



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema: Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de almidón y proteína en harina de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.

Proyecto de trabajo de titulación, modalidad Proyecto de investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniero(a) en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este trabajo es parte del proyecto: “Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana”, aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la DIDE de la UTA, Resolución 2074-CU-P-2016. Y una parte de este trabajo del proyecto “Hidrolizados de proteínas de origen animal y vegetal con capacidad antimicrobiana y antioxidante para diferentes usos en la Agroindustria” UEB.

Autora: Sumba Coraizaca Angélica Valeria

Tutor: Mayra Paredes, PhD.

Co-Tutor: Marcelo Vilcacundo, MSc

Ambato-Ecuador

Julio – 2019

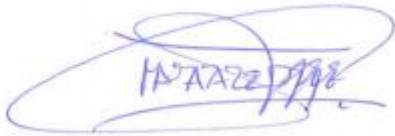
APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mayra Liliana Paredes Escobar

CERTIFICA:

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

Ambato, 8 de julio del 2019



Mayra Liliana Paredes Escobar, PhD.

C.I 0501873954

TUTOR

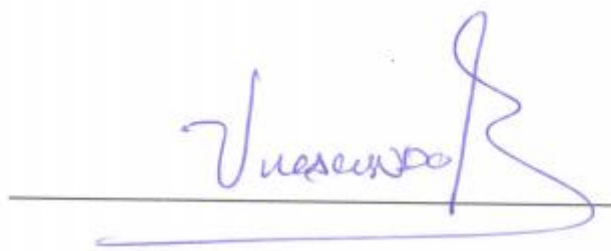
APROBACIÓN DEL COTUTOR

MSc. Vilcacundo Chamorro Edgar Marcelo

CERTIFICA:

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

Ambato, 8 de julio del 2019



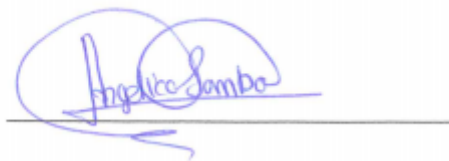
MSc. Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro

C.I 1803015484

COTUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Sumba Coraizaca Angélica Valeria, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, reading "Angélica Sumba", is written over a horizontal line. The signature is stylized with loops and a long horizontal stroke at the end.

Sumba Coraizaca Angélica Valeria

C.I. 0302350160

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del tribunal

PhD. Rodny David Peñafiel Ayala



MSc. Cecilia Mercedes Carpio

C.I. 170462765-0



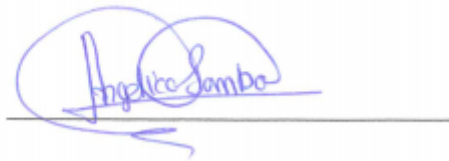
PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714346885-9

Ambato 22 de julio del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución. Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, reading "Angélica Samba", is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large loop at the beginning.

Sumba Coraizaca Angélica Valeria

C.I. 0302350160

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme cada día de mi vida y poner en mi camino gente maravillosa que siempre me apoya para continuar luchando por mis ideales.

A mi mami Nelly por todos los sacrificios que hizo por mí.

A mi Nelly E por ser mi mejor amiga y confidente.

Ernesto por apoyarme, motivarme y ser mi inspiración.

A la memoria de mis angelitos: hermanita, Juanito y Antonio que me cuidan desde el cielo.

A mi adorado sobrino por toda la alegría y amor que me ha dado desde que nació.

A mi mentora Lcda. Miriam Vélez y toda su distinguida familia por todo su apoyo.

“Gracias por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones ofreciéndome su total confianza”

AGRADECIMIENTO

A Dios por estar conmigo en cada momento de mi vida, y llenar de bendiciones a mi familia.

A mi madre y hermanos por todo su apoyo en todas las etapas de mi vida.

A la PhD. Mayra Paredes mi tutora de tesis por toda la paciencia, por sus conocimientos y valioso tiempo compartidos en la realización del proyecto

y Msc. Marcelo Vilcacundo mi cotutor por todo su apoyo para la realización de este proyecto.

Infinitamente agradecida con la Ing, Cecilia Carpio, por compartir conmigo toda su experiencia.

A la Dra. Dayana Morales y Dr. Jorge Briceño por su apoyo incondicional.

A mis amigos Santy, Chris, Gabriela y Xime que han sido un apoyo incondicional durante todo mi proceso formativo.

A Eugenia, David, y a todos quienes de una u otra manera me han apoyado a alcanzar esta meta.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
APROBACIÓN DEL COTUTOR	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iv
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DERECHOS DE AUTOR	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	ix
Capítulo I.....	17
MARCO TEÓRICO	17
1.1. Antecedentes Investigativos	17
1.1.1. Cañihua.....	17
1.1.2. Índice glucémico.....	19
1.1.3. Azúcares libres	20
1.1.4. Fibra cruda.....	20
1.1.5. Almidón.....	20
1.1.6. Digestibilidad del almidón en el tracto gastrointestinal	22
1.1.7. Amilasa.....	23
1.1.8. Amiloglucosidasa	23
1.1.9. Almidón digerible.....	24
1.1.10. Almidón resistente	24
1.1.11. Proteínas.....	25
1.1.12. Concentrados proteicos vegetales	26
1.1.13. Digestibilidad de la proteína	26

1.1.14.	Electroforesis	27
1.1.15.	Aminoácidos	27
1.2.	Objetivos.....	27
1.2.1.	Objetivo general	27
1.2.2.	Objetivos específicos	28
Capítulo II.....		29
MATERIALES Y MÉTODOS.....		29
2.1.	Materiales	29
2.1.1.	Materia prima	29
2.1.2.	Materiales de laboratorio	29
2.1.3.	Equipos empleados en la investigación	30
2.1.4.	Reactivos empleados en la investigación	30
2.2.	Metodología.....	32
2.2.1.	Obtención de harina de cañihua (<i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen).....	32
2.2.2.	Determinación de humedad de las semillas y harina de cañihua (<i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen).....	32
2.2.3.	Determinación de cenizas	32
2.2.4.	Determinación del contenido de grasa.....	33
2.2.5.	Determinación de fibra cruda	33
2.2.6.	Determinación de azúcares	33
2.2.6.2.	Extracción de azúcares con agua a 60°C	34
2.2.6.3.	Clarificación.....	34
2.2.6.4.	Azúcares reductores	34
2.2.6.5.	Azúcares totales con hidrólisis química con HCl	35
2.2.6.6.	Azúcares totales con hidrólisis enzimática de Invertasa.....	35
2.2.7.	Cuantificación del almidón.....	35

2.2.8.	Hidrólisis del almidón por α -amilasa	36
2.2.9.	Contenido de carbohidratos	36
2.2.10.	Proteínas.....	36
2.2.10.1.	Obtención de concentrado proteico	36
2.2.10.2.	Cuantificación proteínas en harina y concentrado por microkjeldahl ..	36
2.2.11.	Digestibilidad de las proteínas	37
2.2.11.1.	Digestibilidad gastrointestinal <i>in-vitro</i>	37
2.2.11.2.	Digestibilidad duodenal <i>in vitro</i>	38
2.2.12.	Electroforesis	38
2.2.12.1.	Preparación de los geles de poliacrilamida.....	38
2.2.12.3.	Buffer running.....	39
2.2.12.4.	Carga de las muestras y proceso de separación y teñido de los geles ..	39
Capítulo III	41
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	41
3.1.	Análisis proximal de la harina de (<i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen).....	41
3.2.	Determinación del contenido de azúcares reductores, sacarosa y azúcares totales con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).	42
3.3.	Hidrólisis del almidón por α -amilasa.	44
3.4.	Concentración de proteínas.	46
3.5.	Digestibilidad de la proteína de cañihua.	46
3.6.	Contenido de aminoácidos en la cañihua	47
Capítulo IV.-	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
4.1.	Conclusiones	50
4.2.	Recomendaciones.....	50
MATERIAL DE REFERENCIA	52

5.1. Referencias bibliográficas	52
A 12. Almidón rápidamente hidrolizado a maltosa por α -amilasa:	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de cañihua.	17
Figura 2. Comparación entre la fructificación de: a quinua, b huauzontle y c cañihua (10x)....	18
Figura 3. Estructura de molécula de almidón.....	21
Figura 4. Estructura de molécula de amilosa.	21
Figura 5. Estructura de molécula de amilopectina.	22
Figura 6. Molécula de maltosa	23
Figura 7. Molécula de glucosa.	24
Figura 8. Cuantificación de fracciones de almidón con el kit de glucosa.	43
Figura 9. Cinética de hidrólisis del almidón de cañihua y almidón de maíz.....	45
Figura 10. Electroforesis sds-page de proteínas concentradas de cañihua, obtenidas mediante precipitación isoelectrica a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación.	46
Figura 11. Curva estándar para cuantificación de Nitrógeno.	63
Figura 12. Curva estándar de glucosa.	65
Figura 13. Curva estándar de glucosa para glucosa oxidasa/peroxidasa reagent G 3660.	67
Figura 14. Granos de cañihua.....	71
Figura 15. Clasificador granulométrico	71
Figura 16. Extracción de grasa en harina de cañihua.	71
Figura 17. Extracción de azúcares en agua a 60°C.	71
Figura 18. Alícuota de muestra+ DNS antes de reacción.	71
Figura 19. Extracción de la invertasa.....	71
Figura 20. Gelatinización del almidón de cañihua.	72
Figura 21. Estándares del kit para cuantificación de glucosa. (GAGO-20)	72
Figura 22. Muestras para cuantificación de almidón.	72
Figura 23. Precipitación de proteínas.....	72
Figura 24. Aforo de digeridos proteicos.....	72
Figura 25. Estándares para cuantificación de proteínas listas para lectura de absorbancias.....	72
Figura 26. Simulación de digestibilidad en proteínas.	73
Figura 27. Muestras para corrida de electroforesis	73
Figura 28. Gel solución de desteñido	73
Figura 29. Fotodocumentador de gel de poliacrilamida, (Geltower).	73

Figura 30. Curva de cinética para determinación de actividad de la invertasa.	78
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Comparación entre la composición proximal de granos andinos.	41
<i>Tabla 2.</i> Contenido de azúcares en harina de cañihua.	42
<i>Tabla 3.</i> Perfil de aminoácidos en harina de cañihua.	48
<i>Tabla 4.</i> Datos para la humedad de harina de cañihua.	62
<i>Tabla 5.</i> Datos para determinación de contenido de grasa en harina de cañihua.	62
<i>Tabla 6.</i> Datos para determinación de fibra cruda.	62
<i>Tabla 7.</i> Datos para curva estándar de N.	63
<i>Tabla 8.</i> Datos obtenidos para determinación de proteína.	64
<i>Tabla 9.</i> Concentraciones de glucosa para la curva estándar.	64
<i>Tabla 10.</i> Datos para determinación de azúcares reductores.	65
<i>Tabla 11.</i> Datos para determinar azúcares totales.	66
<i>Tabla 12.</i> Datos obtenidos de la hidrólisis con invertasa.	66
<i>Tabla 13.</i> Almidón total determinación con dns.	66
<i>Tabla 14.</i> Curva de calibración con el kit para determinación de glucosa, glucose (GO) assay kit (GAGO-20).	66
<i>Tabla 15.</i> Cuantificación de almidón total.	67
<i>Tabla 16.</i> Determinación de almidón resistente.	67
<i>Tabla 17.</i> Fracciones de carbohidratos generados durante la digestión in vitro en harina de cañihua.	68
<i>Tabla 18.</i> Fracciones de carbohidratos generados durante la digestión in vitro en almidón de maíz.	69
<i>Tabla 19.</i> Composición del gel separador o de resolución.	75
<i>Tabla 20.</i> Composición del gel concentrador o de apilamiento.	75

RESUMEN

La cañihua es un grano andino poco conocido que ha demostrado tener iguales o mejores propiedades nutricionales y funcionales que los granos comúnmente conocidos como la quinua y el amaranto. De la composición nutricional en la cañihua se destaca con un $15,6 \pm 0,21\%$ de proteína, $8,54 \pm 0,16\%$ de grasa y $6,74 \pm 0,64\%$ de fibra cruda. El contenido de azúcares solubles en agua fue determinado con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se empleó el Kit Glucosa (GAGO-20) para la determinación de almidón total y digerible. En cuanto a la tasa de hidrólisis del almidón a maltosa, la cañihua demostró que posee almidón lentamente digerible. En el concentrado proteico de la cañihua mediante electroforesis SDS-PAGE, se evidenció que es una buena fuente de proteína digerible. Adicionalmente la proteína de la cañihua posee aminoácidos esenciales entre los cuales se destaca la lisina que generalmente es el aminoácido limitante en la mayoría de los productos alimenticios.

Palabras clave: Baby quinua, digestibilidad gastrointestinal, *Chenopodium pallidicaule* Aellen, harina de cañihua, α -amilasa, azúcares totales.

ABSTRACT

Cañihua is one of the little-known Andean grains, that has been shown to have equal or better nutritional and functional properties than those commonly known as quinoa and amaranth. The nutritional composition of cañihua is: $15.6 \pm 0.21\%$ protein, $8.54 \pm 0.16\%$ fat, $6.74 \pm 0.64\%$ crude fiber and $2.64 \pm 0.15\%$ ash. The content of water-soluble sugars was determined with the method of 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) and total starch, resistant starch was measured with the Glucose Determination Kit (GAGO-20). Regarding the kinetics of starch hydrolysis in cañihua seed: the ratio slowly hydrolyzed starch to maltose is higher than of rapidly hydrolyzed to maltose starch. As protein concentrate of cañihua was proven by SDS-PAGE electrophoresis that it is digestible by enzymes such as pepsin and pancreatin, so that cañihua is a good source of digestible protein.

Key words: Baby quinoa, gastrointestinal digestibility, cañihua flour, *Chenopodium pallidicaule* Aellen, α -amylase, total sugar.

Capítulo I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Cañihua

El nombre botánico de la cañihua es *Chenopodium pallidicaule* Aellen conocida también como: kañiwa, kañahua, kañagua, quitacañihua, ayara y cuchi-quinua en el idioma Quechua, pertenece a la familia Chenopodiaceae (**National Research Council, 1989**). Es un pseudocereal originario de los Andes Altos de Sudamérica específicamente de Perú, Bolivia y escasamente en Ecuador, donde se cultivaba desde épocas pre-colombinas (**FAO, 2017; Simmonds, 1965**). Se desarrolla en altitudes entre 3800 y 4400 msnm, normalmente crece en los cultivos de quinua y requiere un mínimo cuidado (**Peñarrieta et al., 2008**). Puede tolerar temperaturas frías de hasta 5°C para germinar, 10°C para florecer y 15°C para que sus semillas desarrollen y crecen correctamente hasta temperaturas de 25°C. Tolera suelos salinos y con pH de: 4,8 a 8,5 (**National Research Council, 1989**).



Figura 1. Semillas de cañihua.

Fuente: Laboratorio de Análisis de los Alimentos-FCIAB (2019).

A la cañihua se la consideraba como una variedad de quinua hasta 1926, sin embargo, a partir de dicho año se la identificó como una especie diferente. Su planta varía significativamente de la quinua, porque es una planta erecta o semi-postrada, muy ramificada y tupida. Sus hojas y tallos pueden variar entre los colores rojo, amarillo y

verde (**Gade, 1970**). Crece de 20 a 60 cm de altura, de manera que es más pequeña que la quinua cuya altura varía de 20 cm a 2 m dependiendo del terreno de cultivo (**Bruno et al., 2018**). Otra marcada diferencia entre estas dos especies es la inflorescencia. En la Figura 2 (A), se observan las semillas de quinua, mientras que, en la Figura 2 (B) se observan las semillas de Huauzontle (*Chenopodium* cultivada en México). Éstas últimas, se cubren de follaje y se derraman a tiempos establecidos para su cosecha. Mientras que, la Figura 2 (C) corresponde a semillas de la cañihua, estas se cubren en el follaje y se derraman libremente apenas las flores se abren, independientemente del tiempo. Esto provoca un menor rendimiento de su cultivo (**Bruno et al., 2018; Simmonds, 1965**).

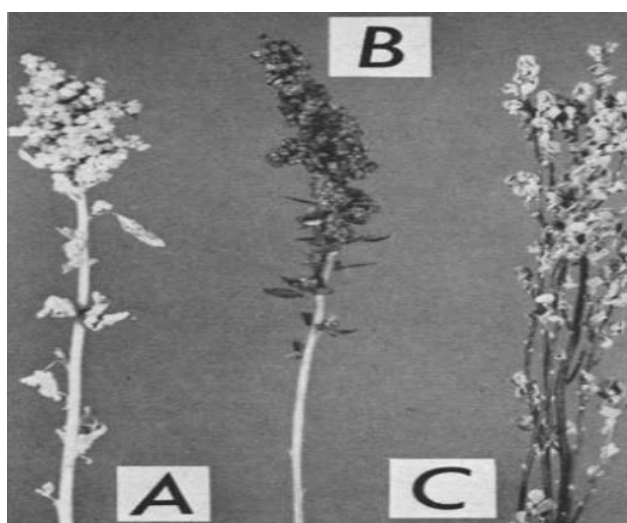


Figura 2. Comparación entre la fructificación de: A Quinoa, B Huauzontle y C cañihua (10x).

Fuente. Simmonds (1965)

La cañihua posee un bajo porcentaje de saponinas, de manera que no requiere procesos de extracción (**Repo-Carrasco et al., 2010**). La harina tostada de cañihua se denomina cañihuaco y es utilizada por los agricultores para realizar papillas con leche, caldo o agua que se consume como desayuno, se elaboran galletas denominadas quishpiños, en conjunto con harina de trigo se elabora pan, una bebida denominada chocolate y antiguamente era germinada para fabricar bebidas ligeramente alcohólicas que se consumían en conjunto con la cerveza (**Gade, 1970; Peñarrieta et al., 2008**). La cañihua es muy importante en la dieta de los agricultores andinos de Perú y Bolivia debido a que son fuente de: carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales (**Alvarez et al., 2010; Rosell et al., 2009; Shotts et al., 2018**). También posee vitaminas como la tiamina, niacina, tocoferol y carotenoides (**Alvarez et al., 2010; Bruin, 1964**). Es una buena

fuelle de hierro, calcio y zinc (**Repo-Carrasco et al., 2010**), y otros metales como potasio, calcio, fósforo, magnesio, sodio, azufre, manganeso, boro, cobre y cobalto (**Bruin, 1964**).

Entre sus principales carbohidratos están: almidones, azúcares reductores, azúcares no reductores, fibra cruda y pentosanos (**Bruin, 1964; Gross et al., 1989**). Su contenido de carbohidratos es de 50-65%, de los cuales el almidón representa el 49% (**Repo-Carrasco et al., 2009**). La cañihua tiene un alto contenido de fibra dietética y lignina (**Repo-Carrasco et al., 2009**). Posee también compuestos fenólicos y flavonoides con alta actividad antioxidante (**Peñarrieta et al., 2008; Repo-Carrasco y Encina, 2008**).

Aparte de la fibra, existen otros carbohidratos de fuentes vegetales que aportan propiedades funcionales. Así, la importancia nutricional de la fibra y otros carbohidratos en los alimentos va en aumento. **Birt et al. (2013)**, mencionan que un aumento del consumo de componentes no digeribles y con menores índices glucémicos (IG) como los que ofrecen: la fibra, almidones resistentes y almidones de digestión lenta, se asocian con beneficios a la salud tanto para los sujetos sanos como para los pacientes con resistencia a la insulina. Esto debido a que son componentes alimentarios cuyos IG son bajos lo que provoca la reducción de la glucosa en sangre postprandial (**Fuentes-Zaragoza et al., 2011**).

1.1.2. Índice glucémico

El índice glucémico (IG) es una clasificación de carbohidratos basada en su efecto inmediato sobre los niveles de glucosa en la sangre y un indicador útil de la digestión del almidón en alimentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el IG como el área incremental bajo la curva de respuesta de glucosa en sangre de una porción de 50 g de carbohidratos disponibles de un alimento de prueba, que se expresa como un porcentaje de la respuesta a la misma cantidad de carbohidratos de un alimento estándar consumido por un sujeto (**Parada y Rozowski, 2008**). Durante la digestión, los carbohidratos que se descomponen rápidamente tienen altos índices glucémicos, que dan respuestas rápidas y altas de glucosa. Por otro lado, los carbohidratos que se descomponen lentamente tienen índices glucémicos bajos debido a que liberan la glucosa gradualmente en el torrente sanguíneo (**Moore et al., 2015**).

1.1.3. Azúcares libres

Los azúcares libres, entre los cuales se pueden mencionar las pentosas, hexosas y algunos disacáridos (lactosa, maltosa y sacarosa), que en su mayoría se tratan de azúcares reductores, son conocidos como azúcares rápidos por la velocidad de absorción en el intestino delgado (**Adrian et al., 2000**). Los azúcares libres están en menor proporción que los azúcares combinados que forman polisacáridos. Es así como, en cereales y pseudocereales el contenido de azúcares libres generalmente varía de 1 a 3% en peso (**Badui, 2012**). **Yaman et al. (2019)** mencionan que la cantidad de azúcares libres están directamente relacionados con el IG de los alimentos.

1.1.4. Fibra cruda

La fibra es un compuesto heterogéneo formado por: celulosa, hemicelulosa y lignina (**Ramírez y Arrubla, 2015**). Nutricionalmente es el carbohidrato resistente presente en la mayoría de los alimentos y aporta diversos beneficios al consumidor que van desde mayor volumen fecal, menor pH colónico, mejoras en el control glucémico y la salud intestinal, reduce los factores de riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular, así como el aumento de la laxación y la reducción del riesgo de cáncer del tracto digestivo (**Grossi et al., 2012**). La determinación de la fibra dietética no es fácil, ni barata, por ello es común que se la determine como una de las seis fracciones que reporta el análisis proximal del alimento. La fibra cruda corresponde a la fracción insoluble en ácido (H_2SO_4 , 1,25%) y álcali (NaOH , 1,25%) (**Ramírez y Arrubla, 2015**).

Un concepto muy utilizado son los polisacáridos distintos al almidón y dentro de esta fracción están considerados los β -glucanos, pectinas, gomas, incluyendo a la hemicelulosa y celulosa. Los tres primeros compuestos más el almidón resistente constituyen lo que se conoce como la fibra dietaria soluble (**Escudero y González, 2006**).

1.1.5. Almidón

El almidón es un carbohidrato formado por amilosa (20%) y amilopectina (80%).

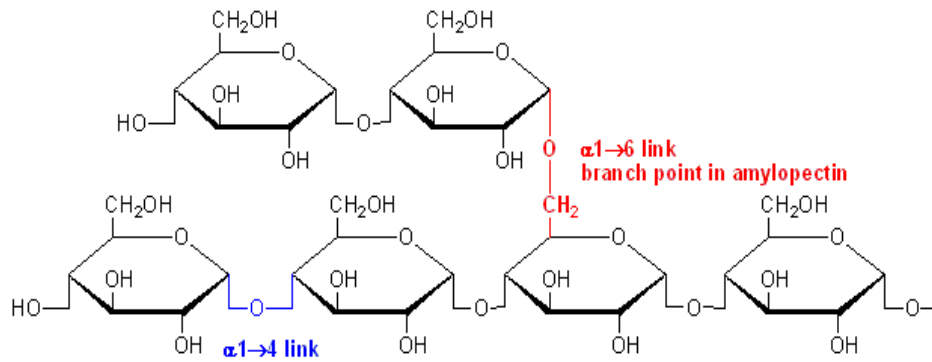


Figura 3. Estructura de la molécula de almidón.
Fuente: Bender (2015)

La amilosa está conformada por anhidro glucosas unidas por enlaces α (1-4) y un leve grado de ramificación en los enlaces α (1-6), es poco soluble en agua y tiene la capacidad de formar geles.

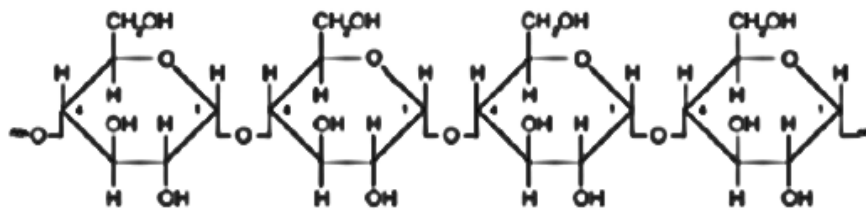


Figura 4. Estructura de la molécula de amilosa.
Fuente: Meneses et al. (2007).

Por otra parte la amilopectina es la molécula más grande constituyendo aproximadamente el 80% del almidón, presenta enlaces glucosídicos α (1-4) y α (1-6) que le otorgan la estructura ramificada; sus monómeros interconectados forman una estructura que se fracciona fácilmente (Castro, 2006).

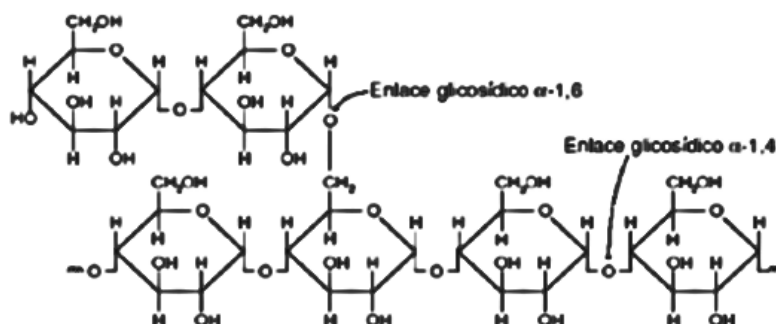


Figura 5. Estructura de la molécula de amilopectina.

Fuente: Meneses et al. (2007).

El papel botánico del almidón es proporcionar a las plantas una reserva de glucosa para el metabolismo. Esta reserva se almacena en una estructura fácilmente disponible para la planta, como semillas o pulpa de tubérculos, los cuales sobreviven largos períodos de tiempo. Su estructura es compleja y varía ampliamente; el tipo y grado de cristalinidad presentado dentro del gránulo, se ha encontrado que influye en la digestibilidad. El almidón amiláceo (con cadenas largas y lineales) tiene mayor tendencia a formar estructuras cristalinas que el almidón con cadenas cortas y altamente ramificadas. Debido a esto el almidón rico en amilosa tiende a ser más resistente a la digestión que el almidón con bajo contenido de amilosa (**Meléndez, 2016**).

1.1.6. Digestibilidad del almidón en el tracto gastrointestinal

Los almidones se clasifican en digeribles e indigeribles (**Badui, 2012**). El almidón digerible es aquel que es hidrolizado por la α -amilasa en el tracto gastrointestinal y absorbido por el torrente sanguíneo principalmente como glucosa (**Brownlee et al., 2018**). Esta digestibilidad del almidón está influenciada por: componentes no amiláceos presentes, la estructura del almidón y el procesamiento del almidón antes de la digestión. Por lo tanto, la digestibilidad del almidón no se debe a un solo factor y generalmente para clasificar el almidón se emplea el factor extrínseco con la mayor influencia en la digestibilidad (**Deepa et al., 2010**).

Bustos et al. (2017), mencionan que el almidón sea cual fuere su fuente se digiere a igual velocidad y medida. Sin embargo, **Slaughter et al. (2001)**, sugieren que alimentos de concentración parecida en carbohidratos disponibles presentan grandes diferencias en el aumento postprandial de la glucosa e insulina en la sangre. **Kaur et al. (2015)** mediante estudios de digestibilidad *in-vivo* e *in-vitro*, demostraron que el almidón de diferente fuente alimentaria se digiere a tasas drásticamente diferentes.

Los problemas para simular la digestión *in-vivo* con técnicas simples *in-vitro* ocurren en primer lugar debido a la estructura botánica del almidón, que no debe destruirse más que con la masticación normal durante la preparación de la muestra. Además, **Kingman y Englyst (1994)**, mencionan que la interacción de almidón y proteína restringe la

posibilidad de un proceso α -amilolisis *in-vitro* y sugiere que es importante que enzimas proteolíticas se incluyan en el ensayo *in-vitro*.

La digestibilidad de los almidones mediante enzimas es empleado para entender cómo, las propiedades estructurales del almidón (velocidad, grado y sitio de digestión) influyen en la cinética de digestión enzimática; y comprender las amplias diferencias reportadas en los índices glucémicos e insulínicos postprandiales de los alimentos en el ser humano (Englyst et al., 2003). Granfeldt et al. (1992) concluyen que la tecnología *in-vitro* ofrece un buen potencial para predecir el comportamiento metabólico de los alimentos ricos en almidón.

1.1.7. Amilasa

La enzima α -amilasa pancreática hidroliza aleatoriamente los enlaces glucosídicos α -1,4, del almidón generando maltosa y oligosacáridos lineales cortos. La α -amilasa presenta una alta actividad en el lumen del intestino delgado y no limita la velocidad de la digestión ni absorción de carbohidratos (Birt et al., 2013; Fogel y Gray, 2017). La especificidad conocida de la enzima para los enlaces glucosídicos α -1,4 y el conocimiento de que muchos almidones botánicos tienen un alto contenido de amilopectina impone un límite a la acción catalítica de la amilasa a mínimo 3 o 4 moléculas de glucosa distantes de un alfa α -1,6 (Badui, 2012).

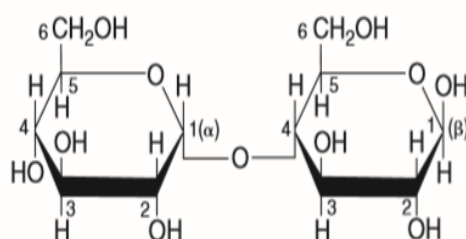


Figura 6. Molécula de maltosa
Fuente: Badui (2012)

1.1.8. Amiloglucosidasa

La amiloglucosidasa (glucoamilasa) tiene actividad de exo-amilasa, que ataca los residuos de glucosa terminales para producir glucosa (Castro, 2006; Slaughter et al., 2001).

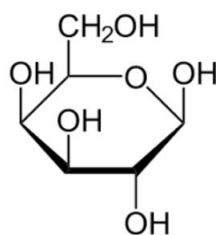


Figura 7. Molécula de glucosa.

Fuente: Badui (2012)

1.1.9. Almidón digerible

El almidón digerible es completamente asimilado en el intestino delgado y es el responsable de la elevación de la glucosa postprandial del plasma (**Kaur et al., 2015a**). **Deepa et al. (2010)** mencionan que el IG e insulínico postprandial y el contenido de almidón de un alimento son indicadores de su digestibilidad, por lo tanto, permiten clasificar los alimentos en: almidones de digestión rápida (ADR), almidón de digestión lenta (ADL) y almidones resistentes (AR) (**Aarathi et al., 2003**).

Los ADR es responsable del aumento drástico del IG en el plasma sanguíneo y el ADL, por el contrario, atenúa los niveles de insulina y glucosa postprandial en el plasma (**Kaur et al., 2015a**). El ADL es beneficioso para el organismo porque ayuda a controlar desórdenes metabólicos como la diabetes y la hiperlipidemia (**Ashraf et al., 2012; Goñi, Garcia-Alonso, et al., 1997**)

1.1.10. Almidón resistente

Almidón resistente es la fracción del almidón ingerido, que se escapa a la digestión con α -amilasa pancreática, α y β glucosidasas en el intestino delgado y llega al intestino grueso como fibra dietética. Aquí es fermentado por enzimas bacterianas en el colón, dando como productos principales los ácidos grasos de cadena corta: ácidos acéticos, propiónicos y butíricos y produciendo efectos comparables con la fibra dietética. Es una fuente de carbono y energía para las 400–500 especies de bacterias presentes en este ambiente anaeróbico y, por lo tanto, altera potencialmente la composición de la microbiota, con ello se reduce el pH en el colon y los niveles de amoniaco creando un ambiente menos propenso a la formación de tumores cancerosos (**Birt et al., 2013; Fuentes-Zaragoza et al., 2011**).

Factores como el tamaño de los fragmentos molidos, la estructura y conformación de los gránulos de almidón intactos, y la formación de cristalitas retrogradados como resultado del procesamiento pueden hacer que el almidón sea resistente a la digestión (**Fuentes-Zaragoza et al., 2011**).

Englyst et al., (1996) propuso un sistema de clasificación basado en los 5 tipos de almidón resistente:

- El almidón Resistente Tipo I: se sintetiza en el endospermo de granos donde las estructuras físicas dificultan la digestibilidad del almidón y reducen la respuesta glucémica.
- El almidón Resistente Tipo II: es el polimorfo, altamente resistente a la hidrólisis enzimática.
- El almidón Resistente Tipo III: es amilosa retrogradada. La amilosa tiene estructuras lineales con una gran tendencia a formar hélices dobles, a temperaturas cercanas a la refrigeración.
- El almidón Resistente Tipo IV: es el modificado químicamente, formado por reticulación o por adición de derivados químicos. Permanece en forma granular después de la cocción, con poca susceptibilidad enzimática, y no puede ser hidrolizado por las amilasas o fermentado por los microbios.
- El almidón Resistente Tipo V: es el que interactúa con los lípidos y forman complejos helicoidales con ácidos y alcoholes grasos.

1.1.11. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas que en conjunto con los ácidos nucleicos constituyen las moléculas de información en los seres vivos, a través de las cuales desempeñan diversas funciones en el organismo. Estas funciones van desde: la regulación de procesos bioquímicos, defensa, transporte, aporte energético y contracción muscular (**Badui, 2012**). Su estructura está formada por un grupo carboxilo, un grupo amino y una cadena lateral R1, que es diferente para cada aminoácido existiendo un total de 20 aminoácidos (**Rembado y Sceni, 2009**). Para la cuantificación de proteína se mide el contenido total de nitrógeno, aun cuando se conoce que la totalidad del nitrógeno no está en forma proteica, de manera que la cuantificación de las proteínas es de forma indirecta y aproximada (**Adrian et al., 2000**). **Repo-Carrasco et al., (2003)** reporta para la cañihua

un contenido de proteína entre el 14-19%, con un 45 y 40 % de albumina y globulina respectivamente. “El contenido de proteína en la cañihua como grano entero es superior en porcentaje a otros pseudocereales como la quinua y la kiwicha ” Pp.17 (**Espinoza, 2017**).

1.1.12. Concentrados proteicos vegetales

Los concentrados proteicos son obtenidos mediante precipitación isoeléctrica de las proteínas (**Betalleluzl et al., 2017**). La solubilización de proteínas ocurre a pH alcalino, debido a la neutralización de la carga positiva en las cadenas laterales de las moléculas que impide la formación de una interacción electrostática, lo que produce una solubilización de proteínas. A pH cercanos a 10,96, se modifica las estructuras originales de las proteínas lo que resulta favorable para aumentar su potencial tecnológico y mejorar sus propiedades funcionales, pero también a estas condiciones una porción de las moléculas sufre hidrólisis (**Martínez y Añón, 1996**). Además, en esos valores de pH los grupos ionizables que adquieren cargas negativas traen como consecuencia una expansión de las moléculas causada por repulsiones intramoleculares debido a sus cargas iguales. Lo que provoca que las proteínas en los concentrados se encuentren más desplegadas, de manera que se facilita grandemente la buena funcionalidad en sus interfases y las propiedades funcionales como: la capacidad de emulsificación y de espumado (**Badui, 2012**).

1.1.13. Digestibilidad de la proteína

La digestión de la proteína inicia en el estómago por acción de una endopeptidasa denominada pepsina (**Aguinda, 2019**). La digestión en el duodeno y el yeyuno inicia debido a las enzimas endopeptidasas liberadas por el páncreas: tripsina, quimotripsina, colagenasa y exopeptidasas (**Gil y Sanchez-Medina, 2010**). Estudios encontraron que los péptidos resultantes de la digestión gastrointestinal duodenal de proteínas en la quinua presentan características benéficas para la salud porque son fuente de péptidos biológicamente activos. Estos péptidos se encuentran inactivos en la proteína original y pueden ser convertidos a su forma activa a través de la digestión intestinal o hidrólisis con proteasas (**Espinoza, 2017**). El tratamiento enzimático y las condiciones controladas representan una manera efectiva de mejorar las propiedades funcionales de la proteína sin afectar su valor nutritivo (**Li et al., 2012**).

Medir la digestibilidad *in vivo* en animales resulta costosa, consume mucho tiempo y requiere diversos permisos, por ello se han desarrollado métodos *in vitro* rápidos y convenientes como la hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina, seguida de la determinación de aminoácidos (**Ruales y Nair, 1994**). La digestibilidad de las proteínas *in vitro* mediante el uso de la pepsina por primera vez reportó **Astwood (1996)** en un estudio para determinar la alergenicidad de las proteínas. Emplearon la digestibilidad *in vitro* con pepsina para digerir las proteínas alergénicas y no alergénicas en Fluido gástrico simulado (SGF, a 0,35M de NaCl y pH de 1,2 con pepsina).

1.1.14. Electroforesis

La electroforesis SDS – PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis), es una técnica para la caracterización de proteínas que permite separar e identificar las fracciones proteicas en una muestra de acuerdo con su peso molecular, mediante la comparación frente a un estándar de referencia. Se prepara un gel de poliacrilamida, se deposita la muestra y los patrones en los distintos pocillos del gel, posteriormente se aplica una corriente eléctrica que genera un campo eléctrico que provoca que las moléculas de péptidos o de proteínas se desplacen a una velocidad que depende de su carga y peso molecular (**Pérez et al., 2015; Yabar, 2003**).

1.1.15. Aminoácidos

Los aminoácidos condicionan las propiedades funcionales en muchos productos y son importantes en la alimentación. Entre la composición de los aminoácidos de la cañihua se destaca: lisina, isoleucina, tirosina y triptófano (**Gross et al., 1989; Repo-Carrasco y Encina, 2008**). A la cañihua se le atribuye una composición de aminoácidos similar a la caseína de la leche (**Chirinos et al., 2018; Repo-Carrasco et al., 2003; White et al., 1955**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de almidón y proteína en harina de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.

1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar bromatológicamente la harina de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.
- Cuantificar el contenido de almidón y proteína en harina de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.
- Determinar la digestibilidad del almidón en harina de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.
- Determinar la digestibilidad de la proteína en harina de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedad Cupi.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se desarrolló en los laboratorios de Alimentos funcionales BIOPROPEPTI, laboratorio de Análisis de Alimentos y en el laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE-ICIA, Proyecto de Canje de Deuda) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato y en el Centro de investigación y vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar.

2.1. Materiales

2.1.1. Materia prima

Se trabajó con harina de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), Ecosistema Distrito de Lima-Perú.

2.1.2. Materiales de laboratorio

- Desecadores
- Cajas Petri
- Crisoles
- Capuchones
- Probetas
- Vasos de precipitación
- Equipo soxhlet
- Pinzas
- Esferas de ebullición
- Crisoles tipo gooch
- Tubos falcon de 50 ml
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Tubos de vidrio de 15 ml con tapa rosca
- Magnetos
- Puntas de 200 y 1000 μ L
- Micropipetas

- Gradillas
- Vasos de precipitación

2.1.3. Equipos empleados en la investigación

- Molino (Oster)
- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Agitador (VWR)
- Balanza Analítica (VWR-224AC)
- Plancha de agitación (Isotemp Fisher Scientific)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Microcentrífuga (Labnet 5702 eppendorf)
- Micro-incubador (Esco, Provolcell Shaking)
- pH-metro (Thermo Scientific)
- Congelador (Panasonic)
- Refrigerador (Indurama Modelo RI-470 y Mabe)
- Agitador vórtex (VWR)
- Liofilizador de sobremesa (Bench Top Pro with Omnitronics)
- Equipo de electroforesis (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System)
- Estufas (VWR y MEMMERT)
- Clasificador Granulométrico (RESTCH)
- Espectrofotómetro (Modelo DR-500)
- Extractor de fibra (VELP SCIENTIFICO)
- Extractor de solvente (VELP SCIENTIFICA SER 148)
- Mufla (NABER THERM)
- Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.

2.1.4. Reactivos empleados en la investigación

- Hexano (MERCK)
- Selenio en grageas (ANALAR)
- Sulfato de cobre (MERCK)
- Sulfato de potasio (MERCK)

- Ácido sulfúrico concentrado (MERCK)
- Sulfato de amonio (MERCK)
- Solución A: Na_2HPO_4 (0,2 M), NaOH (0,2 M) y tartrato de sodio y potasio $4\text{H}_2\text{O}$ (0,36 M)
- Solución B NaOH 2,5 M
- Tampón de trabajo formado por solución A y solución B (1/1) v/v
- Salicilato de sodio (ANALAR)
- Nitroprusiato de sodio (MERCK)
- Almidón de maíz grado reactivo (SIGMA ALDRICH)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- DNS 3,5-dinitrosalicílico (ACROS ORGANICS)
- Solución de Carréz I (Hexacianoferrato (II) de potasio Trihidratado $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
- Solución de Carréz II (Sulfato de cinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Acrilamida (SIGMA-ALDRICH)
- Bisacrilamida (SIGMA-ALDRICH)
- SDS (dodecil sulfato sódico) (SIGMA-ALDRICH)
- Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH)
- Temed (SIGMA-ALDRICH)
- Azul de coomassie (FISHER SCIENTIFIC)
- Persulfato de amonio (BIORAD)
- 2-Mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH)
- Cloruro de Sodio (MERCK)
- Ácido clorhídrico (MERCK)
- Acetona (MERCK)
- Bicarbonato de sodio (MERCK)
- Hidróxido de sodio (MERCK)
- Glucosa grado reactivo (PAXNM)
- Pepsina pancreática (SIGMA-ALDRICH 4000 U/mg)
- Pancreatina (PANREAC 21875 U/mg)
- Fluidos gástricos simulados SFG y SFD
- Enzima invertasa

- Enzima amiloglucosidasa (PANREAC lote 0054821)
- Enzima α -amilasa (SIGMA-ALDRICH 5 U/mg de sólido)
- Enzimas pepsina pancreática (SIGMA-ALDRICH 3200-4500 U/mg)
- Hidróxido de potasio (MERCK)
- Buffer acetato de sodio 0,4 M, pH 4,75
- Buffer KCl-HCl, pH 1,5
- Buffer de acetato 0,4M, pH 4,75, que contenga 20mM CaCl_2
- Kit para determinación de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20).

2.2. Metodología

2.2.1. Obtención de harina de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).

Se eliminó las impurezas de las semillas y se sometió a secado en bandejas a 40°C en una estufa durante 48 horas. Se trituraron y se tamizaron en un clasificador granulométrico a Mesh de 100. Las muestras se almacenaron en fundas herméticas a temperatura ambiente y en oscuridad durante toda la investigación.

2.2.2. Determinación de humedad de las semillas y harina de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).

Se empleó el Método Oficial de Análisis de la Organización Americana de Químicos Analíticos AOAC-930.15 (AOAC, 1990), modificado. El análisis se realizó por quintuplicado. Se rotularon y secaron por una hora a 105°C las cajas Petri, se enfriaron en un desecador y se registró el peso de cada placa vacía. Posteriormente se adicionaron 3 g de muestra tanto de semillas como de harina y se llevó a 105°C por 24 horas. Luego se registró el peso de cada caja y se calculó el contenido de humedad por diferencia de peso.

2.2.3. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas se empleó el método AOAC-942.05 (AOAC, 1990), con modificaciones. Se colocó 1g de harina seca obtenida en el paso 2.2.2 en crisoles previamente tarados. Se dejó por 9 horas a 600°C en la mufla y luego de enfriarlas se registró su peso. Se calculó el porcentaje de ceniza dividiendo el peso del material calcinado para la cantidad de muestra inicial en base seca.

2.2.4. Determinación del contenido de grasa

Para el desengrasado de la harina se empleó el método AOAC 920.39 (AOAC, 1990), modificado. Se colocó 2,5 g de harina seca obtenida en el paso 2.2.2 en capuchones para extracción (tarados por 24 horas a 100°C), y se llevaron a 100°C durante 24 horas. Posteriormente se enfrió y pesó los capuchones con muestra. La extracción de la grasa se realizó en el equipo VELP SCIENTIFIC, empleando como solvente hexano. Los capuchones con las muestras fueron sumergidos en el solvente por 4 horas, a 130°C, y luego en la posición de lavado durante 2 horas, finalmente se recuperó el solvente. El residuo graso resultante se determinó gravimétricamente por diferencia de peso después del secado a 40°C y 70°C para evitar oxidación de la grasa. Y se expresó el contenido de grasa en porcentaje peso/peso en base seca.

2.2.5. Determinación de fibra cruda

La fibra cruda se determinó con el método AOAC-962.09 (AOAC, 1990), basado en la solubilización de compuestos no celulósicos en medio sulfúrico para azúcares y almidón y medio alcalino con hidróxido de potasio para proteínas, hemicelulosa y lignina. En crisoles de filtración tipo Gooch previamente tarados, se pesó 1 g de la harina obtenida en el apartado 2.2.4. Se colocó los crisoles con muestra en el equipo para extracción de fibra, se adicionó 150 mL H₂SO₄ 1,25% precalentado y se dejó a ebullición por 30 minutos. Se drenó el H₂SO₄ y lavó 3 veces con 30 mL de agua desionizada caliente. Posteriormente se agregó 150 ml de KOH 1,25% precalentado se procedió igual que con el H₂SO₄ y se lavó el residuo con acetona grado reactivo. Finalmente, se llevaron los crisoles a 105°C durante tres horas hasta peso constante y se registró este peso (fibra cruda más el contenido de ceniza).

El material residual del apartado anterior se llevó a 550°C por 3 horas para la obtención de las cenizas. El contenido de fibra se calculó mediante la diferencia de peso entre el crisol más muestra luego de secarlo a 105°C y el crisol con ceniza luego de calcinarlo a 550°C, esto dividido para la muestra seca (1g).

2.2.6. Determinación de azúcares

2.2.6.1. Curva estándar de glucosa

Se preparó una curva estándar empleando como patrón glucosa secada a 60°C por 8 horas. Se pesó 50 mg de glucosa con 0,1 mg de precisión y se aforó con agua hasta un volumen de 25 mL, logrando una concentración de 2 mg/mL. De esta solución madre se realizaron soluciones a diferentes concentraciones de: 2,00; 1,80; 1,60; 1,40; 1,20; 1,00; 0,8; 0,60; 0,4; 0,20; 0,10; 0,05 y el blanco. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 540 nm, con DNS 3,5-dinitrosalicílico a los 45 min, tiempo máximo después de la incubación.

2.2.6.2. Extracción de azúcares con agua a 60°C

La extracción de azúcares se realizó empleando agua caliente a 60°C (Ávila, 2015; Barroso, 2010).

En tubos Falcon de 50 mL se pesó por triplicado 200 mg de muestra previamente desengrasada del apartado 2.2.4. y se adicionó 5 mL de agua. Se extrajo los azúcares en un baño de agua por una hora, luego se centrifugó los tubos a 4400 rpm por otra hora y el sobrenadante se trasvasó a varios tubos Eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos.

2.2.6.3. Clarificación

Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido en el apartado 2.2.6.2 y se adicionó 20 µL primero del reactivo Carrez 1, 20 µL de Carrez 2 seguido de 100 µL de NaOH (0,1M) agitando con cada adición. La mezcla final fue centrifugada durante 30 minutos a 13000 rpm.

2.2.6.4. Azúcares reductores

En tubos bacteriológicos de vidrio se colocó 200 µL de las muestras clarificadas como indica el apartado 2.2.6.3 y se adicionó 200 µL de DNS. Para desarrollar la reacción los tubos se sumergieron en agua hirviendo por exactamente 5 minutos. Finalizada la reacción se sumergieron los tubos en un baño de agua fría y se añadió 2 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia para cada muestra a 540nm frente a un blanco elaborado con 200 µL de agua destilada.

2.2.6.5. Azúcares totales con hidrólisis química con HCl

Del sobrenadante obtenido de 2.2.6.3 se tomó 400 μL y adicionó 40 μL de HCl concentrado y se incubó a 70°C por 30 min. Culminada la incubación se neutralizó con 240 μL de NaOH 2 M. Finalmente esta mezcla se aforó por peso a 2 mL y se procedió como en el apartado 2.2.6.4.

2.2.6.6. Azúcares totales con hidrólisis enzimática de Invertasa

Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido en 2.2.6.2 y se añadió 140 μL de extracto de invertasa que contenía 16,18 UI-invertasa/mL cuya actividad fue determinada según el método de **Timerman, (2012)** ver Anexo D. Se dejó actuar la enzima por 6 horas y se procedió como en 2.2.6.4 pero esta vez el blanco se preparó con la muestra y enzima (inactivada por ebullición durante 5 min) y se centrifugó para eliminar precipitados por la inactivación de la enzima.

2.2.7. Cuantificación del almidón

La hidrólisis del almidón se realizó con la metodología descrita por **Goñi et al., (1997)**, modificado. Para las lecturas de absorbancias se empleó el Kit para determinación de Glucosa Oxidasa/Peroxidasa Reagent G 3660, que permitió una determinación cuantitativa utilizando las enzimas glucosa oxidasa, peroxidasa y H_2SO_4 . El estándar de glucosa provisto en el Kit que tenía una concentración de 1 mg/mL se diluyó hasta concentraciones de: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y el blanco. Sus absorbancias se leyeron a 540 nm.

2.2.7.1. Almidón total, resistente y digerible.

El almidón digerible y resistente se determinó mediante la metodología descrita por **Goñi et al., (1997)** modificado. El almidón se cuantificó como glucosa con el Kit para determinación de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20).

Se pesó por triplicado 50 mg de muestra obtenida de 2.2.4 y se dispersaron en 6 mL de KOH 2M. Esta mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos. Se adicionó 3 mL de Buffer acetato de sodio 0,4M a pH 4,75 y 60 μL de amiloglucosidasa. Se incubó por 45 min a 60°C en un baño de agua con agitación constante. Para la lectura de la absorbancia se preparó el blanco con la muestra y con la enzima inactivada.

2.2.8. Hidrólisis del almidón por α -amilasa.

Se empleó el método mejorado descrito por **Goñi et al., (1997)** y para el cálculo de las fracciones digeribles del almidón se emplearon las ecuaciones 3, 4, 5, y 6 ver anexo A.

2.2.9. Contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - \% P - \% G - \% F - \% Ca - \% H \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

%P: proteínas

% Ca: cenizas

%G: grasa

%H: humedad

%F: fibra

2.2.10. Proteínas

2.2.10.1. Obtención de concentrado proteico

Se empleó la metodología descrita por **Martínez y Añón (1996)**, con modificaciones. En la harina obtenida de 2.2.4. se solubilizaron las proteínas a pH 8 con NaOH 0,5 M, luego se ajustó el pH a 4 con HCL 0,5 M, para la precipitación de las proteínas. Se dejó en refrigeración a 5°C por 24 horas y se centrifugó a 4400 rpm durante 30 min, se eliminó el sobrenadante y se ajustó el pH a 7. Para liofilizar los concentrados se dejaron a -80 °C por 24 horas.

2.2.10.2. Cuantificación proteínas en harina y concentrado por microkjeldahl

Se empleó la metodología descrita por **Nkonge y Ballance, (1982)** con modificaciones que cuantifica la cantidad de proteína a partir del contenido de nitrógeno, determinado por método colorimétrico. Las metodologías que emplean digestión no suponen pérdidas por volatilización de componentes nitrogenados ni la mineralización de las sustancias de difícil transformación Este método se acoge a la convención tácita de que todo el nitrógeno contenido en un alimento se encuentra en forma proteica, aun cuando pueden provenir de compuestos nitrogenados como: bases púricas, pirimídicas, creatina y creatinina, urea y amoniaco (**Adrian et al., 2000**).

La digestión ácida se realizó por separado para lo cual se tomó 100 mg de muestra obtenida en 2.2.4 y 50 mg en 2.2.10.1. y se añadió 3,5 mL de H₂SO₄, una granalla de selenio, 0,075 g de sulfato de cobre como catalizadores y 1,25 g de Sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición de la mezcla reaccionante y permitir la conversión de las sustancias nitrogenadas a sulfato amónico. Paralelamente se realizó un blanco y un estándar con sulfato de amonio para realizar la curva de calibrado. La digestión tuvo lugar aproximadamente 5 horas debido a que en la mezcla reaccionante una decoloración no indica que la digestión terminó, debido a que aminoácidos como: lisina, histidina, triptófano y de las bases nucleicas aún no se han convertido cuantitativamente en amonio. Luego de la digestión se trasvasó el contenido digerido a un balón aforado de 100 mL y este se guardó en refrigeración.

Para realizar las lecturas se preparó la curva estándar con diluciones realizadas a partir de una solución madre con FD=5, obtenida a partir del digerido de sulfato de amonio. Se utilizó como diluyente el blanco preparado. Las disoluciones para la curva estándar están detalladas en la Tabla N °8. Para las lecturas de absorbancia se empleó la reacción de Berthelot (1827-1907), citado en **Adrian et al., (2000)**, donde en presencia del amoniaco se desarrolla una coloración azul verdosa debido a la formación de un complejo de fenol-indofenol causado por la reacción de las soluciones de hipoclorito y nitroprusiato sódico. Finalmente se leyó las absorbancias a 645 nm.

2.2.11. Digestibilidad de las proteínas

Para la digestibilidad de los concentrados proteicos se utilizó el método descrito por **Jiménez-Saiz et al., (2011)**. Donde los concentrados se sometieron a una digestión gástrica y duodenal *in vitro* para simular las condiciones fisiológicas de la digestión humana. Para ello se empleó enzimas como: pepsina, pancreatina y fluidos gástricos simulados.

2.2.11.1. Digestibilidad gastrointestinal *in-vitro*

Se empleó la metodología descrita por Jiménez-Saiz et al., (2011), por duplicado. Se sometió los concentrados proteicos a una hidrólisis en condiciones simuladas de una persona adulta sin trastornos gástricos (pH 2).

A 10 mg del concentrado obtenido en 2.2.10.1. se añadió 1 ml de agua destilada y 1 ml de fluido gástrico simulado (SGF, NaCl 0,35 M) a pH 2 (2000 U de pepsina porcina). La mezcla fue calentada a 37°C y agitada a 500 rpm en el Termoagitador durante 120 minutos. Estos parámetros simularon el proceso de digestión gástrica en los humanos. Se tomó muestras a intervalos de 60 minutos y la hidrólisis se detuvo con 200 µL de bicarbonato de sodio NaHCO₃ 1M.

2.2.11.2. Digestibilidad duodenal *in vitro*

Se empleó el método descrito por Martos (2010) con modificaciones. Se tomó 1 mL del digerido gástrico obtenido de 2.2.11.1. y se mezcló con 1 ml de solución de pancreatina a una concentración de 100 U, previamente ajustada a pH 7 y 1 mL de simulador de fluido duodenal (SFD: 8% de hidróxido de sodio y 92% de fosfato monobásico) ajustados a pH 7.0. Se incubó a 37°C y 500 RPM durante 120 minutos en el Termoagitador y se detuvo la reacción por calentamiento a 80°C durante 10 min para inactivar las enzimas. Se tomó alícuotas de 200 µL a intervalos de 60 min.

2.2.12. Electroforesis

Para analizar los concentrados proteicos de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y sus hidrolizados se utilizó la metodología descrita de Laemmli, (1970). Empleándose geles de poliacrilamida en presencia de (SDS-PAGE) que permitieron separar fracciones proteicas según su peso molecular en un equipo BioRad Mini- PROTEAN® Tetra System y, para revelar los resultados se empleó una solución de azul de Coomassie (95% metanol, 5% azul de Coomassie).

2.2.12.1. Preparación de los geles de poliacrilamida

El gel discontinuo o tipo Laemli, está compuesto por dos tipos de gel. El primero denominado concentrador, de siembra o staking preparado con un buffer Tris-HCl pH 6,8 y de baja concentración (4%), que le otorga un tamaño de poro grande y el segundo llamado separador, de corrida o running preparado con buffer tris pH 8,8, concentración 12% en la Tabla 19 y Tabla 20 se detalla su composición.

Se prepararon geles de 1mm de espesor, en los dos casos se gelificaron en la cuba del equipo de electroforesis vertical, colocando primero la solución del gel separador y una

vez gelificado, se adicionó la solución del gel concentrador. Seguidamente se colocó el peine para generar los pocillos. Gelificado el gel se trasladó a la cámara electroforética y se llenó la cámara con el buffer running (Tris-HCl, glicina, SDS).

2.2.12.2. Buffer de la muestra con agente reductor

Se preparó con 4,8 mL de agua destilada, 1,2 mL de Tris-HCl con pH 6,8 y 0,5 M, 1 mL de glicerol puro, 2 mL de SDS al 10%, 0,6 mL de 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol.

2.2.12.3. Buffer running

Se preparó con Tris-HCl (5 g/L), glicina (7,5 g/L) y SDS (0,5 g/L).

2.2.12.4. Carga de las muestras y proceso de separación y teñido de los geles.

Se empleó la electroforesis SDS-PAGE y como marcador de peso molecular el Precision Plus Protein™ Unstained standard, Bio-Rad que contiene diez proteínas recombinantes etiquetadas con Strep (10–250 kDa).

2.2.12.5. Preparación de las muestras

A 10 mg del concentrado obtenido en 2.2.10.1., se adicionó 1 mL de agua destilada y de esta se tomó una alícuota de 200 μ L.

A la alícuota de 200 μ L del apartado anterior y las alícuotas de 200 μ L obtenidas a intervalos de 60 min en los procesos de digestión 2.2.11.1 y 2.2.11.2. se adicionó 200 μ L de buffer preparado en 2.2.12.2. esta mezcla se calentó a 90°C con agitación (500 rpm) durante 5 minutos.

El gel preparado como se describe en 2.2.12.1 se colocó en la cámara del equipo Bio-Rad (modelo Mini Protean II). En cada pocillo (espacio en el gel para carga de la muestra), formados por el peine en el gel concentrador se colocó 10 μ L de cada muestra obtenida en el apartado anterior. Se llenó la cámara con el buffer running (ver preparación en

2.2.12.3.). Para la separación de las proteínas se sometió el gel que contiene la muestra a un voltaje de 200 V por 45 minutos.

Después de retirar el gel del equipo, fue teñido con una solución de azul de Coomassie (95% metanol, 5% azul de Coomassie) durante 12 horas. Se retiró el exceso de azul de Coomassie con una solución de desteñido (50 % de metanol, 5 % de ácido acético y 45 % de agua destilada), una vez desteñido el gel se lavó 3 veces con agua destilada. Finalmente, el gel se analizó mediante un equipo de fotodocumentación AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20 el mismo que permitió calcular el peso molecular de las proteínas encontradas.

Capítulo III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Análisis proximal de la harina de (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).

Para la harina de cañihua **Betalueluz-Pallardel et al. (2017)** reporta valores de: humedad 11,9%, ceniza 3,9%, fibra cruda 5,0%, grasa 2,8%, proteína 17,6% y carbohidratos 58,8%. En la Tabla 1 se realiza una comparación proximal de la harina de cañihua con datos reportados bibliográficamente para harina de: cañihua, quinua y kiwicha. Lo que resalta la Tabla 1, es la composición de la harina de cañihua que comparada con la de quinua y la de kiwicha posee mayores porcentajes de: proteína, grasa, fibra y ceniza. Estos valores concuerdan con los análisis de **White et al. (1955)**, quienes realizaron una comparación de la cañihua y la quinua donde también encontró la misma tendencia en cuanto a su contenido nutricional, la cañihua: proteína 14,1%, grasa 4,1%, fibra 10,7%, ceniza 4,6% y humedad 12%.

Tabla 1. Comparación entre la composición proximal de granos andinos.

	Cañihua ¹	Cañihua ²	Quinua ³	Kiwicha ⁴
Proteína	15,6 ± 0,21	18,8	14,4	14,5
Grasa	8,54 ± 0,16	7,6	6,0	6,4
Fibra cruda	6,74 ± 0,64	6,1	4,0	5,0
Ceniza	2,64 ± 0,15	4,1	2,9	2,6
Carbohidratos	66,48	63,4	72,6	71,5

Fuente: ¹Laboratorio de Análisis de los Alimentos, Laboratorio de Análisis instrumental (UODIDE-ICIA, Proyecto de Canje de Deuda) y BIOPROPEPTI (2019) ²Repo-Carrasco et al. (2003), ³Repo-Carrasco et al. (2009) y ⁴Deepa et al. (2010). Los valores en esta tabla representan un promedio de 4 réplicas ± desviación estándar; * valor calculado con la ecuación 1.

Como resultado de la determinación de proteína se obtuvo un 15,6%. A su vez, **Espinoza (2017)** menciona que la cañihua posee un 16,85% y resalta que el contenido de proteína en esta es superior en comparación del arroz 7,5% y trigo 13,4%. **Weitz, (2009)**, reportó un contenido de proteína de 14%, grasa 4,3%, fibra 3,8%, ceniza 4,92%, carbohidratos 64% y humedad 11,12%.

El consumo de cañihua resulta beneficioso para personas que deseen perder peso porque tiene efectos positivos para la salud, como la reducción del nivel de colesterol en la sangre y la mejora de la digestión. **Bartolo (2013)**, reporta que la cañihua posee entre 63– 66% de carbohidratos, 15–18% de proteínas, 6–8% de lípidos y 3–4% de cenizas y menciona que las fracciones de fibra en la cañihua y el amaranto son similares y en cuanto a la fibra soluble reporta para la cañihua un 12,92%, amaranto 5,76% y quinua 5,3%. Este autor también señala que las variaciones en el contenido de fibra pueden deberse a la mayor o menor presencia de perigonios que envuelven al grano y que no han sido eliminados completamente.

3.2. Determinación del contenido de azúcares reductores, sacarosa y azúcares totales con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

Para la cuantificación de azúcares reductores se empleó una curva de glucosa (ver anexo A, Tabla 9), con unas concentraciones de variaron entre 0,05 y 2,00 mg/mL. Con esta curva estándar se consiguió una correlación de 0,9996 (Figura 12).

Tabla 2. *Contenido de azúcares en harina de cañihua.*

Parámetro analizado	Contenido (%)
Azúcares totales	3,75 ± 0,17
Azúcares reductores	2,00 ± 0,10
Sacarosa	0,58±0,02

Fuente: Laboratorio BIOPROPEPTI (2019)

Los valores en esta tabla representan un promedio de 4 réplicas ± desviación estándar.

La sacarosa en la cañihua se determinó utilizando hidrólisis enzimática mediante la enzima invertasa con la cual se determina específicamente este disacárido. Para ello se utilizó un factor de conversión de glucosa a sacarosa (0,95), considerando que se obtiene 360 mg de glucosa a partir de 342,2 mg de sacarosa. El contenido de sacarosa, es menor que los reportados por **Bruin (1964)** 1,95% de azúcares reductores y 2,0% de disacáridos y **Repo-Carrasco et al. (2003)** 1,9% de azúcares reductores y 4,3% disacáridos. A su vez **Bartolo (2013)** reporta un contenido de azúcares reductores de 1,8% y disacáridos 4,3 %, señala también que los cultivos andinos tienen mayor contenido de azúcares comparado con otros granos comunes.

3.3. Determinación de almidón total, almidón resistente y almidón digerible con el Kit para determinación de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20).

Los beneficios para la salud relacionados con los alimentos que poseen almidón resistente y la disminución del índice glicémico, han generado un creciente interés en el desarrollo de alimentos con mayor porcentaje de almidón resistente. El almidón es el polisacárido más importante en la dieta del hombre, porque representa una fuente externa de glucosa (60-70% bs). En este estudio se obtuvo un $46,28 \pm 1,17\%$ de almidón total con el Kit para determinación de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20) y $45,45 \pm 0,97\%$ con DNS.

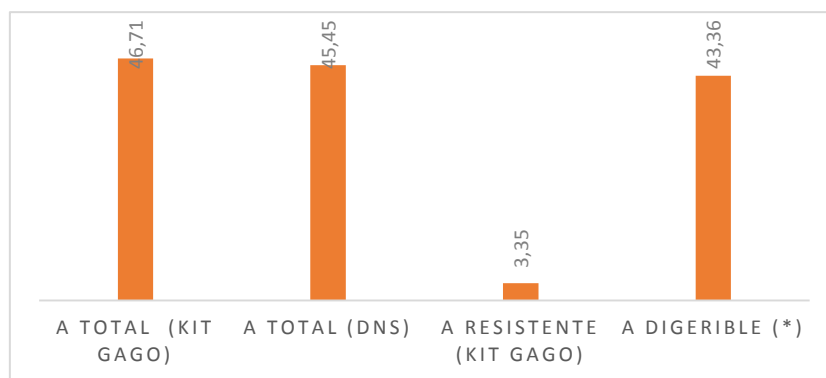


Figura 8. Cuantificación de fracciones de almidón en harina de cañihua.

Fuente: Laboratorio BIOPROPEPTI-UTA (2019). * calculado por diferencia (Ecuación 6).

Con el Kit de Glucosa se determinó además almidón resistente 3,35% y almidón digerible 43,36%. **Bruin (1964)** reportó el contenido de almidón total en la quinua roja 57,5%, amarilla 58,2%, blanca 65,2%. Mientras que **Bhattarai et al. (2018)** reportó para harina de: cañihua 56,5%, trigo 71,3% y sorgo 69,67% de almidón total. De manera que el

almidón total en la cañihua es levemente superior al de la quinua, pero inferior al de trigo y de sorgo.

Kaur et al. (2015b) reporta que el contenido de almidón resistente en frijol mungo cocido es de 2,3% y para harina de frejol **Tovar et al. (2005)** reporta 2,8%. **Fuentes-Zaragoza et al. (2011)** señalan que el arroz cocido tiene 3,7 % y el trigo crudo 1,7%, de manera que el porcentaje de almidón resistente en la harina cocida de cañihua es menor que en el arroz cocido, igual al del fréjol cocido y superior al del trigo crudo.

3.4. Hidrólisis del almidón por α -amilasa.

Para la determinación de la cinética de hidrólisis del almidón, se gelatinizó la harina mediante cocción durante 15 minutos. Este tratamiento favorece la digestibilidad de los almidones porque cuando los gránulos de almidón en agua se exponen al calor, los enlaces de hidrógeno entre cadenas de almidón se rompen, y dejan que los gránulos se hinchen y se rompan lo que produce un incremento en la disponibilidad de las cadenas de almidón al ataque de enzimas digestivas a medida que la gelatinización progresa (**Ramírez-Miranda et al., 2017**); de manera que en almidones gelatinizados la acción de la enzima tiende a ser más rápida y eficaz (**Castillo, 2016; Holm et al., 1983**).

Según **Castillo (2016)**, las tasas de hidrólisis de los gránulos de almidón revelan diferencias en los contenidos de almidón resistente a los 180 minutos de digestión con α -amilasa y esta diferencia se mide por la cantidad de azúcares reductores (maltosas) generados durante la digestión. La hidrólisis del almidón por α -amilasa presenta tendencias parecidas a los reportados por **Ramírez-Miranda et al. (2017)** y **Tovar et al. (2005)** quienes mencionan que los patrones de hidrólisis del almidón por α -amilasa difieren sustancialmente durante la primera etapa de hidrólisis (menos de 60 min) y después de 2 horas de tratamiento alcanzan su máxima digestión.

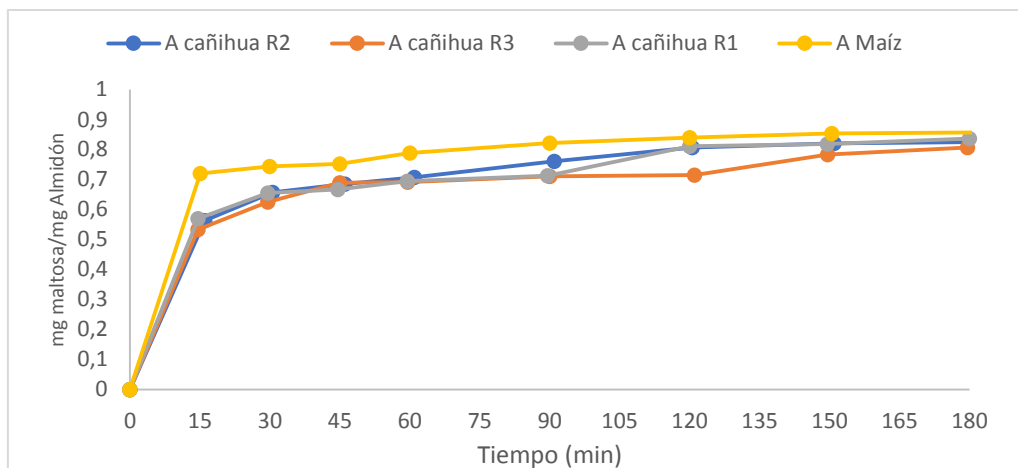


Figura 9. Cinética de hidrólisis del almidón de Cañihua y almidón de Maíz.

Fuente: Laboratorio BIOPROPEPTI-UTA (2019).

En función de la accesibilidad de los almidones a la hidrólisis enzimática por acción de la α -amilasa pancreática, la velocidad de digestión *in vitro*, se clasifica en rápidamente digerible cuando el sustrato amiláceo en incubación con la enzima a 37°C, en un tiempo de 20-30 minutos se convierte en maltosa y lentamente digerible, si bajo las condiciones anteriores se convierte en maltosa a los 120 minutos (Kingman y Englyst, 1994). En la cañihua el almidón rápidamente hidrolizado a maltosa generó $0,66 \text{ mg maltosa} / \text{mg Almidón Total}$ (Ecuación 6) y el almidón lentamente hidrolizado a maltosa a razón de $0,15 \text{ mg maltosa} / \text{mg Almidón Total}$ (Ecuación 7). En el almidón de maíz, el almidón rápidamente hidrolizado se obtuvo a razón de $0,74 \text{ mg maltosa} / \text{mg Almidón Total}$ y el almidón lentamente hidrolizado a maltosa a razón de $0,09 \text{ mg maltosa} / \text{mg Almidón Total}$. La razón de hidrólisis en el almidón de cañihua es menor al que presenta el almidón de maíz (control) en los primeros 30 minutos, de manera que el almidón de maíz presenta un mayor contenido de almidón rápidamente hidrolizado a maltosa por α -amilasa. Entre 30-120 minutos sucede lo contrario pues la razón de hidrólisis en esta etapa es mayor en la cañihua que en el almidón de maíz, esto se explica porque la cañihua posee mayor cantidad de almidón lentamente digerible esto debido a que se trata de una harina donde a parte del almidón existen otros compuestos que actúan como barreras para evitar la acción de la α -amilasa, resultando así en que el almidón de maíz se digirió mayoritariamente durante los primeros 30 minutos lo que puede atribuirle un alto índice glicémico, al contrario que en la cañihua donde el almidón en los primeros 30 minutos presentó una menor tasa de hidrólisis y continuó digiriéndose hasta los 120

minutos que es cuando alcanza la meseta de la curva lo que puede deberse a que la hidrólisis del almidón haya llegado a su fin.

3.5. Concentración de proteínas.

Betalleluzl et al. (2017) reportaron un $80,04 \pm 1,3\%$ de proteína para un concentrado de cañihua obtenido a pH 10 para la solubilización y pH 4,8 en la precipitación y un 73,00% cuando la solubilización se realiza a pH 9 y pH 4.8 para la precipitación. **Espinoza (2017)**, reporta que a pH 9,3 para la solubilización y el mismo pH de precipitación (4,8) se obtiene un 85,36% de proteína.

De la concentración de proteínas a pH de 8 y precipitación a pH 4., se obtuvo como resultado un $76,32 \pm 0,06 \%$ de proteína. A condiciones iguales de extracción **Toapanta (2016)**, reporta que obtuvo un 64,97% de proteína en la quinua y para la kiwicha **Vilcacundo et al. (2018)** obtienen un 79,85% proteína.

3.6. Digestibilidad de la proteína de cañihua.

En la Figura 10, se observa el gel resultante de la electroforesis SDS-PAGE para el concentrado proteico de la cañihua a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación, así como el obtenido de la digestibilidad gástrica y duodenal.

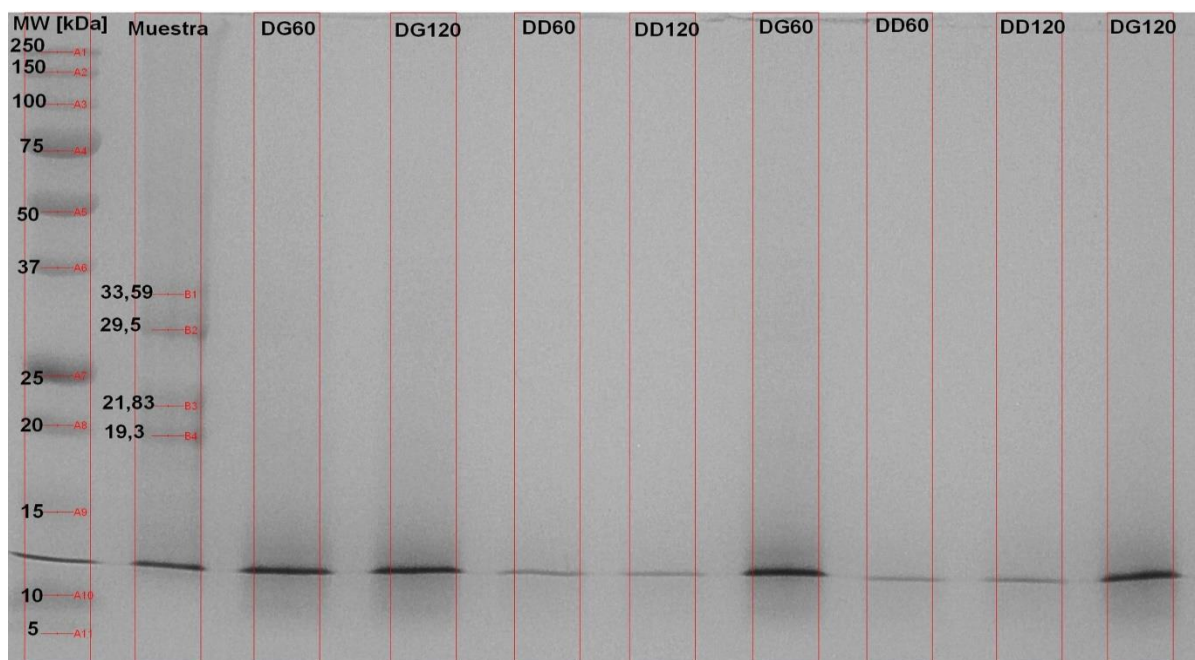


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas concentradas de cañihua, obtenidas mediante precipitación isoeléctrica a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación.

Fuente: UEB (2019)

En presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol. Calle 1: estándar. Calle 2: concentrado proteico de cañihua. Calle 3: Digerido gástrico a 60 min. Calle 4: digerido gástrico a 120 min. Calle 5: digestión duodenal por 60 min. Calle 6: Digestión duodenal durante 120 min. Calle 7: Digerido gástrico 60 min. Calle 8: Digerido duodenal 60 min. Calle 9: Digerido duodenal de 120 min y Calle 10: digerido gástrico de 120 min.

Los tipos de proteínas encontradas en la quinua y cañihua son principalmente albúmina y globulina, que tienen una composición equilibrada de aminoácidos esenciales similares a la composición de la caseína, la proteína de la leche (**Repo-Carrasco et al., 2003**). La muestra de concentrado proteico de cañihua presentó péptidos con pesos moleculares de 29,5 y 33,59 kDa, así como de 19,30 y 21, 83 kDa., lo cual corresponde a péptidos de peso molecular bajo e intermedio, según lo menciona **Martínez y Añón (1996)**. Péptidos con ese peso molecular en la quinua corresponden a globulinas 11S en sus dos subunidades, polipéptido ácido 32-36 kDa y polipéptido básico 20-22 kDa (**Toapanta, 2016**). Esta distribución de péptidos podría deberse al tratamiento alcalino con el posterior tratamiento ácido que provoca la ruptura de los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrófobas, hasta el punto de producir cambios irreversibles en la conformación de la proteína, lo que llevó a las proteínas a un estado desnaturalizado (**Betalleluzl et al., 2017**). Obteniendo se así que el concentrado proteínico de cañihua sin digerir, ya presentó un grado elevado de hidrólisis desde su concentrado.

En la Figura 10, se observa que las proteínas se digieren en la fase gástrica observándose únicamente secciones de color azul pero no bandas específicas que permitan determinar pesos moleculares, esto indica que en la fase gástrica se obtuvieron péptidos de pesos inferiores a 15 kDa que corresponden a componentes 2S albumina (**Toapanta, 2016**). Mientras que a 60 minutos de la fase duodenal cualquier tonalidad debida al azul de coomassie desaparece. Con esto se puede comprobar que la proteína presente en el concentrado de la cañihua es totalmente digerida por las enzimas pepsina y pancreatina. Estos resultados permiten que se considere a la cañihua como una buena fuente de proteína digerible.

3.7. Contenido de aminoácidos en la cañihua

La cañihua posee una cantidad equilibrada de aminoácidos que es valorada por su calidad más que por su cantidad (**Repo-Carrasco et al., 2003**). La Tabla 3, resume el perfil de aminoácidos de cañihua.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos en harina de cañihua en 16% de proteína.

Parámetro analizado	¹ %	Datos bibliográficos
Ácido aspártico	1,37	1,25
Serina	0,95	0,62
Ácido glutámico	1,66	2,18
Histidina	0,8	0,43
Glicina	1,02	0,83
Arginina	1,15	1,33
Treonina	0,87	0,53
Alanina	0,95	0,66
Prolina	0,85	0,51
Cistina	0,58	0,26
Tirosina	0,58	0,37
Valina	0,97	0,67
Metionina	0,65	0,48
Lisina	1,10	0,85
Isoleucina	0,88	0,64
Leucina	1,41	0,98
Fenilalanina	0,89	0,59
Proteína total	16,68	15,7

Fuente: Laboratorios AVVE (Servicio externo contratado) (2019); ²Repo-Carrasco et al., (2003).

Las cantidades de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, arginina y lisina determinan el grado de digestión de proteínas en el tracto gastrointestinal, ya que son los sitios de escisión objetivo de la pepsina (Tabla 6) (**Bhat et al., 2018**). Adicionalmente se puede resaltar la presencia de lisina 1,10% que se encuentra presente también en la quinua 1,34% (**Muñoz, 2009**). **Weitz (2009)**, reporta que los aminoácidos esenciales como lisina, metionina, treonina y triptófano se encuentran en mayor proporción en la cañihua en comparación con el arroz y el trigo. Esto destaca la calidad de los aminoácidos en la cañihua debido a que la lisina generalmente es el principal aminoácido limitante en los cereales, de manera que 100 g de cañihua cubre el 25% de los requerimientos proteicos y casi el 100% de las necesidades de aminoácidos esenciales, en un adulto promedio (**Blanco et al., 2009**).

Capítulo IV.-

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La cañihua es una buena fuente almidón digerible al tener entre 45,44-46,28% de almidón total y de este un 3,35% es almidón resistente y un 43,36% almidón digerible. Mediante comparación bibliográfica se comprobó que el contenido de almidón total, resistente y digerible presente en la cañihua es superior en el arroz y el trigo.
- El contenido de proteína, fibra y grasa de la harina de cañihua es superior a pseudocereales andinos como la quinua y la Kiwicha. Esto es justificado por los resultados obtenidos en este estudio.
- La hidrólisis del almidón con α -amilasa en la cañihua y almidón de maíz refleja que la cañihua contiene almidón lentamente digerible, lo que implica que el consumo de cañihua resultaría beneficioso debido a que producirá un menor incremento del índice glicémico.
- La proteína de la cañihua es completamente digerida en la fase gastrointestinal, de manera que en la fase duodenal ya no se observa la presencia de péptidos mayores a 15 kDa.

4.2. Recomendaciones

- Realizar la digestibilidad *in-vitro* del almidón con enzimas como amilasa salival, maltasas y dextrinasas.
- Optimizar la metodología para digestibilidad *in vitro* de almidón, para reducir el consumo de recursos como reactivos y el uso de equipos.

- Realizar la extracción de azúcares a temperaturas no mayores a 60°C, para evitar interacciones del azúcar con otros nutrientes que pueden complicar su extracción.
- Los estudios realizados para estos tipos de harinas son escasos por lo que se podría ampliar la investigación realizando la digestibilidad y caracterización del almidón.

MATERIAL DE REFERENCIA

5.1. Referencias bibliográficas

- Aarathi, A., Urooj, A., y Puttaraj, S. (2003). In vitro Starch Digestibility and Nutritionally Important Starch Fractions in Cereals and Their Mixtures. *Starch - Stärke*, 55(2), 94-99. <https://doi.org/10.1002/star.200390022>
- Adrian, J., Pofus, J., Poiffait, A., y Dauvillier, P. (2000). *Análisis nutricional de los alimentos* (Primera). Zaragoza-España: Technique et Documentation-Lavoisier.
- Aguinda, A. (2019). *Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados proteicos de harina de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) y su digestibilidad gastrointestinal in vitro*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Alvarez, L., Wijngaard, H., Arendt, E. K., y Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119(2), 770-778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.032>
- AOAC. (1990). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136-138.
- Ashraf, S., Anjum, M., Nadeem, M., y Riaz, A. (2012). Functional & technological aspects of resistant starch. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22(2s), 90-95. Recuperado de http://psfst.com/_jpd_fstr/f7aca043d16b6e22b52dbc8529860c22.pdf
- Ávila, M. L. (2015). *OBTENCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DEL PERICARPIO DE MARACUYÁ (Passiflora edulis f. flavicarpa)*. UNIVERSIDAD DE CUENCA.
- Badui, S. (2012). *Química de los alimentos. Química de los alimentos* (Cuarta Edi). Perason Education S. A.
- Barroso, M. (2010). *PRETRATAMIENTO DE BIOMASA CELULÓSICA PARA LA*

OBTENCIÓN DE ETANOL EN EL MARCO DE UNA BIORREFINERÍA. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

- Bartolo, D. (Universidad P. U. (2013). Propiedades nutricionales y antioxidantes de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Revista de Investigación Universitaria*, 2(1), 47-53.
- Betalleluzl, I., Inga, M., Mera, L., Pedreschi, R., Campos, D., y Chirinos, R. (2017). Optimisation of extraction conditions and thermal properties of protein from the Andean pseudocereal cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *International Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1026-1034. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13368>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., y Bekhit, A. E. D. A. (2018). Pulsed electric field: Role in protein digestion of beef Biceps femoris. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50(September), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.09.006>
- Bhattarai, R. R., Dhital, S., Mense, A., Gidley, M. J., y Shi, Y. C. (2018). Intact cellular structure in cereal endosperm limits starch digestion in vitro. *Food Hydrocolloids*, 81, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.027>
- Birt, D. F., Boylston, T., Hendrich, S., Jane, J.-L., Hollis, J., Li, L., ... Whitley, E. M. (2013). Resistant starch: promise for improving human health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(6), 587-601. <https://doi.org/10.3945/an.113.004325>
- Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., y Muñoz, A. M. (2009). Evaluación de la composición nutricional de la maca y cañihua, procedente de diversos departamentos del Perú. *Pain Practice*, 5(S2), 1-e7. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00322.x>
- Brownlee, I. A., Gill, S., Wilcox, M. D., Pearson, J. P., y Chater, P. I. (2018). Starch digestion in the upper gastrointestinal tract of humans. *Starch/Staerke*, 70(9-10), 1-9. <https://doi.org/10.1002/star.201700111>
- Bruin, A. De. (1964). Investigation of the Food Value of Quinoa and Cañihua Seed. *Journal of Food Science*, 29(6), 872-876. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Bruno, M. C., Pinto, M., y Rojas, W. (2018). Identifying Domesticated and Wild Kañawa (*Chenopodium pallidicaule*) in the Archeobotanical Record of the Lake Titicaca Basin of the Andes. *Economic Botany*, (X), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12231-018-9416-4>
- Bustos, M. C., Vignola, M. B., Pérez, G. T., y León, A. E. (2017). In vitro digestion kinetics and bioaccessibility of starch in cereal food products. *Journal of Cereal Science*, 77, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.08.018>
- Castillo, G. E. (2016). Estudio de los factores que afectan la digestibilidad in vitro del almidón en un alimento a base de almidón de papa, gluten y aceite., 1-23.
- Castro, A. (2006). *IN VITRO STARCH DIGESTIBILITY AND ESTIMATED GLYCEMIC INDEX OF SORGHUM PRODUCTS*. Texas A&M University.
- Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar, A., Carpentier, S., Pedreschi, R., y Campos, D. (2018). Obtaining of peptides with antioxidant and antihypertensive properties from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science*, 83(May), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.07.004>
- Deepa, G., Singh, V., y Naidu, K. A. (2010). A comparative study on starch digestibility, glycemic index and resistant starch of pigmented («Njavara» and 'Jyothi') and a non-pigmented ('IR 64') rice varieties. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 644-649. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0106-1>
- Englyst, H. N., Veenstra, J., y Hudson, G. J. (1996). Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential in vitro predictor of the glycaemic response. *British Journal of Nutrition*, 75(03), 327. <https://doi.org/10.1079/BJN19960137>
- Englyst, K., Vinoy, S., Englyst, H. N., y Lang, V. (2003). Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *British Journal of Nutrition*, 89(03), 329. <https://doi.org/10.1079/BJN2002786>
- Escudero, E., y González, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición hospitalaria*, 21(2), 61-

- Espinoza, E. P. (2017). La Cañihua : Supercereal. *Revista para profesionales de la salud*, 43(1), 1-24.
- FAO. (2017). Resúmenes de exposiciones del VI Congreso Mundial de la Quinoa y III Simposio Internacional de Granos Andinos, Perú 2017. En D. Rabines, J (MINAGRI, INIA, L. (FAO) Favarato, & G. P. (UNALM) (Eds.), *Morphological, Thermal and Physicochemical characteristics of small granules starch form cañihua (Chenopodium pallidicaule Aellen)* (p. 72). O & M PRODUCTOS GENERALES S.R.L.
- Fogel, M. R., y Gray, G. M. (2017). Starch hydrolysis in man: an intraluminal process not requiring membrane digestion. *Journal of Applied Physiology*, 35(2), 263-267. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.35.2.263>
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., y Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Staerke*, 63(7), 406-415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>
- Gade, D. W. (1970). Ethnobotany of Canfihua (*Chenopodium pallidicaule*), Rustic Seed Crop of the Altiplano ?. *Economic Botany*, 24(1), 55-61. <https://doi.org/10.1007/BF02860637>
- Gil, A., y Sanchez-Medina, F. (2010). *Tratado de nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. (Seguda). MADRID-ESPAÑA: Editorial Medica Panamericana.
- Goñi, I., Garcia-Alonso, A., y Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3), 427-437. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00010-9)
- Goñi, I., Garcia, A., y Saura, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Journal of Cereal Science*, 17(3). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.005>
- Granfeldt, Y., Björck, I., Drews, A., y Tovar, J. (1992). An in vitro method based on

- chewing to predict metabolic responses to starch in cereal and legumes products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(October), 649-660.
- Gross, R., Koch, F., Malaga, I., Miranda, A. F. De, Schoeneberger, H., y Trugo, L. C. (1989). Chemical Composition and Protein Quality of Some Local Andean Food Sources South American crops, such as potatoes (*Solanum tuberosum*), manioc, 34, 25-34.
- Grossi, G., Ohaco, E., y De Michelis, A. (2012). DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL, SOLUBLE E INSOLUBLE EN HONGOS COMESTIBLES DE CULTIVO *Pleurotus ostreatus*. *CONICET*, 0294(8430), 32. Recuperado de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_determinacin_de_fibra.pdf
- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A. - C, Asp, N. - G, Larsson, K., y Lundquist, I. (1983). Digestibility of Amylose- Lipid Complexes in- vitro and in- vivo. *Starch - Stärke*, 35(9), 294-297. <https://doi.org/10.1002/star.19830350902>
- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R., y Molina, E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127(4), 1719-1726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Kaur, M., Sandhu, K. S., Ahlawat, R. P., y Sharma, S. (2015a). In vitro starch digestibility, pasting and textural properties of mung bean: effect of different processing methods. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1642-1648. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1136-2>
- Kaur, M., Sandhu, K. S., Ahlawat, R., y Sharma, S. (2015b). In vitro starch digestibility, pasting and textural properties of mung bean: effect of different processing methods. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1642-1648. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1136-2>
- Kingman, S. M., y Englyst, H. N. (1994). The influence of food preparation methods on the in-vitro digestibility of starch in potatoes. *Food Chemistry*, 49(2), 181-186. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90156-2)

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, X., Luo, Y., Shen, H., y You, J. (2012). Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 292-298. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4574>
- Martínez, E. N., y Añón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530. <https://doi.org/10.1021/jf960169p>
- Meléndez, P. (2016). REVISITANDO EL CONCEPTO DE LA DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN. El mercurio. Recuperado de <http://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2017/03/REVISITANDO-EL-CONCEPTO-DE-LA-DIGESTIBILIDAD-DEL-ALMIDÓN.pdf>
- Meneses, J., Corrales, C. M., y Valencia, M. (2007). Revista EIA. *Revista EIA*, (8), 57-67. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372007000200006
- Moore, S. A., Ai, Y., Chang, F., y Jane, J. L. (2015). Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents. *Carbohydrate Polymers*, 115, 465-471. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.014>
- Muñoz, M. T. (2009). Monografía de la quinua y comparación con amaranto, 1-20. Recuperado de <http://quinua.pe/monografia-de-la-quinua-y-comparacion-con-amaranto/>
- National Research Council. (1989). Grains Kañiwa. En N. (Senior P. O. Vietmeyer & F. R. Ruskin (Eds.), *Lost crops of the Incas. Little-know plants of the Andes with promise for worldwide cultivation* (Second, pp. 128-137). Whasington. D. C: National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/1398>

- Nkonge, C., y Ballance, G. M. (1982). A Sensitive Colorimetric Procedure for Nitrogen Determination in Micro-Kjeldahl Digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 416-420. <https://doi.org/10.1021/jf00111a002>
- Parada, A., y Rozowski, J. (2008). Relación Entre La Respuesta Glicémica Del Almidón Y Su Estado Microestructural. *Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile*. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v35n2/art01.pdf>
- Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Åkesson, B., y Bergenståhl, B. (2008). Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in canihua (*Chenopodium pallidicaule*): An Andean pseudocereal. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(6), 708-717. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700189>
- Pérez, L., Soriano, J., Ponce, E., y Díaz, L. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *Nacameh*, 9(2), 77-96. Recuperado de http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v9n2/Nacameh_v9n2_077_PerezCh-et al.pdf
- Ramírez-Miranda, M., De La, M., Salgado-Cruz, P., y Calderón-Domínguez, G. (2017). Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos CAMBIOS EN La estructura del almidón jícama (*pachyrhizus erosus*) durante el tratamiento térmico por simulación de horneado y su efecto en el índice glicémico, 2, 256-261. Recuperado de <http://www.fcb.uanl.mx/idcyta/files/volume2/3/3/41.pdf>
- Ramírez, M., y Arrubla, J. (2015). Determinación De Fibra Cruda En Materias Primas Y Producto Terminado En Alimentos Finished Product. *Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira*, 1-11.
- Rembado, M., y Sceni, P. (2009). *Colección : Colección : las ciencias naturales y la matemática*. (J. Kirschenbaum, Ed.) (Primera Ed). Buenos Aires: Instituto Nacional de Educación Tecnológica.
- Repo-Carrasco, R., Acevedo de la Cruz, A., y Icochea, J. (2009). Chemical and functional characterization of kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) grain, extrudate and bran. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 94-101. <https://doi.org/10.1007/s11130->

- Repo-Carrasco, R., y Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revista de la sociedad química del Perú*, (April 2008), 84-99.
- Repo-Carrasco, R., Encina, C., Binaghi, M., Greco, C., y Ronayne de Ferrer, P. (2010). Effects of roasting and boiling of quinoa, kiwicha and kañiwa on composition and availability of minerals in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 2068-2073. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4053>
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., y Jacobsen, S. E. (2003). Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*, 19(1-2), 179-189. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018884>
- Rosell, C., Cortez, G., y Repo-Carrasco, R. (2009). BREADMAKING USE OF THE ANDEAN CROPS QUINOA (*Chenopodium quinoa*), KAIWA (*Chenopodium pallidicaule*), KIWICHA (*Amaranthus caudat*). *Cereal Chemistry*, 86(4), 386–392.
- Ruales, J., y Nair, B. M. (1994). Effect of processing on in vitro digestibility of protein and starch in quinoa seeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 29(4), 449-456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02086.x>
- Shotts, M., Plans, M., Rossell, C., y Rodriguez, L. (2018). Authentication of indigenous flours (Quinoa, Amaranth and kañiwa) from the Andean region using a portable ATR-Infrared device in combination with pattern recognition analysis. *Journal of Cereal Science*, 82, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.005>
- Simmonds, N. M. (1965). The grain chenopods of the tropical American highlands. *Economic Botany*, 19(3), 223-235. <https://doi.org/10.1007/BF02914309>
- Slaughter, S. L., Butterworth, P. J., y Ellis, P. R. (2001). Mechanisms of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and heat treated starches from various botanical sources. *Starch - Advances in structure and function*, 1525, 110-115.

<https://doi.org/10.1039/9781847551917-00110>

- Timerman, A. P. (2012). The Isolation of Invertase from Baker ' s Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies.
- Toapanta, M. (2016). *Caracterización de aislados proteicos de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). Universidad Técnica de Ambato.*
- Tovar, J., Fernández-Piedra, M., y Blanco-Metzler, A. (2005). Digestibilidad in vitro del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*, 30(12), 131-140.
- Vilcacundo, R., Barrio, D., Piñuel, L., Boeri, P., Tombari, A., Pinto, A., ... Carrillo, W. (2018). Inhibition of Lipid Peroxidation of Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) Hydrolyzed Protein Using Zebrafish Larvae and Embryos. *Plants*, 7(3), 69. <https://doi.org/10.3390/plants7030069>
- Weitz, B. H. (2009). Instalación de una planta procesadora de extruido de una mezcla de cañihua y tarwi: Estudio preliminar Installation of a processing plant of an extruded mixture based on cañihua and tarwi: Preliminary study, 27, 1025-9929.
- White, P. L., Alvistur, E., Días, C., ViñAs, E., White, H. S., y Collazos, C. (1955). Nutritive values of crops: Nutrient Content and Protein Quality of Quinoa and Cañihua, Edible Seed Products of the Andes Mountains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3(6), 531-534. <https://doi.org/10.1021/jf60052a009>
- Yabar, C. (2003). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN. *División de Biología Molecular Centro Nacional de Salud Pública Instituto Nacional de Salud*, (Mm), 1-18.
- Yaman, M., Sargin, H. S., y Mızrak, Ö. F. (2019). Free sugar content, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index of ready-to-eat breakfast cereals commonly consumed in Turkey: An evaluation of nutritional quality. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1082-1087. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.037>

ANEXO A

**DATOS OBTENIDOS PARA EL
ANÁLISIS PROXIMAL
HUMEDAD, PROTEÍNA, GRASA,
FIBRA, CENIZAS, AZÚCARES Y
ALMIDÓN.**

A.1 Determinación de humedad en harina de cañihua.

Tabla 4. Datos para el cálculo de humedad en harina de cañihua.

Réplica	$W_{\text{caja vacía}}$ (g)	$W_{\text{caja+harina húmeda}}$ (g)	$W_{\text{caja+harina seca}}$ (g)	Humedad (%)	Promedio Humedad (%)	D. E	C. V
1	85,67	88,75	88,46	9,38	9,24	0,12	1,35
2	95,61	98,66	98,38	9,17			
3	91,12	94,17	93,89	9,14			
4	89,69	92,69	92,41	9,38			
5	97,32	100,33	100,06	9,15			

Fuente: Laboratorio de Análisis de los Alimentos-UTA (2019). D.E. desviación estándar y C.V, coeficiente de variación

A.2 Determinación de grasa en cañihua.

Tabla 5. Datos para determinación de contenido de grasa en harina de cañihua.

Réplica	$W_{\text{harina seca}}$ (g)	$W_{\text{vaso vacío}}$ (g)	$W_{\text{vaso+grasa}}$ (g)	Grasa (%)	Promedio (%)	D.E	C.V
1	6,01	74,71	75,23	8,70	8,55	0,18	2,16
2	5,99	75,26	75,76	8,29			
3	6,07	74,35	74,87	8,65			
4	6,00	74,35	74,87	8,56			

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental-Canje de Deuda-UTA (2019).

A.3 Determinación de fibra en cañihua.

Tabla 6. Datos para determinación de fibra cruda.

Réplica	$W_{\text{cristol vacío}}$ (g)	$W_{\text{harina seca}}$ (g)	$W_{\text{cristol+harina seca}}$ (g)	$W_{\text{cristol+ceniza}}$ (g)	Fibra (%)	Promedio (%)	D.E	C.V
R1	29,48	1,08	29,53	29,46	6,58	6,43	0,19	2,99
R2	29,59	1,05	29,64	29,57	6,51			
R3	29,76	1,01	29,80	29,74	6,21			

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental-Canje de Deuda-UTA (2019).

A.4 Determinación de proteína en cañihua.

Tabla 7. Datos para curva estándar de Nitrógeno.

ESTÁNDARES	$W_{sol. estándar}$ (g)	W_{total} (g)	FD.	[N] (mg/100)	ABS 645 nm
STD_0	0,000	0,524	1	0,000	0,000
STD_1	0,106	0,527	4,949	0,419	0,285
STD_2	0,206	0,524	4,949	0,819	0,525
STD_3	0,314	0,521	4,949	1,254	0,720
STD_4	0,416	0,516	4,949	1,681	0,954
STD_5	0,480	0,506	4,949	1,976	1,041

Fuente: Laboratorio de Análisis de los Alimentos-UTA (2019).

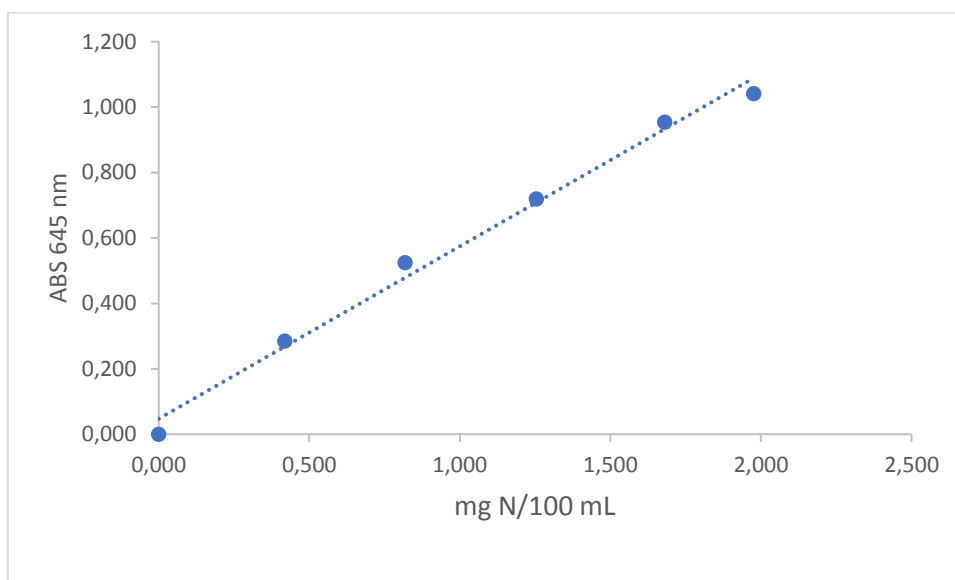


Figura 11. Curva estándar para cuantificación de N.

Fuente: Laboratorio de Análisis de los Alimentos-UTA (2019).

Tabla 8. Datos obtenidos para determinación de proteína.

M	V _{aforo} (mL)	W _{muestra} (mg)	FD	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Abs-3	P0 (%)	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	Promedio	D.E	C.V
EDTA	100	45,1	4,948	0,498	0,387	0,393	0,395	3,413	3,250	3,262	3,266	3,30	0,01	0,25
HC	100	103,1	1,996	0,578	0,584	0,586	0,584	15,431	15,605	15,663	15,605	15,66	0,26	1,69
HC	100	103,0	1,993	0,591	0,574	0,583	0,597	15,806	15,312	15,574	15,981			
HC	100	104,0	1,995	0,595	0,607	0,595	0,575	15,783	16,129	15,783	15,206			
CC	100	51,0	2,917	0,925	0,935	0,935	0,935	75,423	76,282	76,282	76,282	76,34	0,54	0,71
CC	100	50,1	2,878	0,927	0,935	0,935	0,927	75,925	76,616	76,616	75,925			
CC	100	50,9	2,832	0,977	0,961	0,961	0,961	77,718	76,282	76,380	76,320			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

A.5 Curva de calibración de la glucosa con DNS.

Tabla 9. Concentraciones de glucosa para la curva estándar.

Glucosa [mg/g]	Absorbancia 540 [nm]
0,000	0,000
0,050	0,022
0,100	0,045
0,201	0,099
0,400	0,213
0,592	0,316
0,801	0,440
0,998	0,560
1,211	0,672
1,391	0,773
1,597	0,901
1,794	1,000
2,000	1,096

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

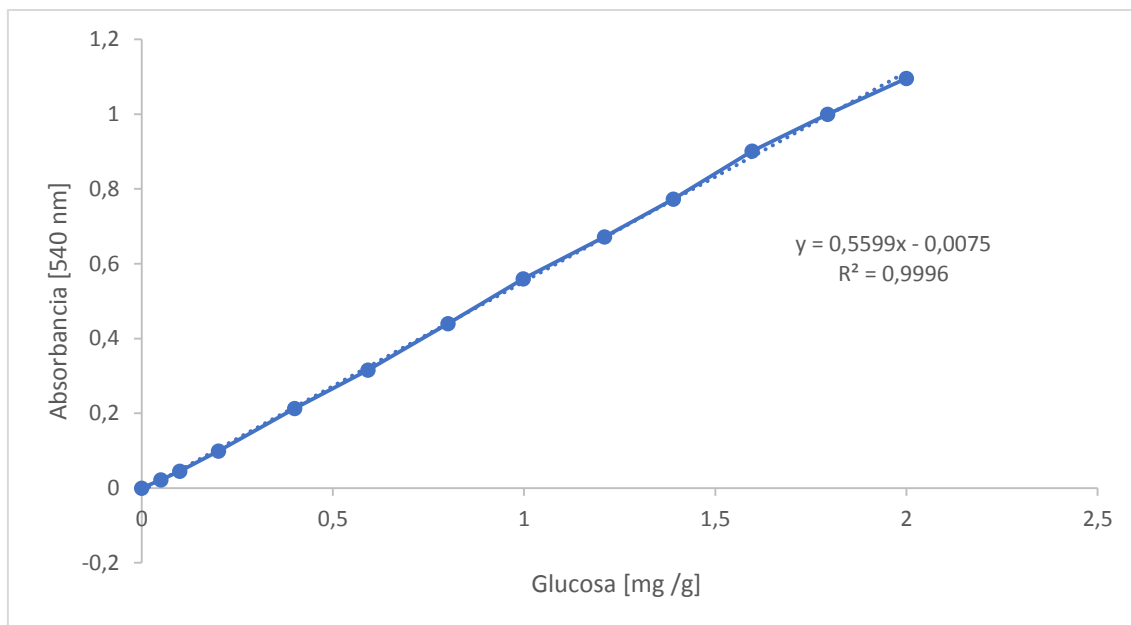


Figura 12. Curva estándar de glucosa.

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

El contenido de azúcar fue calculado a partir de la ecuación de esta curva, que muestra la correlación entre la concentración de glucosa y las absorbancias obtenidas a 540 nm.

$$A = m * C - B \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde:

A: Absorbancia obtenida a 540 nm

m: Pendiente de la ecuación de la curva de calibración.

C: concentración (mg/mL o g)

B: Intercepto de la curva de calibración

Tabla 10. Datos para determinación de azúcares reductores.

$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Abs-3	FD	AR-0 (%)	AR-1 (%)	AR-2 (%)	AR-3 (%)	Promedio	D. E	C.V
202,2	9,947	0,207	0,205	0,207	0,204	1,138	2,145	2,125	2,145	2,115	1,99	0,092	4,611
202,6	9,953	0,18	0,19	0,183	0,19	1,142	1,871	1,971	1,901	1,971			
200,3	9,979	0,189	0,189	0,184	0,189	1,143	1,981	1,984	1,933	1,984			
206,3	10,025	0,194	0,187	0,114	0,189	1,139	1,975	1,906	1,906	1,926			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

Tabla 11. Datos para determinar azúcares totales.

$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Abs-3	FD	AT 0 (%)	AT 1 (%)	AT 2 (%)	AT 3 (%)	Promedio	D.E	C. V
206,6	5,067	0,437	0,434	0,419	0,39	1,95	3,80	3,78	3,65	3,40	3,74	0,17	4,65
200,1	5,058	0,428	0,432	0,439	0,434	1,97	3,88	3,92	3,98	3,94			
203,2	5,062	0,456	0,442	0,438	0,426	1,83	3,78	3,67	3,64	3,54			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

Tabla 12 Datos obtenidos de la hidrólisis con invertasa.

$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Abs-3	FD	AR 0 (%)	AR 1 (%)	AR 2 (%)	AR 3 (%)	Promedio	D.E	C.V
207,2	5,060	0,101	0,100	0,101	0,102	1,279	0,587	0,582	0,587	0,593	0,584	0,024	4,041
206,7	5,067	0,033	0,035	0,036	0,034	3,123	0,560	0,586	0,599	0,573			
200,1	5,059	0,035	0,034	0,037	0,031	3,088	0,597	0,584	0,624	0,544			
200,5	5,025	0,036	0,034	0,035	0,036	3,059	0,599	0,574	0,587	0,599			
203,2	5,062	0,034	0,038	0,034	0,039	3,082	0,574	0,626	0,574	0,639			
202,6	9,953	0,047	0,044	0,044	0,047	1,281	0,609	0,577	0,577	0,609			
200,3	9,979	0,042	0,044	0,045	0,042	1,275	0,561	0,583	0,594	0,561			
206,3	10,025	0,042	0,041	0,045	0,041	1,284	0,551	0,541	0,583	0,541			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

Tabla 13. Almidón total determinación con DNS

Matriz	$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	FD	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Abs-3	Alm T 1 (%)	Alm T 2 (%)	Alm T 3 (%)	Alm T 4 (%)	Promedio	D. V	C. V
CñhAT1	52,1	17,755	1,976	0,415	0,439	0,416	0,420	46,175	47,481	44,864	45,319	45,447	0,974	2,143
CñhAT2	50,6	18,657	2,023	0,429	0,424	0,426	0,433	45,045	44,491	44,713	45,488			
MaízT1	51,1	11,500	22,137	0,069	0,070	0,069	0,070	61,284	62,085	61,284	62,085	63,370	1,884	2,973
MaízT2	50,6	13,737	19,737	0,067	0,068	0,069	0,068	64,194	65,055	65,916	65,055			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

A.6 Curva de calibración de glucosa con el Kit para determinación enzimática de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20).

Tabla 14. Curva de calibración con el Kit para determinación de Glucosa, Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20).

$mg\ Glu$ /g	Absorbancia 540 nm
0,00	0,000
0,02	0,394
0,04	0,762
0,06	1,030
0,08	1,308

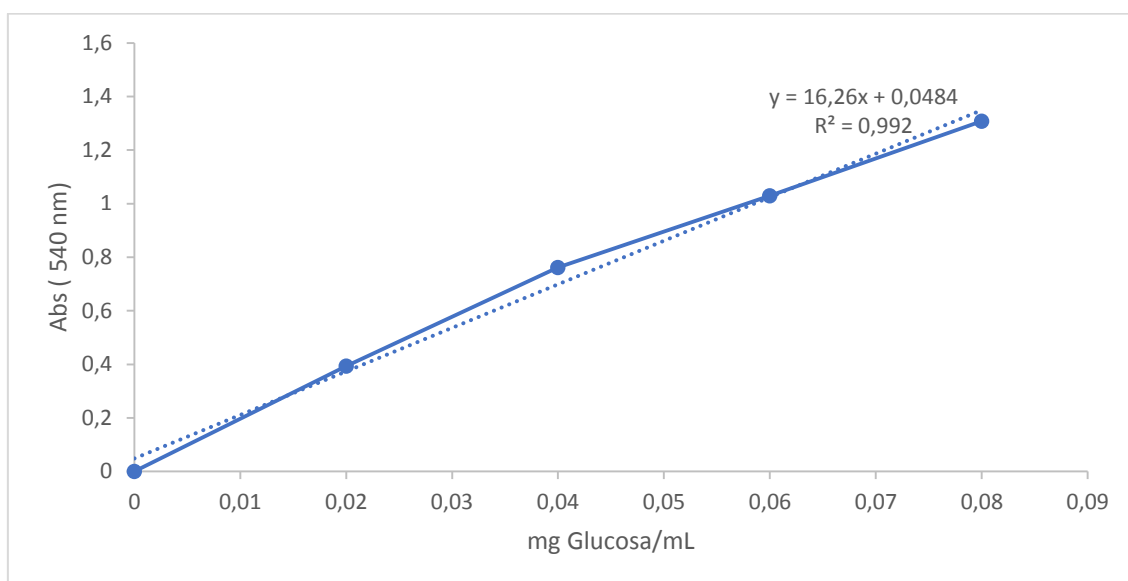


Figura 13. Curva estándar de glucosa para Glucosa Oxidasa/Peroxidasa Reagent G 3660.

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

Tabla 15. Cuantificación de almidón total.

	$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	FD	Abs-0	Abs-1	Abs-2	Alm 0 (%)	Alm 1 (%)	Alm 2 (%)	Promedio	D. E	C.V
R1	50	17,76	20,06	1,108	1,09	1,112	47,91	47,16	48,07	46,71	1,17	2,51
R2	50	18,66	19,33	1,045	1,055	1,066	45,28	45,70	46,16			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA, 2019

Tabla 16. Determinación de Almidón resistente

	$W_{muestra}$ (mg)	V_{aforo} (mL)	Abs-0	Almidón Resistente (%)	Promedio	D. E	C.V
R1	0,050	25,378	0,891	3,084	3,35	0,24	7,30
R2	0,052	29,890	0,866	3,423			
R3	0,051	30,546	0,785	3,239			
R4	0,051	28,429	0,966	3,652			

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

A7. Cálculo de almidón digerible

(Ecuación 3)

$$Alm_{digerible} = Alm_{total} - Alm_{resistente}$$

A8. Cálculo de almidón total

(Ecuación 4)

$$\% A_t = \frac{(G_T - Az_T)}{W_m} * 100 * 0,9$$

Donde:

A_t = Almidón total

G_T = Glucosa total hidrolizada por la amiloglucosidasa en la determinación de almidón total

Az_t =Azúcares totales

W_m : Peso muestra original

F= factor de conversión de glucosa a almidón (0,9).

A9. Cálculo para almidón Resistente

$$\% A_R = \frac{(G_R - Az_T)}{W_m} * 100 * 0,9 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde:

A_t = Almidón total

G_R = Glucosa total hidrolizada por la amiloglucosidasa en la determinación de almidón resistente

Az_t =Azúcares totales

W_m : Peso de la muestra original

F= factor de conversión de glucosa a almidón (0,9).

A10. Cálculo para almidón digerible.

$$\%A_d = \%Alm_{total} - \%Alm_{resistente} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

A_t = Almidón total

A_r =Almidón resistente

A11. Cinética de la hidrólisis de almidón por α -amilasa.

Tabla 17. Fracciones de carbohidratos generados durante la digestión in vitro en harina de cañihua.

Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
TIEMPO (Min)	mg maltosa/mg AT	TIEMPO (Min)	mg maltosa/mg AT	TIEMPO (Min)	mg maltosa/mg AT
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14,57	0,57	16,01	0,56	14,59	0,53

29,54	0,66	30,57	0,66	29,54	0,63
44,57	0,67	46,13	0,69	45,01	0,69
59,48	0,69	61,00	0,71	59,54	0,69
89,57	0,71	91,00	0,76	90,05	0,71
120,00	0,81	120,55	0,81	121,03	0,72
149,57	0,82	151	0,82	149,59	0,78
180,00	0,84	180,59	0,83	179,59	0,81

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019)

Tabla 18. *Fracciones de carbohidratos generados durante la digestión in vitro en almidón de maíz.*

Tiempo (min)	Maltosa (mg)/ mg Almidón Total
0,00	0,00
15,06	0,72
30,00	0,74
45,00	0,75
60,01	0,79
90,00	0,82
120,00	0,84
150,49	0,85
180,63	0,86

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

A 12. Almidón rápidamente hidrolizado a maltosa por α -amilasa:

$$ARHM = (WM_{30}) \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

WM_{30} = Maltosa hidrolizada por α -amilasa en 30 min.

A 12. Almidón lentamente hidrolizado a maltosa por α -amilasa:

$$ALHM = (WM_{120} - WM_{30}) \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

$ALHM_{120}$ = Cantidad de almidón hidrolizado entre 30 y 120 minutos.

WM_{30} = Peso de maltosa en 30 minutos de digestión en (mg).

WM_{120} = Peso de maltosa en 120 minutos (mg).

ANEXO B

FOTOGRAFÍAS



Figura 14. Granos de cañihua



Figura 15. Clasificador granulométrico



Figura 16. Extracción de grasa en harina de cañihua.



Figura 17. Extracción de azúcares en agua a 60°C.

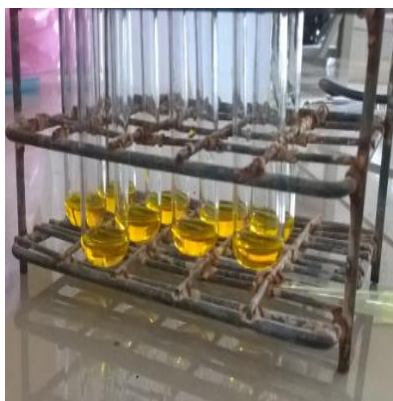


Figura 18. Alícuota de muestra+ DNS antes de la reacción.



Figura 19. Extracción de la invertasa



Figura 20. Gelatinización del almidón de cañihua.



Figura 21. Estándares para cuantificación de glucosa con el Kit (GAGO-20)



Figura 22. Muestras para cuantificación de almidón.



Figura 23. Precipitación de proteínas



Figura 24. Aforo de digeridos proteicos



Figura 25. Estándares para cuantificación de proteínas listas para lectura de absorbancias.



Figura 26. Simulación de digestibilidad en proteínas.



Figura 27. Muestras para corrida de electroforesis

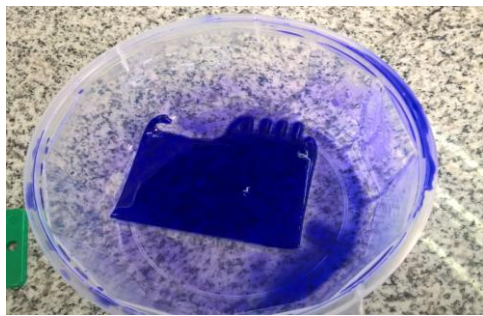


Figura 28. Gel en solución de desteñido

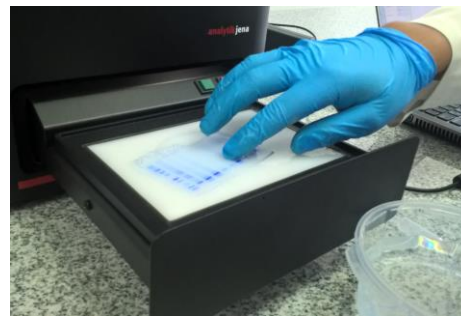


Figura 29. Fotodocumentador de gel de poliacrilamida, (GelTower).

ANEXO C

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

C1. PREPARACIÓN DE DNS

Pesar 250 mg de DNS y diluir en 10 mL de agua, agitar con un magneto a 40°C hasta que esté bien solubilizado y adicionar 5 mL de NaOH 2 M (cambia de amarillo verdoso a naranja). Agregar lentamente 7,5 g de Tartrato de sodio y potasio. En caso de observar precipitación agregar agua destilada cuidando de no pasar el volumen de aforo de 25 mL.

C2. PREPARACIÓN DE CARREZ 1 Y 2

Solución de Carrez I

Pesar 15 g de Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ y aforar a 100 mL.

Solución de Carrez II

Pesar 30 g de sulfato de zinc heptahidratado $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ y aforar a 100 mL.

Protocolo para la elaboración de geles para electroforesis

Tabla 19. Composición del gel separador o de resolución.

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1,530 mL
Acrilamida/Bis 12 %	1,800mL
Tris-HCL 1,5 M, pH 6,8	1,125mL
SDS 10 %	0,045mL
PSA 10 %	22,5 μ L
Temed	2,30 μ L

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular II-UEB (2019).

Tabla 20. Composición del gel concentrador o de apilamiento.

Reactivo	Volumen
----------	---------

Agua destilada	1,22 mL
Acrilamida/Bis 30%	0,260 mL
Tris-HCL 0,5M, pH 8,8	0,500 mL
SDS 10 %	0,020 mL
PSA 10 %	10,00 μ L
Temed	2,00 μ L

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular II-UEB (2019).

ANEXO D

**EXTRACCIÓN Y
DETERMINACIÓN DE
ACTIVIDAD DE INVERTASA**

D1. EXTRACCIÓN DE INVERTASA

En un frasco para autoclavado de 100 mL disolver con agitación moderada, 14 g de levadura en polvo en 50 mL solución de bicarbonato de sodio 0,1 M y mantener en agitación lenta por 1 hora e incubar a 37 °C por 15 h. Al finalizar el tiempo de incubación trasvasar el contenido de la botella a tubos Falcón de 50 mL y centrifugar a 4400 rpm por 1 hora. El sobrenadante colocar en tubos eppendorf de 2,0 mL hasta 1,8 mL de su capacidad, centrifugar a 13000 rpm y almacenar el sobrenadante en congelación en tubos eppendorf.

D2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INVERTASA

De la enzima previamente extraída, tomar 100 μ L y diluir con 1,6 mL de buffer acetato pH 4,8. Para preparar el sustrato, disolver la sacarosa a razón de 10 mg de sacarosa por mL de buffer acetato de pH 4,8. En 6 tubos colocar 200 μ L de enzima, añadir 200 μ L del sustrato a diferentes tiempos (cada 15 o 30 segundos), y transcurrido el tiempo de reacción establecido para cada tubo, adicionar 400 μ L de DNS para detener la reacción. Hervir 5 minutos exactos y adicionar 4 mL de agua destilada. Finalmente leer las absorbancias a 540 nm.

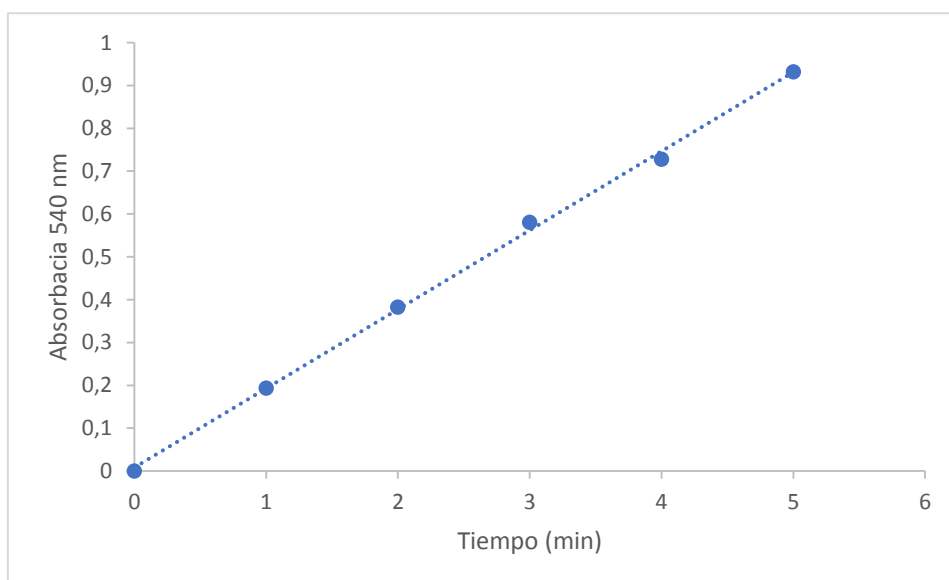


Figura 30. Curva de cinética para determinación de actividad de la invertasa.

Fuente: Laboratorio de BIOPROPEPTI-UTA (2019).

Cálculo de actividad de la invertasa.

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = m * \frac{mg \text{ Glc}}{ml \text{ min}} * \frac{1 \text{ mmol Glc}}{PM \text{ Glc mg}} * \frac{10^3 \mu\text{mol Glc}}{1 \text{ mmol}} * \frac{V_T \text{ ml}}{V_{enz} \text{ ml}} * \frac{1 \mu\text{mol Sac}}{2 \mu\text{mol Glc}} * FD$$

Dónde:

m : Pendiente del gráfico de Azúcares reductores vs. Tiempo en la sección lineal.
 FD : Factor de dilución

$PM \text{ Glc}$: Peso Molecular de la glucosa

○ **Simplificando**

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = \frac{10^3 \cdot m \cdot V_T}{PM \text{ Glc} \cdot V_{enz}} * FD$$

$$V_T = V_E + V_S \\ (\text{relación } 1:1)$$

Dónde

V_T : Volumen total

V_E : Volumen de enzima

V_S : Volumen de sustrato

$$V_E = V_S$$

$$V_T = 2V_E$$

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = \frac{10^3}{2} * 2 * \frac{m}{PM \text{ Glc}} * FD$$

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = 10^3 \frac{pte}{PM \text{ Glc}} * FD$$

○ **Reemplazando**

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = \frac{10^3}{180,156} * 0,1846 * 16$$

$$\text{Actividad} \left[\frac{UI}{ml_{enz}} \right] = 16,18 \text{ UI}/ml_{enz}$$