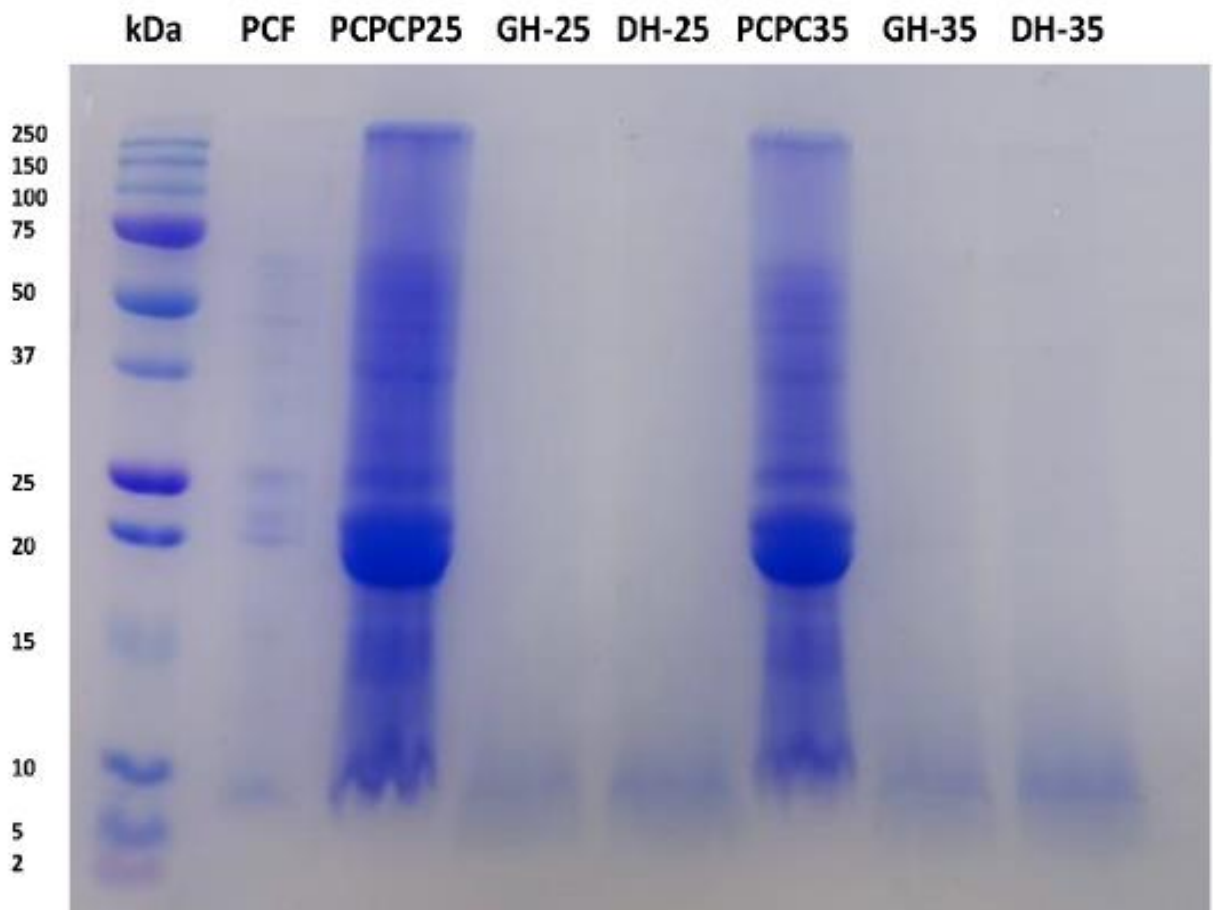
Varios investigadores han informado una relación entre el contenido de polifenoles y antocianinas de los granos de maíz morado y sus actividades antioxidantes (Z. Yang & Zhai, 2010) (Lopez-Martinez et al., 2014) describieron la actividad antioxidante de tres variedades de maíz morado utilizando métodos de actividad de eliminación de radicales de óxido nítrico y actividad de eliminación de radicales superóxido. Los extractos etanólicos mostraron una fuerte actividad antioxidante en el siguiente orden: púrpura genérico > Oaxaca 332 > Veracruz 42 con 62,00%, 48,00% y 32,00% de actividad depuradora de NO, respectivamente.

El protocolo utilizado en este estudio para la obtención de PCPC antioxidante fue validado a partir de un lote de semillas de maíz morado andino de la variedad (*Zea mays* L., racimo de uvas INIAP-199) cultivadas en Guaranda, Ecuador. El contenido de proteínas y polifenoles presentes en las semillas puede variar según la variedad probada y las condiciones de crecimiento de las semillas. Por esta razón, este protocolo podría validarse con diferentes variedades de semillas de maíz (maíz morado, blanco y amarillo) cultivadas en diferentes condiciones ambientales, diferentes condiciones de riego y diferentes condiciones de fertilización. El protocolo también podría validarse en semillas de maíz transgénico para comparar los resultados.

Respecto al objetivo específico 2: Evaluar las propiedades funcionales de los compuestos fitoquímicos del concentrado de proteína de maíz morado germinado y sus hidrolizados gastrointestinales

4.7. Análisis de Perfil Proteico de PCPC e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)

Figura 15. Análisis de perfil proteico de PCF, PCPC25, PCPC35 e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35) por electroforesis SDS-PAGE. PCF (harina de maíz morado), PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C). GH25 (hidrolizado gástrico de PCPC25), DH25 (hidrolizado duodenal de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico de PCPC35) y DH35 (hidrolizado duodenal de PCPC35).



La Figura 15 muestra el perfil proteico de la harina de maíz morado, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados gastrointestinales. El perfil proteico de la harina de maíz morado presenta

bandas con un rango de 19.99 a 64.31 kDa, mientras que PCPC25 y PCPC35 presentan un perfil proteico con bandas entre 18.56 kDa y 321.27 kDa. El documentador de gel aprecia la ausencia de bandas en los hidrolizados gástricos y duodenales de los dos PCPC. Las bandas 19.99 kDa, 25.84 kDa y 47.55 kDa se encuentran en harina de maíz morado, PCPC25 y PCPC35. Las bandas que expresan mayor intensidad en los geles son las bandas de 18,56 kDa y 19,99 kDa presentes en los PCPC.

En un trabajo anterior, (E. Vilcacundo et al., 2020) describieron el perfil proteico de PCPC. El perfil proteico de las PCPC se caracterizó por la presencia de seis bandas con pesos moleculares de 14,50 kDa, 20,12 kDa, 25,18 kDa, 41,85 kDa, 59,59 kDa y 65,87 kDa. Estos PCPC se germinaron durante 72 h a 15, 20, 25, 30, 34 y 40 °C y se obtuvieron a pH alcalino 8,0 y precipitación pH 4,0. En este estudio, los PCPC se germinaron durante 5 días a 25 y 35°C y se obtuvieron a pH alcalino 8,0 y precipitación pH 5,0. Estas diferencias en el proceso de obtención de PCPC pueden generar diferentes proteínas. El contenido de proteína de los granos de maíz se compone principalmente de proteínas de prolamina o zeína (40%), seguidas de proteínas de glutelina (30%), con bajas cantidades de proteínas de globulina y albúmina (5%) (Díaz-Gómez et al., 2017; L. Wang et al., 2008). Las proteínas zeína tienen cuatro subfamilias, denominadas α (19 kDa y 22 kDa), γ (50 kDa, 27 kDa y 16 kDa), β (15 kDa) y δ (18 kDa y 10 kDa) (Coleman Craig E. and Larkins, 1999; Esen, 1987; Y. Wu & Messing, 2014).

Los hidrolizados gastrointestinales de PCPC25 y PCPC35 también se analizaron mediante SDS-PAGE. El fotodocumentador de gel no registró ninguna banda en los hidrolizados gástrico y duodenal de ambas muestras.

En general, el perfil proteico cambió claramente debido a las condiciones de la digestión gastrointestinal. Aun así, se aprecia una banda de menos de 10 kDa. Wu et al., (2021) describieron el perfil proteico de SPI, SPIH1, SPIH2 y SPIH3 mediante la técnica de HPLC. Encontraron que SPI presentó picos correspondientes principalmente a pesos moleculares superiores a 10 kDa, y los hidrolizados presentaron picos correspondientes a pesos moleculares superiores a 10 kDa con porcentajes de 45,26%, 26,2% y 12,11%, respectivamente. Los picos correspondieron a 1–5 kDa para SPI (5,39%), SPIH1 (26,27%),

SPIH2 (37,34%) y SPIH3 (36,23%). Se puede observar que los hidrolizados presentaron principalmente proteínas de bajo peso molecular. El perfil proteico de los hidrolizados se ve afectado por las condiciones de hidrólisis (tipo de enzimas, pH, temperatura y tiempo). El porcentaje de hidrólisis también es un factor determinante en el perfil proteico, y este depende del conjunto de condiciones de hidrólisis.

4.8. Composición Elemental de PCPCs e Hidrolizados y Cuantificación del % Hidrólisis de Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)

Se realizó un análisis elemental de las muestras. Se determinó y calculó el porcentaje de hidrólisis en los hidrolizados gastrointestinales de PCPC (Tabla1). El porcentaje de carbono presentó valores muy altos en PCF, PCPC25 y PCPC35; lo mismo ocurrió con el porcentaje de hidrógeno. Mientras tanto, el porcentaje de azufre fue alto para las muestras PCPC25, DH25 y PCPC35. El porcentaje de nitrógeno presentó los valores más altos para PCPC25 y PCPC35 (7,81% N y 7,31% N) sin diferencias significativas entre ellos. Los hidrolizados gástricos y duodenales no presentaron diferencias significativas entre ellos al comparar su % de hidrólisis. GH25 y DH25 presentaron valores de 77,24% y 78,61% DH. GH35 y DH35 presentaron porcentajes de 76,23% DH y 76,64% DH.

El análisis estadístico no reveló diferencias estadísticas al comparar los cuatro hidrolizados entre sí. Los valores porcentuales de hidrólisis para los cuatro hidrolizados fueron altos. (Vivas et al., n.d.) describieron el porcentaje de digestibilidad de la harina de maíz amarillo. El hidrolizado gástrico presentó un valor de 42,8% de DH.

El porcentaje de digestibilidad se calculó a partir del porcentaje de nitrógeno de las muestras y del hidrolizado. Los valores de nuestro estudio fueron mayores. (Kiers et al., 2000) han descrito diferencias en el porcentaje de maíz blanco fermentado desgrasado y sin desgrasar para siete variedades.

La harina se sometió a un proceso de hidrólisis gastrointestinal con pepsina (pH 4,0 durante 60 min) y pancreatina (pH 6,0 durante 30 min). Encontraron valores para muestras desgrasadas que oscilaban entre 24,1 y 67,1% de DH, y para muestras no desgrasadas, valores de 20,8–65,0% de hidrólisis. Nuestros valores de porcentaje de hidrólisis fueron superiores a los descritos anteriormente, lo que puede deberse a diferencias en las muestras y diferencias en el proceso de digestión.

Tabla 6. Composición elemental, cuantificación de proteína de PCPCs e hidrolizados y grado de hidrólisis de hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)

Muestra	% Carbono	% Hidrógeno	% Azufre	% N	% Proteína	% Grado de hidrólisis
PCF	41,00 ± 0,28 ^c	8,70 ± 0,06 ^c	0,10 ± 0,01 ^a	1,61 ± 0,03 ^a	9,94 ± 0,28 ^a	N.D
PCPC25	59,05 ± 0,28 ^d	9,97 ± 0,10 ^c	0,40 ± 0,00 ^c	7,81 ± 0,01 ^b	48,79 ± 0,15 ^b	N.D
GH25	16,52 ± 1,00 ^b	1,35 ± 0,23 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	1,78 ± 0,08 ^a	11,10 ± 0,29 ^a	77,24 ± 0,25 ^a
DH25	12,07 ± 0,13 ^a	2,59 ± 0,09 ^b	0,58 ± 0,03 ^d	1,67 ± 0,03 ^a	10,44 ± 0,08 ^a	78,61 ± 0,29 ^a
PCPC35	59,74 ± 0,18 ^d	10,14 ± 0,09 ^c	0,33 ± 0,01 ^b	7,31 ± 0,02 ^b	45,67 ± 0,02 ^b	N.D
GH35	13,04 ± 0,58 ^a	1,19 ± 0,09 ^a	0,11 ± 0,00 ^a	1,74 ± 0,05 ^a	10,85 ± 0,04 ^a	76,23 ± 0,32 ^a
DH35	13,30 ± 0,27 ^a	2,46 ± 0,05 ^b	0,08 ± 0,00 ^a	1,71 ± 0,02 ^a	10,67 ± 0,04 ^a	76,64 ± 0,19 ^a

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (n=3) y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se indican con minúsculas PCF (harina de maíz morado), PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C). GH25 (hidrolizado gástrico de PCPC25), DH25 (hidrolizado duodenal de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico de PCPC35) y DH35 (hidrolizado duodenal de PCPC35).

El porcentaje de hidrólisis puede ser importante para determinar el perfil proteico e influir en sus actividades biológicas ya que, dependiendo del grado de hidrólisis, se

formarán péptidos de diferentes tamaños y con distintas cargas.

Dependiendo del tamaño y la cantidad del péptido disponible, podrían ocurrir interacciones entre péptidos/polifenoles; estas interacciones no siempre son las esperadas.

4.9. Contenido de Compuestos Fenólicos de PCPCs e Hidrolizados Gastrointestinales (GH25, DH25, GH35 y DH35)

Se determinaron los contenidos de PCPCs de los fitocomponentes y sus hidrolizados gastrointestinales (Tabla 7). PCPC35 presentó los valores más altos de TFLC (11091.37 mg RE/100 g DW) y TFL (7975.59 mg RE/100 g DW). Los valores más altos de TAC los presentó PCPC35 con un valor de 1620,24 mg Cy3GE/g PS, seguido de harina (1609,59 mg Cy3GE/g MS) y PCPC25 (1157,35 mg Cy3GE/g PS).

Los valores más bajos se obtuvieron en los hidrolizados con un rango de 66,52-181,45 mg Cy3GE/g PS. Se observó una disminución muy importante en la concentración de TAC en todos los hidrolizados en comparación con la harina de maíz morado y los concentrados. (Gálvez Ranilla et al., 2017) han informado el contenido de TAC en el maíz morado peruano (310,04 mg Cy3GE/g DW).

Lopez-Martinez et al. (2009) han reportado el contenido de TAC de cuatro variedades de maíz morado (morado, AREQ516540TL, Veracruz 42 y Oaxaca 337 IG04 PV) de México con valores de (93.2, 850; 389; y 131 mg Cy3-glu/100 g, PS), respectivamente.

Mendoza-Mendoza et al. (2020) han informado el contenido de TAC de 52 variedades de maíz morado de México con rangos de 0.0398 a 0.2398 g de Cy3-glu/100 g PS.

Q. Zhang et al. (2019) informaron el contenido de TAC en 20 variedades de extractos de maíz morado obtenidos del pericarpio del maíz. Informaron valores que oscilan entre 12,8 y 93,5 mg C3GE/g, DW. (Cuevas Montilla et al., 2011) informaron el TAC (0,02–0,7 mg C3GE/g PS) presente en nueve variedades bolivianas de maíz morado.

Žilić et al. (2012) han reportado el contenido de TPC en seis variedades de maíz

coloreado con valores de 4.5–10.5 mg GAE/g, PS, con valores bajos de TAC (0.003–0.7 mg C3GE/g PS).

Lao & Giusti (2016) han reportado el contenido de TAC de 14 variedades de maíz morado con valores entre 3.1 y 100.3 mg C3G/g DW polvo de maíz morado.

Tabla 7. Cuantificación de biocompuestos de PCF, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).

Muestra	Contenido total de flavonoles (TFLC) mg RE/100 g DW	Contenido total de flavonoides (TFC) mg RE/100 g DW	Contenido total de antocianinas (TAC) mg Cy3-glu/ g muestra	Contenido total de proantocianinas (TPA) mg CE/g muestra
PCF	460,90 ± 0,49 ^a	503,07 ± 0,27 ^a	1609,59 ± 0,02 ^d	56,98 ± 0,00 ^b
PCPC25	4228,54 ± 1,69 ^b	2039,38 ± 0,27 ^d	1157,35 ± 0,02 ^b	67,00 ± 3,54 ^a
GH25	630,57 ± 0,47 ^a	1603,66 ± 0,26 ^c	66,52 ± 0,01 ^a	35,08 ± 3,42 ^c
DH25	690,03 ± 0,85 ^a	1326,37 ± 0,27 ^b	181,45 ± 0,01 ^a	36,80 ± 3,59 ^c
PCPC35	11091,37 ± 6,11 ^c	7975,59 ± 0,59 ^e	1620,24 ± 0,01 ^c	57,73 ± 3,36 ^b
GH35	1097,28 ± 1,09 ^a	1539,54 ± 0,23 ^c	116,35 ± 0,01 ^a	28,95 ± 0,00 ^d
DH35	783,07 ± 0,78 ^a	1796,30 ± 0,14 ^d	88,88 ± 0,01 ^a	37,25 ± 0,00 ^c

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (n = 3) y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se indicaron con letras minúsculas. PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), GH25 (hidrolizado gástrico de PCPC25) y DH25 (hidrolizado duodenal de PCPC25). PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C), GH35 (hidrolizado gástrico de PCPC25), DH35 (hidrolizado duodenal de PCPC35) y PCF (harina de maíz morado). RE (equivalentes de rutina), Cy3-glu (cloruro de cianidina-3-glucósido) y CE (equivalentes de catequina). DW (peso seco).

Los valores de TAC informados en este estudio fueron más altos que los descritos por los estudios citados anteriormente. Los hidrolizados presentaron valores de TAC inferiores a los descritos en la literatura. Cuando se comparan los valores de los cuatro

fitocomponentes presentes en los PCPCs con los valores obtenidos por los hidrolizados, se observa una fuerte disminución de los contenidos. También se calculó el contenido de TPA en las muestras. Se encontró que el TPA presentó valores altos y similares para harina de maíz morado, PCPC25 y PCPC35. Los hidrolizados presentaron los valores más bajos. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre la harina de maíz morado y PCPC25. También se observan diferencias estadísticas significativas entre el hidrolizado gástrico y duodenal de PCPC35.

(Ursu et al., 2020) han reportado la degradación térmica de antocianinas en extractos de maíz morado. Descubrieron que a medida que aumentaba la temperatura de calentamiento de los extractos de maíz morado, el contenido de TAC disminuía. El contenido de TAC de las muestras no tratadas térmicamente fue de 520,42 mg C3G/g DW. Adicionalmente, los extractos de TAC de maíz morado fueron sometidos a digestión gastrointestinal simulada con pepsina (pH 2.0 por 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min) y pancreatina (pH 7.0 por 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min). observándose una disminución del 21% en el contenido de TAC en extractos no tratados térmicamente tras 120 min de digestión gástrica.

Los extractos tratados térmicamente a 80°C perdieron el 60% del contenido de TAC después de 120 min de digestión duodenal. Los extractos tratados térmicamente a 120°C perdieron el 83% del contenido de TAC. En el presente estudio, el contenido de la TAC disminuyó en los hidrolizados gastrointestinales de maíz morado, al igual que en el caso anterior.

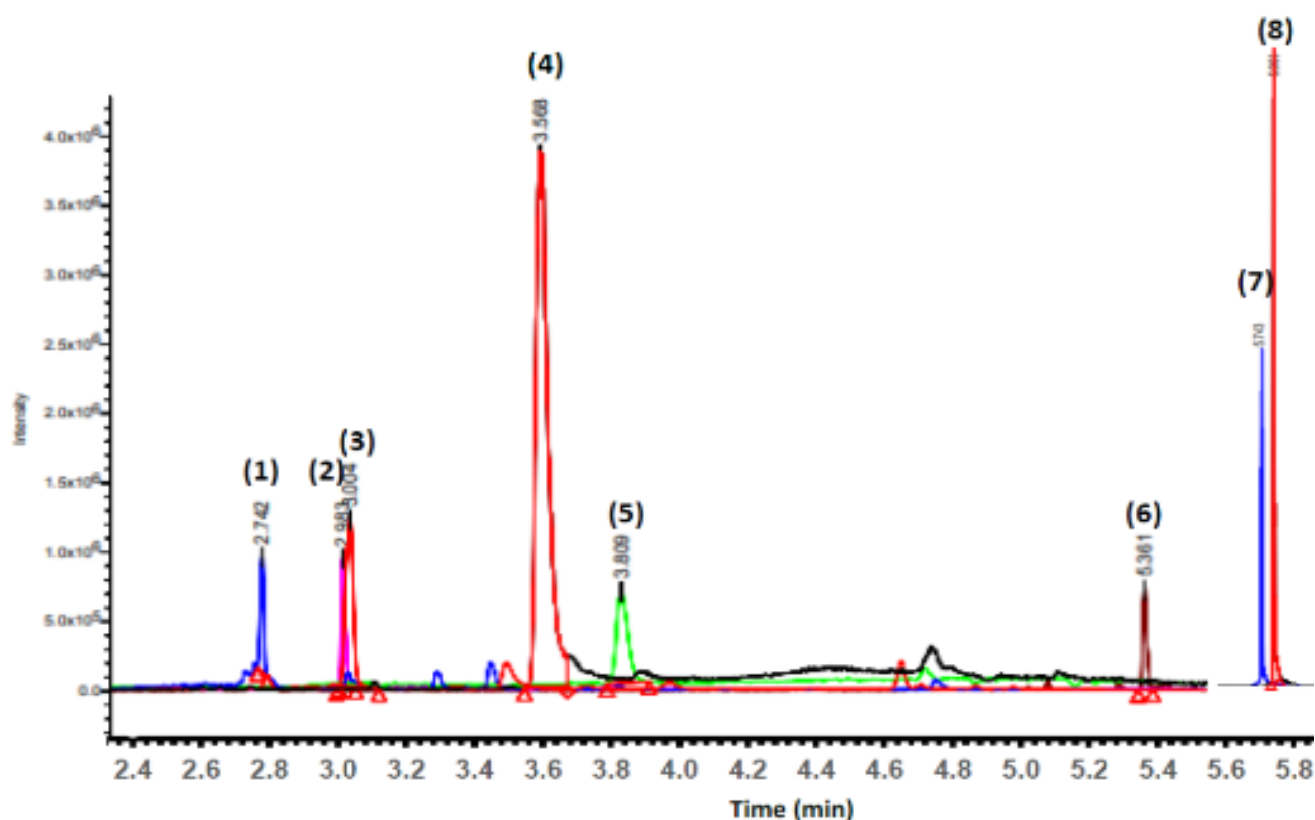
En este estudio, en la digestión térmica gastrointestinal simulada, las enzimas se bloquearon mediante tratamiento térmico a 90°C durante 10 min. Este tratamiento térmico podría afectar la estabilidad de los compuestos fenólicos en las muestras. Por otro lado, se sabe que las antocianinas son estables a pH ácido y muy inestables a pH básico (Hong et al., 2020) (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2004) indicaron que las antocianinas son moléculas inestables y susceptibles de degradarse debido a los efectos de la temperatura, el pH, las enzimas, la luz y los radicales de oxígeno.

Todos estos factores pueden afectar su estabilidad e intensidad de color (Chen & Stephen Inbaraj, 2019) La estabilidad de estas moléculas depende de su estructura química

(Nayak et al., 2015). Los compuestos fenólicos medidos en este estudio disminuyeron su contenido en los hidrolizados, lo que puede sugerir que las condiciones de hidrólisis (pH, enzimas, tiempo de hidrólisis, calentamiento para bloquear las enzimas) afectan la estabilidad de dichos componentes, y su contenido se ve afectado en la procesar muestras de hidrolizados de maíz morado.

4.10. Identificación de compuestos de ácido fenólico y flavonol de PCPC e hidrolizados.

Figura 16. Perfil de componentes fenólicos de PCPC35 por UPLC-QDa. (1) apigenina; (2) 7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavona; (3) (+) Catequina; (4) quercetina; (5) Dihidroquercetina/Taxifolina; (6) miricetina; (7) ácido p-cumárico 4-O-glucósido; y (8) ácido gálico 4-O-glucósido.



527

La Tabla 8 muestra los ácidos fenólicos y flavonoides identificados en harina de maíz morado y PCPC usando UPLC-Da. Los compuestos fueron identificados con la ayuda de sus respectivos estándares, tiempos de retención y por su masa/carga. Figura 4 muestra el cromatograma de los compuestos identificados con sus respectivos tiempos de retención.

Se identificaron ocho compuestos fenólicos (seis flavonoles y dos ácidos fenólicos). Los ocho compuestos solo se identificaron en harina de maíz morado, PCPC25 y PCPC35. No fue posible identificar estas moléculas en ninguno de los hidrolizados gastrointestinales.

Tabla 8. Identificación de componentes fenólicos de PCF, PCPCs y sus hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).

Nombre	Tipo de fenol	Tiempo de retención (min)	[M - H] ⁻ m/z	WM (Da)
apigenina	Flavonoide/Flavonol	3.004	270.2	270.237
7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavona	Flavonoide/Flavonol	3.570	284.4	284.263
(+) Catequina	Flavonoide/Flavonol	5.362	290.4	290.268
quercetina	Flavonoide/Flavonol	2.984	302.3	302.236
Dihidroquercetina/Taxifolina	Flavonoide/Flavonol	5.743	304.3	304.252
miricetina	Flavonoide/Flavonol	2.742	318.3	318.235
Ácido p-cumárico 4-O-glucósido	ácido fenólico	3.809	326.4	326.299
Ácido gálico 4-O-glucósido	ácido fenólico	5.903	332.4	332.260

La catequina, la quercetina, la taxifolina son flavonoles que se describieron en muestras de maíz. Se identificaron dos fenoles ácidos: ácido p-cumárico 4-O-glucósido y ácido gálico 4-O-glucósido derivados del ácido p-cumárico y ácido gálico, respectivamente. El ácido p-cumárico y el ácido gálico son compuestos que han sido descritos en la literatura como fenoles típicos de muestras derivadas de maíz. Los hidrolizados presentaron contenidos muy bajos de todos los fitocomponentes y podrían estar presentes en concentraciones muy bajas.

Pedreschi & Cisneros-Zevallos (2007) indicaron que los derivados de la quercetina son los compuestos fenólicos (no antocianina) más abundantes en el maíz morado, seguidos de los derivados del ácido ferúlico y p-cumárico. Diferentes autores han identificado y cuantificado compuestos fenólicos y flavonoides a partir de maíz morado (grano y pericarpio) de diversas especies.

Entre los compuestos identificados se encuentran principalmente las antocianinas (cy-3-gluc, pg-3-gluc, pn-3-gluc, cy-3-malonylglu, pg-3-malonylglu, pn-3-malonylglu, forma condensada), ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p-

cumárico, ácido vainílico, ácido sinápico y ácido clorogénico) y flavonoides (quercetina, catequina, glucósido de naringenina, rutina, kaempferol, taxifolina, luteolina y morina) (Magaña Cerino et al., 2020; Monroy et al., 2016; Piyapanrungrueang et al., 2016; Salvador-Reyes & Clerici, 2020; Somavat et al., 2016).

En plantas de maíz, la presencia de O-glucósidos de flavona, como el 7-O-glucósido de apigenina y el 6,4-dihidroxi-3-metoxiflavona-7-O-glucósido, ha sido descrita por diferentes autores (Adebo et al., 2021; Casas et al., 2014; S. Ren et al., 2009; Wen et al., 2014). Se sabe que las plantas acumulan compuestos flavonoides en sus vacuolas como derivados de O-glucósidos, pero algunas plantas, como las gimnospermas y varias angiospermas, también producen C-glucósidos a partir de flavonoides (Rayyan et al., 2005).

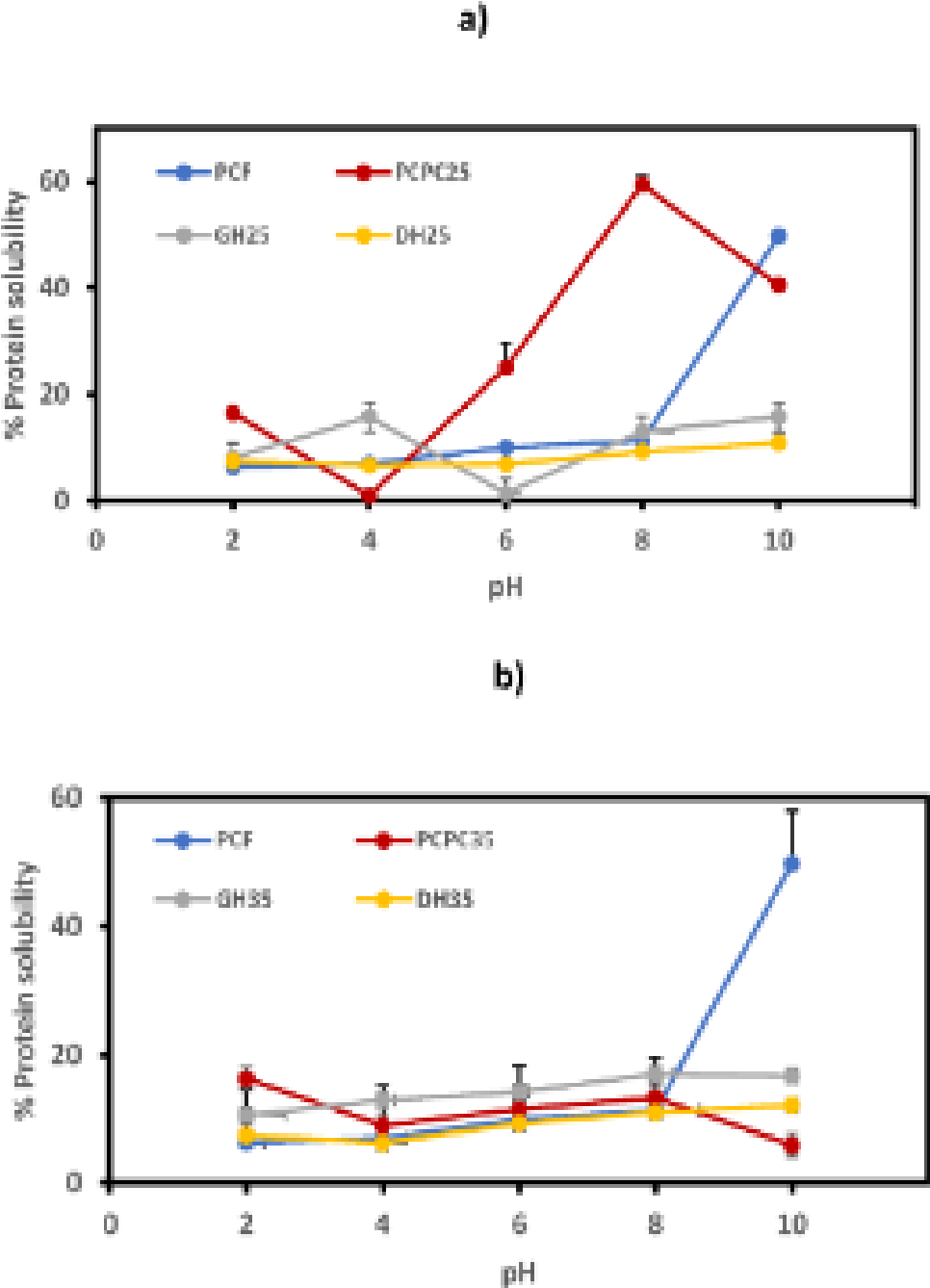
Específicamente, los cereales producen glucósidos C de flavonoides, como los glucósidos C de flavona. En el maíz, las flavonas C-glucosiladas están involucradas en la protección contra la radiación UV-B y en la defensa contra patógenos (CASATI & WALBOT, 2005). La C-glicosil flavona predominante en los tejidos de algunas variedades de maíz, es un insecticida natural contra el gusano cogollero *Helicoverpa zea* (Rector et al., 2002)

4.11. Evaluación de Propiedades Funcionales

4.11.1. Solubilidad Proteica (PS) de Concentrado de Proteína Morada de Maíz (PCPC) e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)

La solubilidad de las proteínas evaluadas a diferentes valores de pH representa un indicador del desempeño de las harinas, concentrados y aislados proteicos cuando se utilizan en productos alimenticios, y brinda información sobre el grado de desnaturalización de las proteínas durante los tratamientos químicos y térmicos en los procesos industriales de productos alimenticios.

Figura 17. El %PS de PCF, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados a diferentes pH (a) PCPC25 e hidrolizados gástricos y duodenales; (b) PCPC35 e hidrolizados gástricos y duodenales. PCF (harina de maíz morado), PS (proteína de solubilidad), PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C), PCF (harina de maíz morado), GH25 (hidrolizado gástrico obtenido de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico obtenido de PCPC35), DH25 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC25) y DH35 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC35).



La figura 17 muestra los resultados de % PS de las muestras analizadas en el estudio. PCPC25 presenta valores superiores de PS a pH 2,0, 6,0 y 8,0. A pH 10 presenta un porcentaje alto y similar al PCF con valores de 40,54% y 49,74%, respectivamente. A pH 4,0, la diferencia entre el %PS de PCPC y PCF se debe a la desnaturalización de las proteínas durante la eliminación de grasa en el proceso de extracción alcalina, los tratamientos químicos aplicados en la purificación de proteínas y durante el proceso de liofilización de la muestra. PCPC35, hidrolizados y PCF tienen valores de %PS muy similares a pH 2,0–8,0. PCPC25 fue la muestra con mejor resultado para esta propiedad funcional.

De esta forma, se amplían sus posibilidades de uso como ingrediente funcional en otros productos. (Paraginski et al., 2014) han descrito un 47,2% PS de harina de maíz amarillo; los valores de PS de la harina de maíz morado reportados en este estudio concuerdan con los descritos previamente para la harina de maíz amarillo. Hay pocos estudios sobre el PS de PCF y sus derivados, como PI, PC e hidrolizados.

4.11.2 Cuantificación de %WAC y %OAC de PCPC25, PCPC35 e Hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35)

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=3) y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se indicaron con letras minúsculas. PCPC25 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C), PCPC35 (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C), PCF (harina de maíz morado), GH25 (hidrolizado gástrico obtenido a partir de PCPC25), GH35 (hidrolizado gástrico obtenido de PCPC23), DH25 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC25) y DH35 (hidrolizado duodenal obtenido de PCPC35).

Tabla 9. Propiedades funcionales de PCF púrpura, PCPC25, PCPC35 e hidrolizados (GH25, DH25, GH35 y DH35).

Muestras	Capacidad retención de agua (%)	Capacidad retención de aceite (%)
PCF	26.90 ± 0.52 ^{b,c}	22.08 ± 0.21 ^{c,d}
PCPC25	27.77 ± 2.97 ^c	24.94 ± 1.22 ^d
HG25	19.04 ± 0.93 ^{a,b}	19.05 ± 1.40 ^{b,c}
HD25	13.48 ± 0.00 ^a	11.32 ± 0.07 ^a
PCPC35	29.89 ± 5.47 ^c	23.80 ± 1.19 ^d
HG35	19.26 ± 2,20 ^{a,b}	16.45 ± 2.04 ^b
HD35	13.17 ± 0,50 ^a	11.31 ± 0.60 ^a

La Tabla 9 muestra los resultados de las propiedades funcionales de % WAC y % OAC. PCF, PCPC25 y PCPC35 presentaron porcentajes similares de WAC, y el análisis estadístico no reveló diferencias significativas. Los hidrolizados presentaron valores inferiores de %WAC en comparación con los datos obtenidos para los concentrados y la harina.

Esta misma situación se observa con la capacidad de absorción de aceite PCF; PCPC25 y PCPC35 presentaron los valores más altos de % AOC. Al comparar los datos de PCPC y los hidrolizados se observan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Esta propiedad funcional también puede ser importante para el uso de los concentrados como ingredientes funcionales. (Akaffou et al., 2018) han descrito % WAC de harinas de maíz amarillo y morado, denominados maíz amarillo, maíz morado oscuro, maíz rojo morado claro y maíz morado claro de Pakistán con valores de 70.59, 70.38, 69.24 y 69.35 % WAC y 131, 130, 128 y 128 % AOC, respectivamente. Nuestros valores de % WAC y % OAC están por debajo de esos valores.

Esta diferencia podría deberse a las características de las variedades de maíz estudiadas. (Gong et al., 2018) han descrito el % de índice de absorción de agua (%WAI) y el % OAC de harinas de maíz amarillo germinadas. Los valores de %OAC estaban en el rango de 18,7–20,5 % OAC. Estos valores son consistentes con los reportados en nuestro estudio. La harina de maíz sin germinar presentó un valor de % WAC de 25,1. Este valor es consistente con los reportados en este estudio para las muestras analizadas.

4.12. Actividad antioxidante de PCPC e hidrolizados gastrointestinales

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (n=3) y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se indicaron con letras minúsculas. PCPC-5D-25°C (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 25°C). PCPC-5D-35°C (concentrado de proteína de maíz morado germinado durante 5 días a 35°C). TE (equivalentes de trolox). DW (peso seco).

Se observó que el PCF presentó los valores más altos de actividad antioxidante con los tres métodos utilizados. Su actividad antioxidante fue mayor frente a los cuatro controles positivos. PCPC25 y PCPC35 presentaron valores altos de actividad antioxidante con los tres métodos (ABTS, FRAP y DPPH) en comparación con los valores de los hidrolizados. Ursu et al. (2020) han evaluado la actividad antioxidante mediante el método in vitro DPPH de muestras de maíz morado sometidas a digestión gastrointestinal (pepsina, pH 2,0 y pancreatina, pH 7,0) previamente tratadas con calor (80, 100 y 120).

Tabla 10. Actividad antioxidante de PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados gastrointestinales (GH25, DH25, GH35 y DH35) por métodos ABTS, FRAP y DPPH.

Muestras	ABTS [$\mu\text{mol Trolox/g muestra}$]	FRAP [$\mu\text{mol Trolox/g muestra}$]	DPPH [$\mu\text{mol Trolox/g muestra}$]
Harina de maíz morado	63772,46 \pm 1,00 ^e	47292,14 \pm 2,64 ^c	93203,11 \pm 1,18 ^c
PCPC25	570,97 \pm 0,07 ^d	772,85 \pm 0,29 ^b	90,60 \pm 20,90 ^b
HG25	142,00 \pm 0,00 ^b	64,73 \pm 0,01 ^a	74,72 \pm 8,00 ^a
HD25	74,12 \pm 0,01 ^a	59,42 \pm 0,02 ^a	85,30 \pm 7,90 ^b
PCPC35	402,75 \pm 0,09 ^c	747,02 \pm 0,09 ^b	83,98 \pm 13,69 ^b
HG35	107,52 \pm 0,04 ^b	53,89 \pm 0,00 ^a	57,34 \pm 7,95 ^a
HD35	77,10 \pm 0,01 ^a	59,16 \pm 0,01 ^a	67,12 \pm 7,92 ^a

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de PCF, PCPC25, PCPC35 y sus hidrolizados gastrointestinales evaluados con los métodos ABTS, FRAP y DPPH. Los estándares de tres flavonoides (rutina, catequina y quercetina) y un fenol ácido (ácido gálico)

se utilizaron como controles positivos.

La actividad antioxidante de los extractos de control (sin tratamiento térmico) disminuyó su actividad antioxidante en un 14% para la fase gástrica y en un 24% para la fase duodenal después de 120 min de digestión. La digestión gástrica mostró una disminución de la actividad antioxidante con rangos entre 7% y 14%. Sin embargo, las muestras tratadas térmicamente disminuyeron significativamente su actividad antioxidante con un rango entre 24% y 78% DPPH, lo que indica que esta pérdida de actividad antioxidante estuvo relacionada con la pérdida de antocianinas en los hidrolizados.

En el presente estudio, la actividad antioxidante de todos los hidrolizados disminuye en comparación con la actividad de la harina y PCPCs. Nuestros hidrolizados tienen un bajo contenido de todos los compuestos fenólicos determinados. Por tanto, la disminución de la actividad antioxidante puede estar relacionada con la pérdida de estos componentes.

L. Wu et al. (2021) han descrito las interacciones entre el hidrolizado de aislado de proteína de soya (SPIH) y la cianidina-3-O-glucósido (C3G) y su efecto sobre la actividad antioxidante evaluada por los métodos ABTS y DPPH. Encontraron diferencias entre la actividad antioxidante por ABTS de la mezcla de SPIH3 (41,34% ABTS) y SPIH3-C3G (66,07% ABTS) y la suma de SPIH3 más C3G (69,07% ABTS). En general, la interacción proteína/polifenol (SPIH/C3G) significativamente ($p < 0.05$) disminuyó la actividad antioxidante utilizando los métodos ABTS y DPPH de sistema mixto en comparación con la suma de sus actividades individuales. Indicaron que existen interacciones entre las proteínas y los polifenoles del tipo enmascarador/antagonista que bloquean la capacidad antioxidante de las moléculas.

Sugirieron que una posible explicación podría ser que la composición y estructura de los péptidos de los hidrolizados interactúan con los anillos aromáticos y los grupos hidroxilo de C3G, afectando la actividad antioxidante. Es claro que la presencia de antocianinas en los hidrolizados afecta su respuesta antioxidante. En nuestro estudio, el contenido de TAC en los hidrolizados fue bajo; su presencia podría producir interacciones proteína/polifenoles que afectarían su actividad antioxidante.

X. Ren et al. (2018) han descrito las actividades antioxidantes de los hidrolizados

de proteína de maíz (CPH) bajo digestión gastrointestinal simulada. La harina de gluten de maíz se hidrolizó con la enzima alcalasa y luego se sometió a digestión gastrointestinal simulada, fase gástrica (pepsina durante 6 h) y fase duodenal (pancreatina durante 10 h).

La digestión gástrica a los 0 min presentó 33,5% DPPH y la digestión gástrica a las 4 h presentó 31,5% DPPH. Finalmente, la digestión duodenal a las 10 h presentó 46,3% DPPH. El aumento de la actividad antioxidante en la fase duodenal se explica por una mayor producción de pequeños péptidos que se producen con la pancreatina. En este estudio, los hidrolizados de la fase duodenal (DH35) presentaron mayor actividad antioxidante por los métodos FRAP y DPPH que los hidrolizados gástricos (GH35).

DISCUSSION GLOBAL

5. DISCUSIÓN GLOBAL

Si bien los Sistemas de producción agrícola en el Ecuador han evolucionado en los últimos años, uno de las grandes limitantes sigue siendo la industrialización. Según el informe del Banco Central elaborado en el 2021 establece que la dependencia de la exportación de materias primas es mencionada como una limitación para la diversificación productiva y la industrialización (Central, 2022). Según el informe "Perspectivas económicas de América Latina 2021" de la OCDE, la baja productividad industrial es uno de los principales desafíos que enfrenta Ecuador. (Juntos, 2021).

Por tanto, resulta de gran interés aportar valor agregado a los productos tradicionales como es el caso del maíz. En el Ecuador el maíz es un cultivo de suma importancia debido al significativo rol que cumple en seguridad alimentaria de la población. El maíz amarillo duro, destinado en un 80% a la producción de alimento balanceado, se produce mayoritariamente en la región litoral y es el primer cultivo transitorio en importancia en relación con la superficie sembrada (300.000 ha) (Zambrano Mendoza et al., 2019).

Figura 18. Productores de maíz en la Provincia de Bolívar Ecuador



Por otra parte, el maíz morado muestra particularidades y características propias otorgadas por los pigmentos que poseen (entre 1,5% y 6,0%), llamados antocianinas, que pertenecen al grupo de los flavonoides. Debido a su alto contenido de antocianinas (cianin-3-glucosa C3G que es su principal colorante) y compuestos fenólicos que posiblemente actúan como antioxidantes naturales con actividad anticancerígena, teniendo además propiedades funcionales debido a estos compuestos bioactivos (Guillén-sánchez et al., 2014).

Por otro lado, los germinados, también llamados brotes, son alimentos que han ido conquistando a los consumidores por su agradable frescura y su interés nutricional y se usan acompañando a diversos platos, tanto a nivel doméstico como en un gran número de restaurantes de todo el mundo. Diferentes autores investigan sobre el valor nutritivo de estos alimentos. Algunos autores indican que el proceso de germinación mejora el valor nutritivo de las semillas, al favorecer la presencia de compuestos bioactivos, tales como la vitamina C y polifenoles y que en el proceso de germinación se produce una disminución de factores antinutricionales dando lugar a alimentos de mayor valor nutricional (Lama et al., 2020).

En nuestra investigación se verifico el saber popular, que manifiesta la capacidad de la variedad de maíz purpura andino a un amplio rango climático, más allá de lo considerado habitualmente. De modo que las semillas de maíz purpura andino pueden germinar en un amplio rango de temperatura que fluctúa desde los 15 hasta los 40 °C, considerados en nuestro estudio. De igual forma su proceso de germinación puede ocurrir entre 24 y 168 horas hecho que permitiría desarrollar de forma efectiva la industria de los germinados.

Además, se ha valorado la disminución paulatina del potencial fisiológico de las semillas de maíz ocasionada por el envejecimiento natural, misma que merma progresivamente la capacidad germinativa, la velocidad de crecimiento inicial de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas. Tales efectos están asociados con alteraciones bioquímicas evidenciadas durante las primeras horas de imbibición de los tejidos seminales y se expresan primero como reducciones en el desempeño germinativo y en el vigor de las semillas y, posteriormente, a nivel del ADN.

El proceso se realizó en condiciones de laboratorio, lo que ha permitido acotar los índices de contaminación, hecho que es un problema de gran importancia en la industria de los

germinados (E. Vilcacundo et al., 2020).

Adicionalmente, si se considera que los germinados se almacenan en refrigeración por varios días antes de su consumo, podría esperarse que la carga microbiológica aumentara y representar un riesgo a la salud (Cava et al., 2009). La industria de los germinados en el Ecuador es potencial sin embargo se deberá considerar la implementación de controles microbiológicos exhaustivos para evitar los problemas reportados en otros países.

En este sentido, los germinados podrían incrementar significativamente la población de aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras con respecto a las semillas sin germinar.

Por otra parte, si bien no se ha detectado presencia de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* en las semillas germinadas, sin embargo, se observaron altos recuentos de *Bacillus cereus*, lo que representa un riesgo a la salud de los consumidores.

En España existen varias industrias registradas en este ámbito de conocimiento, algunas dedicadas concretamente a la producción de germinados y establecidas en las diferentes regiones españolas, destacando La Rioja, Madrid, Murcia y Barcelona. En Madrid aparece registrada una empresa que comercializa, aproximadamente 100 tipos distintos de germinados. (Lama et al., 2020). Este dato nos muestra la importancia de esta industria en otros países pudiendo replicarse con gran potencial en el Ecuador.

La extracción de proteína a partir de residuos agroindustriales, surge como una alternativa de aprovechamiento y desarrollo de nuevos productos. Para esto, es fundamental conocer su punto isoeléctrico, pH en el cual la proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto precipita (Serpa et al., 2014). Por otro lado, la obtención de concentrados de proteínas por punto isoeléctrico obtenida a partir de los germinados de maíz morado de acuerdo a nuestro estudio resultó ser eficiente si se lo compara con las harinas de grano de maíz sin germinar.

Los solventes altamente alcalinos ayudan a romper los puentes de hidrógeno y a disociar el hidrógeno de los grupos sulfato carbónico, así el incremento de la carga superficial de las moléculas proteicas aumenta la solubilidad en agua, como muestran estudios previos, en los

que se utilizó como solvente NaOH al 0.1M, logrando extracciones entre el 55% y 90 de proteína (Serpa et al., 2014).

En nuestra investigación se determinó un pH 4.0 como punto de precipitación efectivo para la obtención de concentrados proteicos de maíz morado con dos pHs de solubilización (pH8 – pH10).

El proceso de germinación de los granos de maíz morado andino se podría utilizar como estrategia para obtener concentrados proteicos con actividades biológicas, como la actividad antioxidante, que pueden aumentar el valor nutricional y la calidad de este producto alimenticio. Los concentrados proteicos de maíz morado germinado tienen un alto contenido de componentes fenólicos que son los responsables de la actividad antioxidante.

El protocolo utilizado para obtener los concentrados proteicos de maíz morado con actividad antioxidante desarrollado en este estudio es un protocolo preliminar que podría enfrentarse en futuras investigaciones con diferentes variedades de semillas de maíz cultivadas a diferentes condiciones ambientales. Este protocolo debe considerar la influencia de las etapas de latencia de las semillas (E. Vilcacundo et al., 2020).

Nuestros resultados además muestran mayor concentración de antocianinas en los concentrados de proteína de maíz morado de las muestras germinadas durante 5 días a 25°C y 35°C respectivamente. Estos resultados podrían ser muy significativos para la agroindustria ya que se podría escalar la producción de germinados con las condiciones probadas de forma efectiva a nivel de laboratorio.

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción. Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante) (R. Benítez et al., 2008).

Los resultados obtenidos en los hidrolizados de maíz morado presentaron bajos contenidos de todos los compuestos fenólicos determinados en comparación con las muestras

no hidrolizadas. Las condiciones de la simulación gastrointestinal in vitro favorecieron la degradación de estas moléculas. Sin embargo, las muestras de harina normal de maíz morado mostraron altas propiedades funcionales; tales como solubilidad de proteína, capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite.

Finalmente, se identificaron seis flavonoles (Apigenin; 7,4'-Dihydroxy-3'-methoxyflavone; Catechin; Quercetin; Dihydroquercetin/Taxifolin; Myricetin;) y dos fenoles ácidos (p-Coumaric acid 4-O-glucoside y Gallic acid 4-O-glucoside) en la harina de maíz. La caracterización de las propiedades funcionales y biológicas puede ser un aspecto importante para su uso en la industria alimentaria como ingrediente funcional (E. Vilcacundo et al., 2022).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

Ecuador es un actor estratégico en la conservación de la biodiversidad animal y vegetal donde el conocimiento de las especies y variedades locales constituye una primera etapa en el desarrollo de futuros programas de conservación. En este sentido esta Tesis contribuye al conocimiento del maíz morado en la zona de la Sierra de Ecuador.

El cultivo del maíz morado admite un amplio rango climático desde los 15 hasta los 40°C y la germinación se produce en un intervalo entre 24 y 168 h.

Se obtuvo el mayor nivel de concentración de antocianinas en los concentrados de maíz morado en aquellas muestras germinadas durante 5 días en un intervalo de temperatura entre 25°C y 35°C. Por tanto el proceso de germinación podría utilizarse para obtener concentrados proteicos con una alta actividad antioxidante y contenido de componentes fenólicos, lo que podría mejorar significativamente el valor nutricional y la calidad del producto alimenticio.

Se identificaron seis flavonoles: Apigenin; 7,4'-Dihydroxy-3'-methoxyflavone; Catechin; Quercetin; Dihydroquercetin/Taxifolin; Myricetin; y dos fenoles ácidos (p-Coumaric acid 4-O-glucoside y Gallic acid 4-O-glucoside) en la harina de maíz. Estos biocompuestos podrían utilizarse como ingredientes funcionales en la industria alimentaria.

RESUMEN

7. RESUMEN

Respecto al objetivo específico 1: Determinar las condiciones de germinación de semillas de maíz morado andino para producir concentrado de proteína de maíz morado y evaluar su actividad antioxidante

El maíz morado andino de Ecuador (*Zea mays L.*) se sometió a un proceso de germinación a 15–40 °C durante 24–168 horas de incubación. Los concentrados de proteína de maíz morado (PCPCs) se obtuvieron por extracción alcalina a pH 8,0 y pH 10,0, seguido de un proceso de precipitación isoelectrica a pH 4,0, pH 5,0 y pH 6,0. Se calculó el contenido de proteínas y fenoles de los PCPC. Las propiedades antioxidantes del PCPC se determinaron mediante el método in vitro del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y mediante el método in vitro del ácido 2,2-azinobis, 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS). Las semillas de maíz morado andino pudieron germinar bajo las condiciones de germinación probadas en este estudio. El mayor porcentaje de germinación fue de 63,33% a las 168 h/25 °C. El perfil proteico de las PCPC se caracterizó por la presencia de seis bandas con pesos moleculares de 14,50 kDa, 20,12 kDa, 25,18 kDa, 41,85 kDa, 59,59 kDa y 65,87 kDa. El PCPC germinado presentó un alto contenido de TPC con rangos de 605.71–1820.00 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g PCPC peso seco (PS), el PCPC germinado/72 h/25 °C presentó un valor mayor de 1820.00 mg GAE/g PCPC, DW. Todas las muestras de PCPC germinadas analizadas presentaron una fuerte actividad antioxidante cuando se midieron mediante los métodos ABTS y FRAP. El PCPC germinado/144 h/35 °C presentó alta actividad antioxidante por ABTS con 804,35 μ mol Trolox equivalentes (TE)/g PCPC DW y el PCPC germinado/144 h/30 °C presentó un valor alto por el método FRAP, 987,83 μ mol TE/ g PCPC DW.

Respecto al objetivo específico 2: Evaluar las propiedades funcionales de los compuestos fitoquímicos del concentrado de proteína de maíz morado germinado y sus hidrolizados gastrointestinales

Semillas de maíz morado germinadas a 25 °C y 35 °C durante 5 días se utilizaron para obtener concentrado proteico de maíz morado (PCPC25 y PCPC35). PCPC25 y PCPC35 se sometieron a hidrólisis gastrointestinal. Se utilizaron PCPC y sus hidrolizados para evaluar sus propiedades funcionales y biológicas. Se determinaron el contenido total de flavonoides (TFC), el contenido total de flavonoides (TFLC), el contenido total de antocianinas (TAC) y el total de proantocianinas (TAP). Los polifenoles y flavonoides fueron identificados por UPLC-QDa. Se determinaron la solubilidad de proteínas (PS), la capacidad de absorción de agua y aceite (WAC y OAC). La actividad antioxidante se evaluó por los métodos FRAP, ABTS y DPPH. PCPC35 mostró los valores más altos de TFLC (11.091,37 mg de equivalentes de rutina (RE)/100 g de peso seco DW), y TFL presentó valores de 7975,59 mg RE/100 g DW. Los PCPCs presentaron mejores propiedades funcionales que los hidrolizados. PCPC25 presentó una PS de 59,43% PS a pH 8,0, 27,77% WAC y 24,94% OAC. PCPC25 y PCPC35 mostraron altos valores de actividad antioxidante. PCPC25 mostró valores ABTS (570,97 μmol equivalentes de trolox (TE)/g DW) y FRAP (772,85 μmol TE/g DW). Los hidrolizados de PCPC fueron menos activos con valores ABTS (74,12 μmol TE/g DW) y FRAP (59,42 μmol TE/g DW).

SUMMARY

8. SUMMARY

Published as:

Vilcacundo, E., García, A., Vilcacundo, M., Morán, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2020). Antioxidant purple corn protein concentrate from germinated andean purple corn seeds. *Agronomy*, 10(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091282>

Ecuador Andean purple corn (*Zea mays* L.) was subjected to a germination process at 15–40 °C for 24–168 incubation hours. Purple corn protein concentrates (PCPCs) were obtained by alkaline extraction at pH 8.0 and pH 10.0, followed by an isoelectric precipitation process at pH 4.0, pH 5.0 and pH 6.0. Proteins and phenolic content of PCPCs was calculated. PCPC antioxidant properties were determined by the ferric-reducing antioxidant power (FRAP) in vitro method and by the 2,2-azinobis, 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid, (ABTS) in vitro method. Andean purple corn seeds were able to germinate under the germination conditions tested in this study. The higher percentage of germination was of 63.33% at 168 h/25 °C. The PCPCs protein profile was characterized for the presence of six bands with molecular weights of 14.50 kDa, 20.12 kDa, 25.18 kDa, 41.85 kDa, 59.59 kDa, and 65.87 kDa. Germinated PCPC presented a high TPC content with ranges of 605.71–1820.00 mg gallic acid equivalents (GAE)/g PCPC dry weight (DW), germinated PCPC/72 h/25 °C presented a higher value of 1820.00 mg GAE/g PCPC, DW. All germinated PCPCs samples assayed presented strong antioxidant activity when measured by the ABTS and FRAP methods. Germinated PCPC/144 h/35 °C presented high antioxidant activity by ABTS with 804.35 µmol Trolox equivalents (TE)/g PCPC DW and germinated PCPC/144 h/30 °C presented a high value by the FRAP method, 987.83 µmol TE/g PCPC DW.

Published as:

*Vilcacundo, E., Montalvo, V., Sanaguano, H., Moran, R., Carrillo, W., & García, A. (2022). Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates. Agronomy, 12(9).
<https://doi.org/10.3390/agronomy12092217>*

Purple corn seeds germinated at 25 °C and 35 °C for 5 days were used to obtain purple corn protein concentrate (PCPC25 and PCPC35). PCPC25 and PCPC35 were subject to gastrointestinal hydrolysis. PCPC and its hydrolysates were used to evaluate their functional and biological properties. Total flavonoid content (TFC), total flavonol content (TFLC), total anthocyanin content (TAC) and total proanthocyanin (TAP) were determined. The polyphenols and flavonoids were identified by UPLC-QDa. Protein solubility (PS), water and oil absorption capacity (WAC and OAC) were determined. The antioxidant activity was evaluated by the FRAP, ABTS and DPPH methods. PCPC35 showed the highest TFLC values (11,091.37 mg rutin equivalents (RE)/100 g dry weight DW), and TFL presented values of 7975.59 mg RE/100 g DW. The PCPCs presented better functional properties than the hydrolysates. PCPC25 presented a PS of 59.43% PS at pH 8.0, 27.77% WAC and 24.94% OAC. PCPC25 and PCPC35 showed high values of antioxidant activity. PCPC25 showed ABTS values (570.97 µmol trolox equivalents (TE)/g DW) and FRAP (772.85 µmol TE/g DW). PCPCs hydrolysates were less active with ABTS values (74.12 µmol TE/g DW) and FRAP (59.42 µmol TE/g DW).

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- (Ursu), M. S., Aprodu, I., Milea, Ștefania A., Enachi, E., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., & Stănciuc, N. (2020). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins Extracted from Purple Maize Flour Extract and the Effect of Heating on Selected Biological Functionality. *Foods*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/foods9111593>
- Aboubacar, A., Axtell, J. D., Huang, C.-P., & Hamaker, B. R. (2001). A Rapid Protein Digestibility Assay for Identifying Highly Digestible Sorghum Lines. *Cereal Chemistry*, 78(2), 160–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.2.160>
- Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Identification of proteins isolate from amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 M solvents. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 331–334. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/11446>.
- Adebo, O. A., Oyediji, A. B., Adebisi, J. A., Chinma, C. E., Oyeyinka, S. A., Olatunde, O. O., Green, E., Njobeh, P. B., & Kondiah, K. (2021). Kinetics of Phenolic Compounds Modification during Maize Flour Fermentation. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216702>
- Aguilera, Y., Díaz, M. F., Jiménez, T., Benítez, V., Herrera, T., Cuadrado, C., Martín-Pedrosa, M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2013). Changes in nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8120–8125. https://doi.org/10.1021/JF4022652/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2013-022652_0004.GIF
- Aimutis, W. R. (2022). Plant-Based Proteins: The Good, Bad, and Ugly. *Annual Review of Food Science and Technology*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-092221-041723>
- Akaffou, F. A., Koffi, D. M., Cisse, M., & Niamké, S. L. (2018). Physicochemical and Functional Properties of Flours from Three Purple Maize Varieties Named “Violet de Katiola” in Côte d’Ivoire. *Asian Food Science Journal*, 4(4), 1–10. <https://doi.org/10.9734/AFSJ/2018/44034>
- Amarowicz Ryszard and Pegg, R. B. (2006). CONTENT OF PROANTHOCYANIDINS IN

SELECTED PLANT EXTRACTS AS DETERMINED VIA N-BUTANOL/HCL HYDROLYSIS AND A COLORIMETRIC ASSAY OR BY HPLC – A SHORT REPORT. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 56(3), 319–322. <http://journal.pan.olsztyn.pl/CONTENT-OF-PROANTHOCYANIDINS-IN-SELECTED-PLANT-EXTRACTS-AS-DETERMINED-VIA-N-BUTANOL,97955,0,2.html>

- Aschemann-Witzel, J., Gantriis, R. F., Fraga, P., & Perez-Cueto, F. J. A. (2021). Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18), 3119–3128. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793730>
- Ávila-Román, J., Soliz-Rueda, J. R., Bravo, F. I., Aragonès, G., Suárez, M., Arola-Arnal, A., Mulero, M., Salvadó, M. J., Arola, L., Torres-Fuentes, C., & Muguerza, B. (2021). Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead? *Trends in Food Science & Technology*, 113, 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.04.050>
- Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., Vargas-Rodríguez, I., & Díaz-Cintra, S. (2022). Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease. *Neurologia*, 37(8), 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.06.002>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236.
- Benítez, V., Cantera, S., Aguilera, Y., Mollá, E., Esteban, R. M., Díaz, M. F., & Martín-Cabrejas, M. A. (2013). Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food Research International*, 50(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.09.044>
- Boeri, P., Piñuel, L., Dalzotto, D., Monasterio, R., Fontana, A., Sharry, S., Barrio, D. A., & Carrillo, W. (2020). Argentine Patagonia barberry chemical composition and evaluation of its antioxidant capacity. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7), e13254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.13254>
- Carrillo, W., Carpio, C., Morales, D., Vilcacundo, E., Álvarez, M., & Silva, M. (2017). CONTENT OF FATTY ACIDS IN CORN (ZEA MAYS L.) OIL FROM ECUADOR. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(8), 150–153. <https://doi.org/10.22159/AJPCR.2017.V10I8.18786>
- Carrillo, W., Gómez-Ruiz, J. A., Miralles, B., Ramos, M., Barrio, D., & Recio, I. (2016).

- Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the Zebrafish model. *European Food Research and Technology* 2016 242:10, 242(10), 1777–1785. <https://doi.org/10.1007/S00217-016-2677-1>
- Casas, M. I., Duarte, S., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2014). Flavone-rich maize: an opportunity to improve the nutritional value of an important commodity crop. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00440>
- CASATI, P., & WALBOT, V. (2005). Differential accumulation of maysin and rhamnosylisoorientin in leaves of high-altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant, Cell & Environment*, 28(6), 788–799. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01329.x>
- Cava, R., Sangronis, E., Rodríguez, M., & Colina, J. (2009). Calidad microbiológica de semillas germinadas de phaseolus vulgaris. *Interciencia*, 34(11), 796–800. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009001100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Central, B. (2022). *economía ecuatoriana en 2021 y perspectivas 2022 Marzo 2022*. 1–76.
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2003.08.011>
- Chatham, L. A., Howard, J. E., & Juvik, J. A. (2020). A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. *Food Chemistry*, 310, 125734. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125734>
- Chen, B.-H., & Stephen Inbaraj, B. (2019). Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051052>
- Coco, M. G., & Vinson, J. A. (2019). Analysis of Popcorn (Zea Mays L. var. Everta) for Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content. *Antioxidants*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antiox8010022>
- Coleman, C. E., & Larkins, B. A. (1999). The Prolamins of Maize. In P. R. Shewry & R. Casey (Eds.), *Seed Proteins* (pp. 109–139). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_6

- Coleman Craig E. and Larkins, B. A. (1999). The Prolamins of Maize. In R. Shewry Peter R. and Casey (Ed.), *Seed Proteins* (pp. 109–139). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_6
- Cornejo, F., Novillo, G., Villacrés, E., & Rosell, C. M. (2019). Evaluation of the physicochemical and nutritional changes in two amaranth species (*Amaranthus quitensis* and *Amaranthus caudatus*) after germination. *Food Research International*, *121*, 933–939. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.022>
- Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Cárdenas-Valenzuela, O. G., & Reyes-Moreno, C. (2004). Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, *37*(1), 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00134-8)
- Cuevas-Rodríguez, E. O., Verdugo-Montoya, N. M., Angulo-Bejarano, P. I., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Bello-Pérez, L. A., Garzón-Tiznado, J. A., & Reyes-Moreno, C. (2006). Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *LWT - Food Science and Technology*, *39*(10), 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2005.07.003>
- Cuevas Montilla, E., Hillebrand, S., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2011). Soluble and Bound Phenolic Compounds in Different Bolivian Purple Corn (*Zea mays* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(13), 7068–7074. <https://doi.org/10.1021/jf201061x>
- Das, A. K., & Singh, V. (2015). Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *Journal of Functional Foods*, *13*, 363–374. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.012>
- de Souza Rocha, T., Hernandez, L. M. R., Mojica, L., Johnson, M. H., Chang, Y. K., & González de Mejía, E. (2015). Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. *Food Research International*, *76*(P1), 150–159. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.04.041>
- Díaz-Gómez, J. L., Castorena-Torres, F., Preciado-Ortiz, R. E., & García-Lara, S. (2017). Anti-Cancer Activity of Maize Bioactive Peptides. *Frontiers in Chemistry*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00044>
- Díaz-Hung, M. L., & González Fraguera, M. E. (2014). El estrés oxidativo en las enfermedades

- neurológicas: ¿causa o consecuencia? *Neurología*, 29(8), 451–452.
<https://doi.org/10.1016/J.NRL.2013.06.022>
- Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R. I., Peñas, E., & Frias, J. (2015). Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, 70, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.01.018>
- Esen, A. (1986). Separation of Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) from Maize into Three Fractions by Differential Solubility. *Plant Physiology*, 80(3), 623–627. <https://doi.org/10.1104/pp.80.3.623>
- Esen, A. (1987). A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cereal Science*, 5(2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80015-2](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80015-2)
- FAO. (2013). *Traditional High Andean Cuisine*. <http://www.fao.org/docrep/018/i1466e/i1466e.pdf>
- FAOSTAT. (n.d.). *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database*. 2018. Retrieved January 5, 2023, from <http://faostat.fao.org/>
- Galicia-Moreno, M., & Gutiérrez-Reyes, G. (2014). Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(2), 135–144. <https://doi.org/10.1016/J.RGMX.2014.03.001>
- Gálvez Ranilla, L., Christopher, A., Sarkar, D., Shetty, K., Chirinos, R., & Campos, D. (2017). Phenolic Composition and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Free and Bound Phenolic Fractions from a Peruvian Purple Corn (*Zea mays* L.) Accession. *Journal of Food Science*, 82(12), 2968–2976. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.13973>
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Sułkowski, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyz, J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of Chenopodium quinoa leaves extracts – In vitro study. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 154–160. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.03.023>
- Gharibzahedi, S. M. T., & Smith, B. (2021). Effects of high hydrostatic pressure on the quality and functionality of protein isolates, concentrates, and hydrolysates derived from pulse legumes: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 466–479. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.11.016>
- Gong, K., Chen, L., Li, X., Sun, L., & Liu, K. (2018). Effects of germination combined with extrusion on the nutritional composition, functional properties and polyphenol profile and

- related in vitro hypoglycemic effect of whole grain corn. *Journal of Cereal Science*, 83, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2018.07.002>
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.09.035>
- Govender, V., Aveling, T. A. S., & Kritzing, Q. (2008). The effect of traditional storage methods on germination and vigour of maize (*Zea mays* L.) from northern KwaZulu-Natal and southern Mozambique. *South African Journal of Botany*, 74(2), 190–196. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2007.10.006>
- Guillén-sánchez, J., Mori-arismendi, S., & Paucar-menacho, L. M. (2014). *Scientia Agropecuaria* ARTÍCULO DE REVISIÓN Características y propiedades funcionales del maíz morado (*Zea mays* L .) var . subnigroviolaceo Characteristics and functional properties of purple corn (*Zea mays* L .) var . subnigroviolaceo. 5, 211–217.
- Han, Z., Wang, B., Tian, L., Wang, S., Zhang, J., Guo, S. L., Zhang, H., Xu, L., & Chen, Y. (2020). Comprehensive dynamic transcriptome analysis at two seed germination stages in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, 168(1), 205–217. <https://doi.org/10.1111/PPL.12944>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7). <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hong, H. T., Netzel, M. E., & O'Hare, T. J. (2020). Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. *Food Chemistry*, 319, 126515. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.126515>
- Jia, W., Rodriguez-Alonso, E., Bianeis, M., Keppler, J. K., & van der Goot, A. J. (2021). Assessing functional properties of rapeseed protein concentrate versus isolate for food applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102636. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102636>
- Juntos, A. (2021). *Perspectivas económicas de América Latina 2021*.
- Kabir, S. H., Das, A. K., Rahman, M. S., Singh, S. K., Morshed, M., & Marma, A. S. H. (2019).

- Citation of this article. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 4(2), 185–189.
<https://doi.org/10.26832/24566632.2019.040209>
- Kalman, D. S. (2014). Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates. *Foods*, 3(3), 394–402.
<https://doi.org/10.3390/foods3030394>
- Khalesi, M., & FitzGerald, R. J. (2021). In Vitro Digestibility and Antioxidant Activity of Plant Protein Isolate and Milk Protein Concentrate Blends. *Catalysts*, 11(7).
<https://doi.org/10.3390/catal11070787>
- Kiers, J. L., Nout, R. M. J., & Rombouts, F. M. (2000). In vitro digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1325–1331. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9<1325::AID-JSFA648>3.0.CO;2-K](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1325::AID-JSFA648>3.0.CO;2-K)
- Kowalczyk, D., Szymanowska, U., Skrzypek, T., Basiura-Cembala, M., Materska, M., & Łupina, K. (2021). Corn starch and methylcellulose edible films incorporated with fireweed (*Chamaenerion angustifolium* L.) extract: Comparison of physicochemical and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190(September), 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.079>
- Kumar, R., Chauhan, S. K., Shinde, G., Subramanian, V., & Nadasabapathi, S. (2018). Whey Proteins: A potential ingredient for food industry-A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 37(4), 283–290.
- Lai, H.-M., Padua, G. W., & Wei, L. S. (1997). Properties and Microstructure of Zein Sheets Plasticized with Palmitic and Stearic Acids. *Cereal Chemistry*, 74(1), 83–90.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.1.83>
- Lama, P. D. L. De, Isasa, T., González, M., & Cruz, M. (2020). *Interés de los germinados y su Seguridad Alimentaria Interest of sprouts and their Food Security*. 40(1), 62–73.
<https://doi.org/10.12873/401ponce>
- Lao, F., & Giusti, M. M. (2016). Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Analytical Methods*, 9(5), 1367–1380. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0318-0>
- Lao, F., Sigurdson, G. T., & Giusti, M. M. (2017). Health Benefits of Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 234–246. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12249>

- Lara, D., Vilcacundo, E., Carrillo, C., Carpio, C., Silva, M., Alvarez, M., & Carrillo, W. (2017). Obtention of protein concentrate and polyphenols from *Macadamia* (*Macadamia integrifolia*) with aqueous extraction method. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *10*(2). <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i2.14808>
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., & Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*, *126*(1), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.014>
- López-Amorós, M. L., Hernández, T., & Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(4), 277–283. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2004.06.012>
- López-Martínez, L. X., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2017). Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. *Journal of Functional Foods*, *38*, 624–634. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.03.002>
- Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(6), 1187–1192. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2008.10.010>
- Lopez-Martinez, L. X., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2014). Antioxidant and quinone reductase inducing activities of ethanolic fractions from purple maize. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 270–275. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.05.017>
- Magaña Cerino, J. M., Peniche Pavía, H. A., Tiessen, A., & Gurrola Díaz, C. M. (2020). Pigmented Maize (*Zea mays* L.) Contains Anthocyanins with Potential Therapeutic Action Against Oxidative Stress - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *70*(2), 85–99. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113272>
- Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao, X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *12*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00565-3>
- Malav, O. P., Talukder, S., Gokulakrishnan, P., & Chand, S. (2015). Meat Analog: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(9), 1241–1245. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.689381>

- Mamilla, R. K., & Mishra, V. K. (2017). Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT*, *75*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.08.036>
- Mansilla, P. S., Nazar, M. C., & Pérez, G. T. (2020). Flour functional properties of purple maize (*Zea mays* L.) from Argentina. Influence of environmental growing conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *146*, 311–319. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.12.246>
- Mathiowitz, E., Bernstein, H., Morrel, E., & Schwaller, K. (1991). *Method for Producing Protein Microspheres* (Patent No. 5,271,961).
- Mendoza-Mendoza, C., Mendoza-Castillo, M., Delgado-Alvarado, A., Sánchez-Ramírez, F., & Kato-Yamakake, T. (2020). Anthocyanins content in the kernel and corncob of Mexican purple corn populations. *Maydica*, *65*, 1–10. <https://www.researchgate.net/publication/349609076>
- Mertz, E. T., Bates, L. S., & Nelson, O. E. (1964). Mutant Gene That Changes Protein Composition and Increases Lysine Content of Maize Endosperm. *Science*, *145*(3629), 279–280. <https://doi.org/10.1126/science.145.3629.279>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Momen, S., Alavi, F., & Aider, M. (2021). Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 778–797. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.052>
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., & Cabral, F. A. (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, *107*, 250–259. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.09.020>
- Morawsky, N., Martino, G., Guth, J., Tsai, J., & Jeffcoat, R. (1996). *Hydrolyzed Zein as Fixative in Hair Compositions* (Patent No. 5,518,717).
- Moreira, R., Chenlo, F., Arufe, S., & Rubinos, S. N. (2015). Physicochemical characterization

- of white, yellow and purple maize flours and rheological characterization of their doughs. *Journal of Food Science and Technology* 2015 52:12, 52(12), 7954–7963. <https://doi.org/10.1007/S13197-015-1953-6>
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 431–476. <https://doi.org/10.1080/10408399309527643>
- Mrad, R., Debs, E., Saliba, R., Maroun, R. G., & Louka, N. (2014). Multiple optimization of chemical and textural properties of roasted expanded purple maize using response surface methodology. *Journal of Cereal Science*, 60(2), 397–405. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2014.05.005>
- Mwikya, S. M., Van Camp, J., Rodriguez, R., & Huyghebaert, A. (2001). Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *European Food Research and Technology* 2001 212:2, 212(2), 188–191. <https://doi.org/10.1007/S002170000200>
- Nayak, B., Liu, R. H., & Tang, J. (2015). Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 887–918. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.654142>
- Nieva-Echevarría, B., Manzanos, M. J., Goicoechea, E., & Guillén, M. D. (2015). 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(1), 67–80. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12121>
- O'Flynn, T. D., Hogan, S. A., Daly, D. F. M., O'Mahony, J. A., & McCarthy, N. A. (2021). Rheological and Solubility Properties of Soy Protein Isolate. *Molecules*, 26(10). <https://doi.org/10.3390/molecules26103015>
- Paraginski, R. T., Vanier, N. L., Berrios, J. D. J., de Oliveira, M., & Elias, M. C. (2014). Physicochemical and pasting properties of maize as affected by storage temperature. *Journal of Stored Products Research*, 59, 209–214. <https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2014.02.010>
- Paucar-Menacho, L. M., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., & Peñas, E. (2017). Optimization of germination time and temperature to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 236–244. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.07.064>

- Pedreschi, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry*, *100*(3), 956–963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.004>
- Peres, A. E. C., & Correa, M. I. (1996). Depression of iron oxides with corn starches. *Minerals Engineering*, *9*(12), 1227–1234. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(96\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(96)00118-5)
- Piñuel, L., Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, D. A., Morales, D., Pinto, A., Moran, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2019). Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *9*(9). <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90804>
- Piñuel, Lucrecia, Boeri, P., Zubillaga, F., Barrio, D. A., Torreta, J., Cruz, A., Vásquez, G., Pinto, A., & Carrillo, W. (2019). Production of White, Red and Black Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants 2019*, Vol. 8, Page 257, *8*(8), 257. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8080257>
- Piñuel, Lucrecia, Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, D. A., Morales, D., Pinto, A., Moran, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2019). Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *9*(9), 045–058. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90804>
- Piyapanrungrueang, W., Chantrapornchai, W., Haruthaithanasan, V., Sukatta, U., & Aekatasanawan, C. (2016). Comparison of Anthocyanin Extraction Methods from High Anthocyanin Purple Corn Cob Hybrid: KPSC 901, and Quality of the Extract Powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, *40*(5), 1125–1133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.12693>
- Poveda, T., Vilcacundo, R., Carpio, C., & Carillo, W. (2016). Analysis of sesame proteins isolate (*Sesamum indicum* L.) with water and salt treatment. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *9*(3), 404–407.
- Racine, K. C., Lee, A. H., Wiersema, B. D., Huang, H., Lambert, J. D., Stewart, A. C., & Neilson, A. P. (2019). Development and Characterization of a Pilot-Scale Model Cocoa Fermentation System Suitable for Studying the Impact of Fermentation on Putative Bioactive Compounds and Bioactivity of Cocoa. *Foods*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/foods8030102>
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T.,

- Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, & Uddin, M. S. (2022). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Rayyan, S., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2005). Flavone C-Glycosides from Leaves of *Oxalis triangularis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10057–10060. <https://doi.org/10.1021/jf051626h>
- Rector, B. G., Snook, M. E., & Widstrom, N. W. (2002). Effect of Husk Characters on Resistance to Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in High-Maysin Maize Populations. *Journal of Economic Entomology*, 95(6), 1303–1307. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.6.1303>
- Ren, S., Liu, Z., & Ding, X. (2009). Isolation and identification of two novel flavone glycosides from corn silk (*Stigma maydis*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1009–1015.
- Ren, X., Liang, Q., Zhang, X., Hou, T., Li, S., & Ma, H. (2018). Stability and antioxidant activities of corn protein hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Cereal Chemistry*, 95(6), 760–769. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cche.10092>
- Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1166995>
- Saito, M., Sakagami, H., & Fujisawa, S. (2003). Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Research*, 23(6C), 4693–4701. <https://europepmc.org/article/med/14981915>
- Salvador-Reyes, R., & Clerici, M. T. P. S. (2020). Peruvian Andean maize: General characteristics, nutritional properties, bioactive compounds, and culinary uses. *Food Research International*, 130, 108934. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108934>
- Serpa, A., Hincapié, G., & Álvarez, C. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares. *Prospectiva*, 4(3), 30–39. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-82612014000100004&lang=pt
- Serrano, S., Rincón, F., & García-Olmo, J. (2013). Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. *Journal of Cereal Science*, 58(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2013.04.006>

- Sharif, N., Fabra, M. J., & López-Rubio, A. (2019). Nanostructures of zein for encapsulation of food ingredients. *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*, 217–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815663-6.00009-4>
- Shukla, R., & Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13(3), 171–192. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9)
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2008). Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 14–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x>
- Sokrab, A. M., Mohamed Ahmed, I. A., & Babiker, E. E. (2012). Effect of germination on antinutritional factors, total, and extractable minerals of high and low phytate corn (*Zea mays* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2012.02.002>
- Somavat, P., Li, Q., de Mejia, E. G., Liu, W., & Singh, V. (2016). Coproduct yield comparisons of purple, blue and yellow dent corn for various milling processes. *Industrial Crops and Products*, 87, 266–272. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.04.062>
- Suriano, S., Balconi, C., Valoti, P., & Redaelli, R. (2021). Comparison of total polyphenols, profile anthocyanins, color analysis, carotenoids and tocopherols in pigmented maize. *LWT*, 144, 111257. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111257>
- Swallen, L. C. (1941). Zein. A New Industrial Protein. *Industrial & Engineering Chemistry*, 33(3), 394–398. <https://doi.org/10.1021/ie50375a026>
- Trehan, S., Singh, N., & Kaur, A. (2018). Characteristics of white, yellow, purple corn accessions: phenolic profile, textural, rheological properties and muffin making potential. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2334–2343. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3171-5>
- Trezza, T. A., & Vergano, P. J. (1994). Grease Resistance of Corn Zein Coated Paper. *Journal of Food Science*, 59(4), 912–915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08156.x>
- Ul-Allah, S., Ijaz, M., Nawaz, A., Sattar, A., Sher, A., Naeem, M., Shahzad, U., Farooq, U., Nawaz, F., & Mahmood, K. (2020). Potassium Application Improves Grain Yield and Alleviates Drought Susceptibility in Diverse Maize Hybrids. *Plants 2020, Vol. 9, Page 75*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9010075>
- Urango, L. (2018). Componentes del maíz en la nutrición humana. *Fondo Editorial Biogénesis*,

25.

- Vilcacundo, E., García, A., Vilcacundo, M., Morán, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2020). Antioxidant purple corn protein concentrate from germinated andean purple corn seeds. *Agronomy*, *10*(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091282>
- Vilcacundo, E., Montalvo, V., Sanaguano, H., Moran, R., Carrillo, W., & García, A. (2022). Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates. *Agronomy*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy12092217>
- Vilcacundo, R., Barrio, D., Carpio, C., García-Ruiz, A., Rúaless, J., Hernández-Ledesma, B., & Carrillo, W. (2017). Digestibility of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Protein Concentrate and Its Potential to Inhibit Lipid Peroxidation in the Zebrafish Larvae Model. *Plant Foods for Human Nutrition* 2017 72:3, 72(3), 294–300. <https://doi.org/10.1007/S11130-017-0626-1>
- Vilcacundo, Rubén, Miralles, B., Carrillo, W., & Hernández-Ledesma, B. (2018). In vitro chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, *105*, 403–411. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.11.036>
- Vivas, N. E., Waniska, R. D., & Rooney, L. W. (n.d.). Effect of tortilla production on proteins in sorghum and maize. In *Cereal chemistry (USA): Vol. v. 64*.
- Wang, H., Johnson, L. A., & Wang, T. (2004). Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *81*(7), 713–717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11746-004-966-8>
- Wang, J. Y., Miyazawa, T., & Fujimoto, K. (1991). Inhibition of Methyl Linoleate Peroxidation by Maize Zein in Powder Model System at High Water Activity. *Agricultural and Biological Chemistry*, *55*(6), 1531–1536. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870822>
- Wang, L., Xu, C., Qu, M., & Zhang, J. (2008). Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from *Zea mays* ssp. *mexicana* into cultivated maize. *Journal of Cereal Science*, *48*(2), 387–393. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2007.09.014>
- Wang, X. F., Jing, X. M., & Lin, J. (2005). Starch Mobilization in Ultradried Seed of Maize (*Zea mays* L.) During Germination. *Journal of Integrative Plant Biology*, *47*(4), 443–451. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2005.00088.X>

- Wang, Y., King, J. M., Xu, Z., Losso, J., & Prudente, A. (2008). Lutein from Ozone-Treated Corn Retains Antimutagenic Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7942–7949. <https://doi.org/10.1021/JF801562V>
- Wen, W., Li, D., Li, X., Gao, Y., Li, W., Li, H., Liu, J., Liu, H., Chen, W., Luo, J., & Yan, J. (2014). Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. *Nature Communications*, 5(1), 3438. <https://doi.org/10.1038/ncomms4438>
- Wu, L., Li, J., Wu, W., Wang, L., Qin, F., & Xie, W. (2021). Effect of extraction pH on functional properties, structural properties, and in vitro gastrointestinal digestion of tartary buckwheat protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 101, 103314. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2021.103314>
- Wu, Y., & Messing, J. (2014). Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00240>
- Yang, J., Zamani, S., Liang, L., & Chen, L. (2021). Extraction methods significantly impact pea protein composition, structure and gelling properties. *Food Hydrocolloids*, 117, 106678. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106678>
- Yang, Z., & Zhai, W. (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2009.08.012>
- Zambrano, M., Vásquez, G., Morales, D., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2020). Isolation of baby lima bean (*Phaseolus lunatus*) proteins fractions and evaluation of their antioxidant activity. *Italian Journal of Food Science*, 32(2).
- Zambrano Mendoza, J. L., Yáñez G., C., Sangoquiza Caiza, C. A., Limongi Andrade, R., Alarcón Cobeña, F., Zambrano Zambrano, E. E., Caicedo Villafuerte, M. B., Villavicencio Linzán, J. P., Cartagena Ayala, Y. E. Y. E., Parra, R., Azaquibay Inca, C. R., Quimbiamba, V., Nieto Beltrán, M. R., López Guerrero, V. A., Tapia B., C., Tacán, M., Villacrés Poveda, C. E., Garcés, S., Cañarte Bermúdez, E., ... Pinargote García, L. F. (2019). *Situación del cultivo de maíz en Ecuador: investigación y desarrollo de tecnologías en el Iniap*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5457>
- Zhang, M., Reitmeier, C. A., Hammond, E. G., & Myers, D. J. (1997). Production of Textile Fibers from Zein and a Soy Protein-Zein Blend. *Cereal Chemistry*, 74(5), 594–598. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.5.594>

- Zhang, Q., Gonzalez de Mejia, E., Luna-Vital, D., Tao, T., Chandrasekaran, S., Chatham, L., Juvik, J., Singh, V., & Kumar, D. (2019). Relationship of phenolic composition of selected purple maize (*Zea mays* L.) genotypes with their anti-inflammatory, anti-adipogenic and anti-diabetic potential. *Food Chemistry*, 289, 739–750. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.03.116>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Žilić, S., Serpen, A., Akıllıoğlu, G., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1224–1231. <https://doi.org/10.1021/jf204367z>

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Difusión de Resultados Congresos Internacionales





*10.2 Grupo AGROPROBIOPEP junto a equipos de Cromatografía
Líquida (HPLC UPLC)*





Article

Antioxidant Purple Corn Protein Concentrate from Germinated Andean Purple Corn Seeds

Edgar Vilcacundo¹, Antón García², Mario Vilcacundo³, Roberto Morán¹, Iván Samaniego⁴ and Wilman Carrillo^{1,*}

¹ Departamento de Investigación, Universidad Estatal de Bolívar, 020102 Guaranda, Bolívar, Ecuador; mvilcacundo@ueb.edu.ec (E.V.); rmoran@ueb.edu.ec (R.M.)

² Campus Universitario de Rabanales, Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; pa1gamaa@uco.es

³ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Ambato, Calle Colombia 02-11, 180150 Ambato, Ecuador; mf.vilcacundo@uta.edu.ec

⁴ National Institute of Agricultural Research (INIAP), Santa Catalina Experimental Station, Department of Nutrition and Quality, 170516 Mejía, Ecuador; ivan.samaniego@iniap.gob.ec

* Correspondence: wi.carrillo@uta.edu.ec; Tel.: +593-980-281-086

Received: 13 July 2020; Accepted: 26 August 2020; Published: 29 August 2020







Abstract: Ecuador Andean purple corn (*Zea mays* L.) was subjected to a germination process at 15–40 °C for 24–168 incubation hours. Purple corn protein concentrates (PCPCs) were obtained by alkaline extraction at pH 8.0 and pH 10.0, followed by an isoelectric precipitation process at pH 4.0, pH 5.0 and pH 6.0. Proteins and phenolic content of PCPCs was calculated. PCPC antioxidant properties were determined by the ferric-reducing antioxidant power (FRAP) in vitro method and by the 2,2-azinobis, 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid, (ABTS) in vitro method. Andean purple corn seeds were able to germinate under the germination conditions tested in this study. The higher percentage of germination was of 63.33% at 168 h/25 °C. The PCPCs protein profile was characterized for the presence of six bands with molecular weights of 14.50 kDa, 20.12 kDa, 25.18 kDa, 41.85 kDa, 59.59 kDa, and 65.87 kDa. Germinated PCPC presented a high TPC content with ranges of 605.71–1820.00 mg gallic acid equivalents (GAE)/g PCPC dry weight (DW), germinated PCPC/72 h/25 °C presented a higher value of 1820.00 mg GAE/g PCPC, DW. All germinated PCPCs samples assayed presented strong antioxidant activity when measured by the ABTS and FRAP methods. Germinated PCPC/144 h/35 °C presented high antioxidant activity by ABTS with 804.35 μmol Trolox equivalents (TE)/g PCPC DW and germinated PCPC/144 h/30 °C presented a high value by the FRAP method, 987.83 μmol TE/g PCPC DW.

Keywords: Andean purple corn; *Zea mays*; purple corn protein concentrate; germinated; antioxidant activity

Article

Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates

Edgar Vilcacundo ¹, Vinicio Montalvo ¹, Herminia Sanaguano ¹, Roberto Moran ¹, Wilman Carrillo ²
and Antón García ^{3,*}

¹ Departamento de Investigación, Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda 020102, Bolívar, Ecuador

² Departamento de Producción Animal, Campus Universitario de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

³ Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain

* Correspondence: pa1gamaa@uco.es



Citation: Vilcacundo, E.; Montalvo, V.; Sanaguano, H.; Moran, R.; Carrillo, W.; García, A. Identification of Phytochemical Compounds, Functional Properties and Antioxidant Activity of Germinated Purple Corn Protein Concentrate and Its Gastrointestinal Hydrolysates.

Agronomy **2022**, *12*, 2217. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092217>

Academic Editors:
Alžbeta Hegedúsová and
Miroslava Kačániová

Abstract: Purple corn seeds germinated at 25 °C and 35 °C for 5 days were used to obtain purple corn protein concentrate (PCPC25 and PCPC35). PCPC25 and PCPC35 were subject to gastrointestinal hydrolysis. PCPC and its hydrolysates were used to evaluate their functional and biological properties. Total flavonoid content (TFC), total flavonol content (TFLC), total anthocyanin content (TAC) and total proanthocyanin (TAP) were determined. The polyphenols and flavonoids were identified by UPLC-QDa. Protein solubility (PS), water and oil absorption capacity (WAC and OAC) were determined. The antioxidant activity was evaluated by the FRAP, ABTS and DPPH methods. PCPC35 showed the highest TFLC values (11,091.37 mg rutin equivalents (RE)/100 g dry weight DW), and TFL presented values of 7975.59 mg RE/100 g DW. The PCPCs presented better functional properties than the hydrolysates. PCPC25 presented a PS of 59.43%PS at pH 8.0, 27.77%WAC and 24.94%OAC. PCPC25 and PCPC35 showed high values of antioxidant activity. PCPC25 showed ABTS values (570.97 μmol trolox equivalents (TE)/g DW) and FRAP (772.85 μmol TE/g DW). PCPCs hydrolysates were less active with ABTS values (74.12 μmol TE/g DW) and FRAP (59.42 μmol TE/g DW).

Keywords: purple corn concentrate protein; hydrolysates; functional properties; antioxidant activity; flavonoids

10.4 Conferencista Congresos para presentación de resultados Proceso Doctoral






UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
VICERRECTORADO ACADÉMICO Y DE INVESTIGACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN



Se otorga el presente **CERTIFICADO** por haber participado como **AUTOR** EN EL VI CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA, INNOVACIÓN Y EMPRENDIMIENTO, realizado entre los días 20 al 22 de noviembre de 2019, con una duración de 40 horas académicas a:

Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

TEMA: *Effect of Germination Conditions of Seeds Andean Purple Corn in the Production of Corn Protein Concentrate with Antioxidant Activity.*

Duración: 40 Horas académicas Guaranda 10 de diciembre del 2019




Dr. Ulices E. Barragán V.
Rector




Dra. Araceli B. Lucio Q.
Vicerrectora Académica y de Investigación




UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
VICERRECTORADO ACADÉMICO Y DE INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN



Se otorga el presente **CERTIFICADO** como **CONFERENCISTA MAGISTRAL** en el V CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA, INNOVACIÓN Y EMPRENDIMIENTO, a

Ing. Marcelo Vilcacundo

Con el tema **“OBTENCIÓN Y APROVECHAMIENTO DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL”** realizado los días del 7 al 9 de noviembre de 2018.

Duración: 40 horas académicas. Guaranda, 9 de noviembre de 2018




Dr. Ulices E. Barragán V.
Rector




Dra. Araceli B. Lucio Q.
Vicerrectora Académica y de Investigación





10.5 Cursos de Formación Proceso Doctoral



CERTIFICADO



SE CONCEDE A:

Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

POR HABER APROBADO SATISFACTORIAMENTE EL CURSO:

"USO DE BASES DE DATOS EMPLEADAS PARA LA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DE ALTO IMPACTO". Realizado del 6 de junio del 2022 al 6 de julio del 2022, con una duración de 40 horas, modalidad virtual.


CARLOS NAPOLEÓN
RIBADENEIRA
SANTANA
Carlos Ribadeneira Santana, Ph.D.
Vicerrector de Investigación y Vinculación

UEB | UNIVERSIDAD
ESTATAL
DE BOLÍVAR

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN

OTORGAN EL PRESENTE CERTIFICADO

A: VILCACUNDO CHAMORRO EDGAR MARCELO

En calidad de capacitador en el curso: **ESCRITURA Y PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS: NORMATIVA, ASPECTOS GENERALES E INDEXACIÓN DE ALTO IMPACTO**, para los Docentes de Contrato, con una duración de 40 horas, desde el 18 al 25 de Febrero del 2021.

Guaranda, 04 de MARZO de 2021


EDGAR MARCELO
VILCACUNDO
CHAMORRO

PHD. ISMAEL CARRILLO
CAPACITADOR DEL CURSO


CARLOS NAPOLEÓN
RIBADENEIRA
SANTANA

DR. CARLOS RIBADENEIRA
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN



No. CERTIFICADO
VRIV-CR-0460-2021



El Rector de La Universidad Internacional de La Rioja
 De conformidad con los acuerdos adoptados por el Consejo Directivo de esta Universidad que regulan la concesión
 de Títulos Propios, certifica que **Don Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro**
 ha superado con calificación de NOTABLE (7,30) los estudios correspondientes a:

**Curso Internacional en Cultura de la Investigación
 on-line. Modalidad Ingeniería y Empresa**

Realizado del 29 de junio de 2020 al 20 de septiembre de 2020, con una duración de 100 horas
 Expide el presente Título Propio de la Universidad Internacional de La Rioja

Logroño, 20 de septiembre de 2020




El Rector: José María Vázquez García-Peñuela

Título Propio de la Universidad Internacional de La Rioja según lo dispuesto en el artículo 34.1 de la Ley Orgánica 6/2001, de 21 de diciembre, de Universidades, modificada por la Ley Orgánica 4/2007, de 12 de abril, sin carácter oficial conforme a lo establecido en dicha Ley.
 La autenticidad de este documento electrónico puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://verifirma.unir.net/CSV/03588a3-2b40-4f21-8b43-d19e4922b055>. Firmante: José María Vázquez García-Peñuela.






HUB58 y la Fundación México-Estados Unidos
para la Ciencia certifican que

Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

participó y aprobó el Curso de Innovación & Emprendimiento,
efectuado en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil,
del 26 al 30 de agosto de 2019, con una duración de 40 horas.



Ing. Walter Mera Ortiz, Ph.D.
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL,
COORDINADOR DEL HUB58



Ing. Carlos Martínez Cortes
GERENTE LATINOAMÉRICA DE
FUNDACIÓN MÉXICO-ESTADOS UNIDOS
PARA LA CIENCIA



