



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS**

<b>Fecha de presentación</b>	Julio 2010
<b>Estación experimental</b>	Santa Catalina
<b>Programa/ Departamento</b>	Nutrición y Calidad
<b>Proyecto</b>	Código: 2100527030 Titulo: Alternativas tecnológicas para mejorar la competitividad de los granos Andinos: quinua, chocho, amaranto, sangorache.
<b>Resultado</b>	Numero: 3 Mejoramiento de la calidad de granos andinos y productos derivados
<b>Actividad Titulo</b>	Numero: 1 Evaluación del contenido de ácido fítico y su relación con la biodisponibilidad de minerales, proteína, y lisina en chocho, quinua, amaranto, sangorache procesadas y no procesadas.
<b>Ubicación</b>	Provincia: Pichincha Cantón: Mejía Parroquia: Cutuglagua
<b>Autor Co-autores</b>	Egda. María Belén Riera Sánchez Ing. Elena Villacrés
<b>Colaboradores</b>	Programa de Leguminosas y Granos Andinos Instituto Tecnológico Agropecuario Simón Rodríguez
<b>Fecha de iniciación Fecha de terminación</b>	Julio 2010 Julio 2011
<b>Presupuesto</b>	\$ 9601,0845
<b>Fuente de financiamiento</b>	Fondos fiscales (59,52%) : 5715,4845 Tesista (40,74%) : 3885,6

## 1. ANTECEDENTES

Las raíces, tubérculos y granos andinos constituyen una fuente importante de energía en la nutrición humana. Los carbohidratos son su mayor constituyente, sin embargo, también aportan con proteínas, grasas y otros elementos, (Valencia *et al.*, 2001; FAO, 2002).

En Ecuador, los granos andinos forman parte de los sistemas de producción, principalmente en la región Sierra, ya que son cultivados en asociación, intercalados, en monocultivos o en rotación con otros cultivos, (Peralta *et al.*, 2009).

El chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), el amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y el ataco o sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), son granos de origen andino, considerados estratégicos por su valor e importancia en la alimentación humana, (Peralta *et al.*, 2009).

Las materias primas destinadas para la alimentación humana proporcionan los macro y micronutrientes necesarios, adecuados para su consumo. Sin embargo, dependiendo del tipo de producto, pueden contener en forma natural algunas sustancias que genéricamente se denominan factores antinutritivos, los cuales impiden la asimilación de los minerales porque forman con ellos complejos, como por ejemplo el ácido fítico presente en muchos vegetales, que es capaz de quelar los minerales e impedir su absorción, (Haug & Lantzsch, 1983; Valencia *et al.*, 2001). Se ha observado que el ácido fítico presente en los alimentos causa un decrecimiento de la disponibilidad fisiológica del calcio, magnesio, zinc y hierro en la dieta (Reddy *et al.*, 1982; Binaghi *et al.*, 2007).

El ácido fítico o mioinositol hexafosfórico (IP6), y sus sales derivadas constituyen la mayor reserva de fósforo y mioinositol de las semillas de cereales y leguminosas, (Wyatt & Triana, 1994). Además, las sales del ácido fítico denominadas fitatos interaccionan con residuos básicos de proteínas formando complejos, como proteína-fitato y proteína fitatomineral, por lo que se paralizan muchas reacciones enzimáticas a nivel digestivo, ya que en el hombre y los animales las fosfatasas endógenas (fitasas) no están provistas de suficiente actividad para liberar los minerales de la estructura del fitato, (Mazza, 2000; Martínez *et al.*, 2002).

La fitasa es la enzima digestiva que hidroliza el ácido fítico, es poco activa a nivel digestivo y su concentración es muy pobre en los granos, por que la utilización del fósforo es reducida y 70-80 % de este mineral ingerido es excretado, (Keshavarz, 1998; Nys & Barrier, 1995).

Los granos andinos presentan cantidades apreciables de macro y micro elementos, sin embargo, Robinson, (1989); Zhou & Erdan (1995), señalan que para considerar a un alimento como una buena de minerales, es necesario considerar cuatro factores: (1) la concentración del mineral en el alimento (2) la cantidad que generalmente se consume (3) la pérdida de algunos minerales durante el procesamiento y (4) disponibilidad del mineral en el alimento.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los minerales son sustancias con una importante función reguladora, que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser aportados por la dieta. En los granos andinos, estos nutrientes se encuentran ampliamente distribuidos, sin embargo muchos factores dietéticos como el ácido fítico, reducen la absorción de varios minerales a causa de la formación de complejos insolubles con estos elementos.

En este estudio se plantea determinar el contenido de ácido fítico y su relación con la biodisponibilidad de minerales, proteína, y lisina en líneas avanzadas y variedades de chocho, quinua, amaranto y sangorache, tanto en los granos procesados como en los no procesados, para recomendar su consumo y forma de uso, como parte de una dieta y modo de vida saludable, objetivo que puede alcanzarse a través del mejoramiento genético o mediante la aplicación de procesos tecnológicos apropiados, con el finalidad de incrementar la disponibilidad de varios minerales, especialmente, el magnesio, el calcio, potasio, cinc, cobre y hierro, los cuales son mal asimilados por nuestro organismo, en forma de fitatos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el contenido de ácido fítico y su correlación con la biodisponibilidad de minerales, proteína y lisina, en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache procesada y no procesada.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la variabilidad del contenido de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.
- Evaluar el efecto de algunos procesos sobre el contenido de ácido fítico, en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.
- Determinar la biodisponibilidad de minerales en los granos mencionados tanto en estado nativo como procesado, con la técnica más efectiva identificada en el objetivo 2.
- Determinar el contenido de lisina disponible y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache procesado y no procesado.

## **4. HIPÓTESIS**

### **Hipótesis nula (Ho1)**

No existe variabilidad en el contenido de ácido fólico, en las líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.

### **Hipótesis nula (Ho2)**

El procesamiento de estos granos no tiene efecto sobre el contenido de ácido fólico; la biodisponibilidad de minerales y la proteína.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

Líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache

### **5.2 Reactivos**

Ácido fólico, reactivo estándar

Ácido clorhídrico

Agua desionizada

Hidróxido de sodio

Cloruro de sodio

Reactivo Wade ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  más ácido sulfoalíclico)

Ácido trinitrobencensulfónico

Éter etílico

Estándar de lisina (L-lisina monoclorhidrato)

Solución multienzimática (tripsina, chymotripsina y peptidasa)

Mezcla de bilis-pancreatina (2,5% bilis y 0,4% pancreatina en  $\text{NaHCO}_3$  0,1N)

Bicarbonato de sodio

Pepsina-HCl

Ácido nítrico

Ácido perclórico

Buffer PIPES

Resina de 8mm x 65mm (AG1 – X8, 200-400 mesh, Bio Rad No 140-1451)

### **5.3. Equipos de laboratorio**

Autoclave

Centrífuga

pHmetro

Molino

Estufa

Espectrofotómetro

Balanza analítica  
Agitado

## **5.4 METODOLOGÍA**

### **5.4.1. Características del sitio experimental**

Laboratorio de Nutrición y Calidad, INIAP, Estación Experimental Santa Catalina

#### **Ubicación**

Provincia: Pichincha  
Cantón: Mejía  
Parroquia: Cutuglagua

#### **Situación Geográfica**

Altitud: 3058m  
Latitud: 00°22'S.  
Longitud: 78°23'O.

Fuente: (www. iniap-ecuador.gov.ec, 2010)

### **5.4.2. Ensayo 1: Determinación de la variabilidad del contenido de ácido fítico en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.**

#### **a. Unidad experimental**

Estará constituido por 50 g de cada especie

#### **b. Tipo de diseño**

Se aplicará un diseño completamente al azar con tres observaciones por cada especie y/ o variedad.

#### **c. Tratamientos**

Los tratamientos están constituidos por las líneas y/o variedades de quinua (2), chocho (4), amaranto (2) y sangorache (3).

**Cuadro N°1.** Tratamientos para la determinación de ácido fítico en variedades de quinua.

Tratamientos	Descripción
T1	Variedad Pata de Venado
T2	Variedad INIAP-Tunkahuan

**Cuadro N°2.** Tratamientos para la determinación de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de chocho.

Tratamientos	Descripción
T1	ECU-2658-2
T2	ECU-8415
T3	ECU-2700-2
T4	Variedad INIAP-Andino 450

**Cuadro N°3.** Tratamientos para la determinación de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de sangorache.

Tratamientos	Descripción
T1	ECU-17758
T2	ECU-082
T3	ECU-0069

**Cuadro N°4.** Tratamientos para la determinación de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de amaranto.

Tratamientos	Descripción
T1	Línea-Perucho
T2	Variedad INIAP-Alegría

#### **d. Análisis estadístico**

Para el chocho y el sangorache se aplicará un análisis de varianza.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza para la determinación de ácido fítico en líneas y/o variedades de chocho.

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>
TRATAMIENTO	3
ERROR	8
TOTAL	11

**Cuadro 6.** Análisis de varianza para la determinación de ácido fítico en líneas y/o variedades de sangorache.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TRATAMIENTO	2
ERROR	6
TOTAL	8

### e. Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 1%.

Para la quinua y el amaranto se aplicará el estadístico “t student” a un nivel de probabilidad del 5%.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}}$$

En el caso de la quinua, se tiene:

$\bar{X}_1$  = Media de ácido fítico correspondiente a la variedad pata de venado.

$\bar{X}_2$  = Media de ácido fítico correspondiente a la variedad Tunkahuan.

$S_1^2$  = Desviación estándar correspondiente a la variedad pata de venado.

$S_2^2$  = Desviación estándar correspondiente a la variedad Tunkahuan.

Para n = 6

Con: n-1 Grados de libertad

### f. Variables y métodos de evaluación

Se evaluará el contenido de ácido fítico (descripción detallada del método consta en el Anexo 1).

### g. Manejo específico del experimento

Los materiales experimentales serán cultivados en la granja del Colegio Simón Rodríguez, Provincia de Cotopaxi.

Una vez cosechados se transportarán al laboratorio; se someterán a secado para disminuir la humedad a un nivel del 12%. Los granos secos serán molidos a un tamaño de partícula de 20 mesh; procediendo a determinar el ácido fítico.

**5.4.3. Ensayo 2: Evaluación del efecto de algunos procesos sobre el contenido de ácido fítico, en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache**

Se evaluará el efecto del proceso de cocido, reventado, tostado y fritura sobre cada especie en estudio. Para la quinua y el chocho, la relación entre estos factores se describe en el siguiente cuadro.

**Cuadro 7.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre el contenido de ácido fítico en variedades de quinua.

Factor	Descripción	Nivel
A	variedades de quinua	a <sub>1</sub> Pata de Venado a <sub>2</sub> Tunkahuan
B	Tipo de proceso	b <sub>1</sub> cocido b <sub>2</sub> tostado b <sub>3</sub> frito

**Cuadro 8.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de chocho.

Factor	Descripción	Nivel
A	líneas y/o variedades de chocho	a <sub>1</sub> ECU-2658-2 a <sub>2</sub> ECU-8415 a <sub>3</sub> ECU-2700-2 a <sub>4</sub> Variedad INIAP-ANDINO
B	Tipo de proceso	b <sub>1</sub> cocido b <sub>2</sub> tostado b <sub>3</sub> frito

**Cuadro 9.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de amaranto.

Factor	Descripción	Nivel
A	líneas y/o variedades de amaranto	a <sub>1</sub> Línea - Perucho a <sub>2</sub> INIAP-Alegría
B	Tipo de proceso	b <sub>1</sub> cocido b <sub>2</sub> tostado b <sub>3</sub> frito

**Cuadro 10.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de sangorache

Factor	Descripción	Nivel
A	líneas y/o variedades de sangorache	a <sub>1</sub> ECU-17758 a <sub>2</sub> ECU- 082 a <sub>3</sub> ECU- 0069
B	Tipo de proceso	b <sub>1</sub> cocido b <sub>2</sub> tostado b <sub>3</sub> frito



**a. Unidad experimental**

Estará constituida por 50 g de cada especie

**b. Tipo de diseño**

Se aplicará un diseño completamente al azar en arreglo factorial (AxB) de 2x 3 para el caso de la quinua, 4x3 para el chocho; 2x 3 para el amaranto y 3x3 para el sangorache, con tres repeticiones por tratamiento.

**c. Tratamientos**

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio

**Cuadro 11.** Tratamientos para determinar el efecto del procesamiento en el contenido de ácido fítico en variedades de quinua.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Variedad Pata de Venado , cocido
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Variedad Pata de Venado , tostado
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Variedad Pata de Venado, frito
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	Variedad Tunkahuan , cocido
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	Variedad Tunkahuan , tostado
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	Variedad Tunkahuan, frito

**Cuadro 12.** Tratamientos para determinar el efecto del procesamiento en el contenido de ácido fítico en líneas avanzadas de y/o variedades de chocho

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	ECU-2658-2, cocido
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	ECU-2658-2, tostado
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	ECU-2658-2, frito
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	ECU-8415, cocido
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	ECU-8415, tostado
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	ECU-8415, frito
a <sub>3</sub> b <sub>1</sub>	ECU-2700-2, cocido
a <sub>3</sub> b <sub>2</sub>	ECU-2700-2, tostado
a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	ECU-2700-2, frito
a <sub>4</sub> b <sub>1</sub>	Variedad INIAP-ANDINO, cocido
a <sub>4</sub> b <sub>2</sub>	Variedad INIAP-ANDINO, tostado
a <sub>4</sub> b <sub>3</sub>	Variedad INIAP-ANDINO, frito

**Cuadro 13.** Tratamientos para determinar el efecto del procesamiento en el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de amaranto.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Línea - Perucho, cocido
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Línea - Perucho, tostado
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Línea - Perucho, frito
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	Variedad INIAP-Alegría, cocido
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	Variedad INIAP-Alegría, tostado
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	Variedad INIAP-Alegría, frito

**Cuadro 14.** Tratamientos para determinar el efecto del procesamiento en el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de sangorache.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	ECU-17758, cocido
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	ECU-17758, tostado
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	ECU-17758, frito
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	ECU-082, cocido
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	ECU-082, tostado
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	ECU-082, frito
a <sub>3</sub> b <sub>1</sub>	ECU-0069, cocido
a <sub>3</sub> b <sub>2</sub>	ECU-0069, tostado
a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	ECU-0069, frito

**d. Análisis estadístico**

**Cuadro 15.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto de varios procesos sobre el contenido de ácido fítico en variedades de quinua

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	17
Factor A (variedad/línea quinua)	1
Factor B (proceso)	2
Interacción axb	2
Error experimental	12

**Cuadro 16.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto de varios procesos sobre el contenido de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de chocho

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamiento	35
Factor A (Líneas avanzadas y/o variedad de chocho)	3
Factor B (proceso)	2
Interacción AXB	6
Error experimental	24

**Cuadro 17.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto de varios procesos sobre el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de amaranto.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	17
Factor A (variedad/línea amaranto)	1
Factor B (proceso)	2
Interacción AxB	2
Error experimental	12

**Cuadro 18.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto de varios procesos sobre el contenido de ácido fítico en líneas y/o variedades de sangorache.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	26
Factor A (Líneas de sangorache)	2
Factor B (proceso)	2
Interacción AxB	4
Error experimental	18

**e. Análisis funcional**

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 1 %

**f. Variables y métodos de evaluación**

Se evaluará el contenido de ácido fítico en las muestras procesadas (descripción detallada del método consta en el anexo 1)

**g. Manejo específico del experimento**

El grano de quinua será cocido en agua potable, en olla abierta durante 30 minutos. El grano así procesado será escurrido, secado con aire forzado, molido a 20 mesh, procediendo a la determinación de ácido fítico.

Los granos de amaranto y sangorache, poseen una testa más dura que la quinua, por lo serán cocidos en agua, por 40 minutos, posteriormente serán secados y molidos.

El chocho será cocido por 40 minutos, desamargado en agua corriente por 72 horas y secado en estufa con aire forzado hasta alcanzar una humedad del 12 %.

Para el tostado, los granos serán sometidos a una temperatura 140-150°C durante 25 minutos en un tostador giratorio con calentamiento a gas, y molidos.

El proceso de fritura se realizará a 180°C por 4 min. en grano entero  
 El amaranto a diferencia del canguil de maíz, revienta en contacto con una superficie caliente sin presencia de aceite. Este proceso se realizará a 100°C por 5 minutos.

**5.4.4. Ensayo 3: Determinar la biodisponibilidad de minerales en los granos mencionados tanto en estado nativo como procesado, con la técnica más efectiva identificada en el objetivo 2.**

Factores en estudio: Líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache

**Cuadro 19.** Descripción de los factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de minerales en variedades de quinua.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Variedades	b <sub>1</sub> variedad Tunkahuan b <sub>2</sub> variedad Pata de Venado

**Cuadro 20.** Descripción de los factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de chocho.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	líneas avanzadas de y/o variedades	b <sub>1</sub> ECU-2658-2 b <sub>2</sub> ECU-8415 b <sub>3</sub> ECU-2700-2 b <sub>4</sub> Variedad INIAP-ANDINO

**Cuadro 21.** Descripción de los factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de amaranto.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Variedades	b <sub>1</sub> Variedad INIAP- Perucho b <sub>2</sub> Variedad INIAP-Alegría

**Cuadro 22.** Descripción de los factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de minerales en líneas avanzadas de sangorache.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Líneas	b <sub>1</sub> ECU-17758 b <sub>2</sub> ECU-082 b <sub>3</sub> ECU-0069

**a. Unidad experimental**

Estará constituida por 100 g de cada especie, en estado nativo (no procesado) y procesado.

**b. Tipo de diseño**

Se aplicará un diseño completamente al azar en arreglo factorial (AxB) de 2x2 en el caso de la quinua, para el chocho 2x4; para el amaranto 2x2 y 2x3 para el sangorache, con tres repeticiones por tratamiento.

**c. Tratamientos**

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio.

**Cuadro 23.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso en la disponibilidad de minerales en variedades de quinua.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, Tunkahuan
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, Pata de Venado
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, Tunkahuan
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, Pata de Venado

**Cuadro 24.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso en la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de chocho.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, ECU-2658-2
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, ECU-8415
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Procesado, ECU-2700-2
a <sub>1</sub> b <sub>4</sub>	Procesado, INIAP-Andino 450
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, ECU-2658-2
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, ECU-8415
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	No Procesado, ECU-2700-2
a <sub>2</sub> b <sub>4</sub>	No Procesado, INIAP Andino 450

**Cuadro 25.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso en la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de amaranto.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
$a_1b_1$	Procesado, INIAP Alegría
$a_1b_2$	Procesado, Línea - Perucho
$a_2b_1$	No Procesada, INIAP Alegría
$a_2b_2$	No Procesado, Línea - Perucho

**Cuadro 26.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso en la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de sangorache.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
$a_1b_1$	Procesado, ECU-17758
$a_1b_2$	Procesado, ECU-082
$a_1b_3$	Procesado, ECU- 0069
$a_2b_1$	No Procesado, ECU-17758
$a_2b_2$	No Procesado, ECU-082
$a_2b_3$	No Procesado, ECU-0069

#### d. Análisis estadístico

**Cuadro 27.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto del procesamiento sobre la disponibilidad de minerales en variedades de quinua.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	11
Factor a (condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedad )	1
Interacción AxB	1
Error experimental	8

**Cuadro 28.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto del procesamiento sobre la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas y/o variedades de chocho

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	23
Factor a (Condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedades)	3
Interacción AxB	3
Error experimental	16

**Cuadro 29.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto del procesamiento sobre la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas y/o variedades de amaranto.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	11
Factor a (condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedad )	1
Interacción AxB	1
Error experimental	8

**Cuadro 30.** Esquema del análisis de varianza para la determinación del efecto del procesamiento sobre la disponibilidad de minerales en líneas avanzadas de sangorache.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	17
Factor a ( condición del grano)	1
Factor b (líneas)	2
Interacción AxB	2
Error experimental	12

#### e. Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba Tukey al 1%

#### f. Variables y métodos de evaluación

Se evaluará la biodisponibilidad de minerales en los tratamientos especificados, aplicando la metodología especificada en el Anexo 2.

#### g. Manejo específico del experimento

Cada muestra se homogenizará para facilitar su posterior análisis, las cuales se incubarán con 5 ml de una solución acuosa al 3% de  $\alpha$ -amilasa, durante 30 minutos a 37° C con agitación. Luego, el pH se ajustará a 2 y se agregarán pepsina-HCl, incubándose la mezcla a 37° C durante dos horas, con agitación. Dos alícuotas del digerido se colocan en erlenmeyers con bolsas de diálisis conteniendo buffer PIPES. Después de una hora de incubación, cuando el pH alcanza un valor mínimo de 4,5, se agregaron de una mezcla de bilis-pancreatina prosiguiéndose a la incubación durante dos horas a 37° C. Los minerales dializados se determinan por espectroscopia de absorción atómica.

**5.4.5. Ensayo 4: Determinación del contenido de lisina disponible y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache procesado y no procesado.**

Factores en estudio: Líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache

**Cuadro 31.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en variedades de quinua

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Variedades	b <sub>1</sub> variedad Tunkahuan b <sub>2</sub> variedad Pata de Venado

**Cuadro 32.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas y/o variedades de chocho

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	líneas avanzadas de y/o variedades	b <sub>1</sub> ECU-2658-2 b <sub>2</sub> ECU-8415 b <sub>3</sub> ECU-2700-2 b <sub>4</sub> Variedad INIAP-ANDINO

**Cuadro 33.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de y/o variedades de amaranto.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Variedades	b <sub>1</sub> Línea - Perucho b <sub>2</sub> Línea INIAP-Alegría

**Cuadro 34.** Factores en estudio para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de y/o variedades de sangorache.

Factor	Descripción	Niveles
A	Condición del grano	a <sub>1</sub> Procesado a <sub>2</sub> No Procesado
B	Líneas	b <sub>1</sub> ECU-17758 b <sub>2</sub> ECU-082 b <sub>3</sub> ECU-0069



**a. Unidad experimental**

Estará constituida por 100 g de cada especie procesada y no procesada.

**b. Tipo de diseño**

Se aplicará un diseño completamente al azar en arreglo factorial (AxB) de 2x 2 en el caso de la quinua, en el chocho 2x4; para el amaranto 2x2; para el sangorache 2x3, con tres repeticiones por tratamiento.

**c. Tratamientos**

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio.

**Cuadro 35.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en variedades de quinua

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, Tunkahuan
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, Pata de Venado
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, Tunkahuan
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, Pata de Venado

**Cuadro 36.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas y/o variedades de chocho

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, ECU-2658-2
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, ECU-8415
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Procesado, ECU-2700-2
a <sub>1</sub> b <sub>4</sub>	Procesado, INIAP-Andino 450
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, ECU-2658-2
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, ECU-8415
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	No Procesado, ECU-2700-2
a <sub>2</sub> b <sub>4</sub>	No Procesado, INIAP Andino 450

**Cuadro 37.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de y/o variedades de amaranto.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, INIAP Alegría
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, Línea - Perucho
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, INIAP Alegría
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, Línea - Perucho

**Cuadro 38.** Tratamientos para determinar el efecto del proceso sobre la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de sangorache.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	Procesado, ECU-17758
a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	Procesado, ECU-082
a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	Procesado, ECU-0069
a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	No Procesado, ECU-17758
a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	No Procesado, ECU-082
a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	No Procesado, ECU-0069

#### d. Análisis estadístico

**Cuadro 39.** Análisis de varianza para la determinación del efecto del proceso sobre la biodisponibilidad del contenido de lisina y la digestibilidad de la proteína en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	11
Factor a (condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedad )	1
Interacción AxB	1
Error experimental	8

**Cuadro 40.** Análisis de varianza para la determinación del efecto del proceso sobre la biodisponibilidad del contenido de lisina y la digestibilidad de la proteína en líneas avanzadas y/o variedades de chocho

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	23
Factor a (Condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedades)	3
Interacción AxB	3
Error experimental	16

**Cuadro 41.** Análisis de varianza para la determinación del efecto del proceso sobre la biodisponibilidad del contenido de lisina y la digestibilidad de la proteína en líneas avanzadas de y/o variedades de amaranto

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	11
Factor a (condición del grano)	1
Factor b (Líneas/variedad )	1
Interacción AxB	1
Error experimental	8

**Cuadro 42.** Análisis de varianza para la determinación del efecto del proceso sobre la biodisponibilidad del contenido de lisina y la digestibilidad de la proteína en líneas avanzadas de sangorache.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	17
Factor a ( condición del grano)	1
Factor b (líneas)	2
Interacción AxB	2
Error experimental	12

#### **e. Análisis funcional**

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba Tukey al 1%

#### **f. Variables y métodos de evaluación**

Se evaluará la biodisponibilidad de lisina y la digestibilidad de la proteína para los tratamientos especificados (descripción detallada del método consta en el anexo 3 y 4)

#### **g. Manejo específico del experimento**

Para la determinación de la proteína es necesaria una solución multienzimática, que se mantiene en un baño de agua helada y se ajusta a pH 8.0; 5 ml de la solución multienzimática se añade a una suspensión de proteína, una rápida determinación de pH se realiza inmediatamente. El descenso de pH se registra automáticamente durante 10 minutos a 37 °C usando pHmetro.

**6. CRONOGRAMA.**

ACTIVIDADES	DURACIÓN EN MESES												
	2010						2011						
	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1. Revisión de literatura y realización del anteproyecto.													
2. Determinación de la variabilidad del contenido de ácido fítico en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.													
3. Evaluación del efecto de algunos procesos sobre el contenido de ácido fítico, en líneas avanzadas y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache.													
4. Determinación de la biodisponibilidad de minerales en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache no procesada y tratadas con un proceso efectivo para reducir el contenido de ácido fítico.													
5. Determinación del contenido de lisina disponible y la digestibilidad de la proteína, en líneas avanzadas de y/o variedades de quinua, chocho, amaranto y sangorache procesado y no procesado.													
6. Tabulación y análisis de resultados													
7. Escritura y publicación de resultados													

1

## 7. PRESUPUESTO

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
<b>A. Personal</b>				
Tesista	Unit	12	323,8	3885,6
<b>B. Recursos variables</b>				
<b>B.1 Materia Prima</b>				
Chocho	Kg	1	3	3
Quinua	Kg	1	3	3
Amaranto	Kg	1	3	3
Sangorache	Kg	1	3	3
<b>B.2 Reactivos</b>				
Estándar de ácido fítico (Phytic acid sodium salt)	g	25	136	136
Acido clorhídrico	L	2	48,95	97,9
Hidróxido de sodio	g	250	0,25	62,5
Cloruro férrico hexahidratado	g	50	0,31	15,5
Acido sulfalacídico	g	50	1,71	85,5
Bicarbonato de sodio	g	250	0,095	23,75
Acido picnilsulfónico (Acido trinitrobencensulfónico)	ml	6	11,54	69,24
Eter etílico	L	3	14,75	44,25
Cloruro de sodio	g	300	0,14	42
Estándar de lisina (L-lisina monoclorohidrato)	g	1	0,45	0,45
Buffer PIPES	g	350	0,95	332,5
$\alpha$ -amilasa de Bacillus licheniformis	KU	2*500	93,4	186,8
Bilis	g	300	2,49	747
Pancreatina	g	50	2,22	111
Peptidasa	Unit	50	15,8	790
Pepsina	g	50	2,4	120
Tripsina	g	1,5	155,8	233,7
$\alpha$ -chymotripsina	g	1	164,4	164,4
Acido nítrico	L	2,5	59,52	148,8
Acido perclórico	L	2,5	218,4	546
Proteínas (38 muestras)	muestras	30	5,6	168
Minerales (38 muestras)	muestras	30	14	420
<b>B.4 Equipos</b>				
Kit Determinación de ácido fítico	Unit	1	500	500
<b>B.3. Materiales de Oficina</b>				
Cartucho para Impresora	Unit	2	35	70
CD - RW	Unit	4	1,5	6
Papel	Hojas	1500	0,03	45
<b>C. Publicación</b>				
Tesis	ejemplar	8	10	80
<b>SUBTOTAL</b>				9143,89
Imprevistos 5%				457,1945
<b>TOTAL</b>				9601,0845
<b>FUENTE DE FINANCIAMIENTO</b>		FONDOS FISCALES(59,52)		5715,4845
		TESISTA (40,74)		3885,6

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Binaghi, M.; López, L.; Ronayne, P.; Valencia, M. 2007. *Revista chilena de nutrición*. Evaluación de la Influencia de distintos Componentes de la Dieta sobre la Biodisponibilidad Potencial de Minerales en Alimentos Complementarios. *Rev Chil Nutr*. Vol. 34, N°1.
- FAO. 2002. Informe la agricultura en el mundo: hacia 2015/2030, evaluación de la FAO, desarrollo a largo plazo de la alimentación, la nutrición y la agricultura en 1995, 1988, 1981 y 1970.
- Haug, W.; Lantzsch, J. 1983 *Sci. Food Agric.*, No 34, pp. 1423-1426.
- Keshavarz, K.; 1998 Further investigations on the effect of dietary manipulation of protein, phosphorus and calcium for reducing their requeriments for laying hens. *Poultry Sci*. 77, pp. 1333-1346.
- Martínez, B.; Ibáñez, M. y Rincón, F. 2002. Acido fítico: Aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. En: ALAN–Archivos latinoamericanos de nutrición: Órgano oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición. Vol.52, No. 3. pp. 219 – 231.
- Mazza, G. 2.000 Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza, España. Acribia. p. 292-307.
- Montatixe, G. 2005. Método multienzimático para determinación de la digestibilidad de la proteína. Tesis, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp 82-82
- Nys, Y.; Barrier, B.; 1995. Calcium and phosphorus in poultry nutrition. 1ères *Journées de Recherches Avicoles*. Angers. France. p 22
- Peralta, E.; Mazón, N.; Murillo, A.; Rivera, M.; Monar, C.; 2009. *Manual agrícola de granos andinos*. Segunda impresión, No 69. Quito – Ecuador: Pág. 2.
- Reddy, N.; Balakrishnan, C.; Salunkhe, D. 1982. Phytates in legumes. *Adv. Food Res*, pp. 1-92.
- Robinson, C. 1989. *Fundamentals of normal nutrition*. Third Ed. Philadelphia, USA. Macmillan Publishing Co., pp 110-114.
- Sotelo, A.; Mendoza, J.; Argote, R. 2002. Contenido de Acido Fítico en Algunos Alimentos Crudos y Procesados. Validación de un Método Colorimétrico. *Journal of the Mexican Chemical Society*. Monterrey, México
- Valencia, S.; Barrera, R.; López, J.; Rúales, J. 2001. Determinación de factores antinutricionales en raíces y tubérculos andinos. *Acta científica Ecuatoriana*. Vol. 7, No 2.; Ambato – Ecuador. Pág. 29.
- Wyatt, C. y Triana, A. 1994. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca, and phytates in foods commonly consumed in Northern Mexico. En: *J. Agric. Food Chem*. Vol.42. pp. 204 - 209.
- Zhou, J. y Erdman, J. 1995. Phytic acid in health and disease. En: *Food Sci. Nutr*. Vol.35. pp. 495 - 508.

## ANEXOS

### MÉTODOS DE EVALUACIÓN

#### ANEXO 1.

##### VALORACIÓN DEL ÁCIDO FÍTICO POR EL MÉTODO DE FRÜHBECK.

**SOTELO A.; MENDOZA J., ARGOTE R. 2002.** Contenido de Acido Fítico en Algunos Alimentos Crudos y Procesados. Validación de un Método Colorimétrico. Journal of the Mexican Chemical Society.

Se pesa el alimento (que debe contener menos del 5% de grasa), se agregan 20 mL de HCl (0.65 N) para llevar a cabo la extracción. El pH de la mezcla debe estar entre 0 y 1. Esta mezcla se somete a agitación vigorosa durante dos horas a temperatura ambiente. El extracto obtenido se transfiere cuantitativamente a unos tubos para centrifugarlos a 17300 G. Una vez transcurridos 30 minutos se recolecta el sobrenadante, y se toma una alícuota la cual se diluye con agua desionizada. Se recomienda la dilución 1:25 para alimentos que contengan 1% o mas de ácido fítico y la dilución 5:25 para contenidos menores. El pH se ajusta a un valor de 6.0 con solución de NaOH 1N y luego se toman 10 mL de la alícuota diluida que se transfirieron cuantitativamente a la columna de resina de 8 mm x 65 mm (AG1-X8, 200-400 mesh, 0.5 g, Bio Rad No 140-1451). El lavado de la columna se lo hace con 15 mL de NaCl 0.7 N. El fitato se eluye con 15 mL de NaCl 0.7 N y se recolecta el extracto purificado. Se toman 3 mL de agua desionizada (usando como blanco), o bien 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio (Sigma Co) cuyo contenido es de 5 a 50 ug / mL en agua desionizada) o bien, los extractos purificados a través de la columna a los que previamente se les ajusta el pH a 3 y se les adiciona 1 mL de reactivo de Wade: 0.03 % de FeCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O (Sigma Co) mas 0.3 % de ácido sulfoalícíclico disueltos en agua desionizada. Después de la agitación en un vórtex durante 5 segundos y se lee la absorbancia a 500 nm.

#### ANEXO 2.

##### BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES.

**BINAGHI M., LÓPEZ L., RONAYNE DE FERRER P., VALENCIA M. 2007.** Revista chilena de nutrición. Evaluación de la Influencia de distintos Componentes de la Dieta sobre la Biodisponibilidad Potencial de Minerales en Alimentos Complementarios. Rev Chil Nutr Vol. 34, N°1.

La dializabilidad de los minerales (D%) como un indicador de la biodisponibilidad potencial fue determinada por medio del método in vitro de Miller (4), modificado por Wolfgor y Cols. (5). El procedimiento involucra una digestión enzimática en condiciones que simulan las fisiológicas. Cada muestra se homogeneiza para facilitar su posterior análisis. Alícuotas de 50 g de los homogeneizados se incuban con 5 ml de una solución acuosa al 3% de  $\alpha$ -amilasa, durante 30 minutos a 37° C con agitación. Luego, el pH se ajusta a 2 con solución valorada de HCl 6N, y se agregan 1,6 mL de pepsina-HCl (16 g/100 ml en HCl 0,1N), incubándose la mezcla a 37° C durante dos horas, con agitación

(digestión estomacal). Dos alícuotas de 15 g del digerido se colocan en erlenmeyers con bolsas de diálisis (Spectrapore Molecular Weight cut-off 6000-8000) conteniendo 18,75 ml de buffer PIPES 0,15 M y pH variable. El pH del buffer a utilizar se establece luego de hacer ensayos previos en base a la matriz alimentaria en estudio (6), para obtener un pH final uniforme de  $6,5 \pm 0,2$ , al final de la segunda incubación a 37° C. Después de una hora de incubación, cuando el pH alcanza un valor mínimo de 4,5, se agregaron 3,75 ml de una mezcla de bilis-pancreatina (2,5% bilis y 0,4% pancreatina en NaHCO<sub>3</sub> 0,1N) prosiguiéndose a la incubación durante dos horas a 37° C (digestión intestinal). Las bolsas de diálisis son removidas y enjuagadas con agua ultrapura y los dializados se transfirieron a tubos tarados y se pesan. Los minerales dializados se determinan por espectroscopia de absorción atómica.

El contenido total de minerales de las muestras se determina en el digerido de pepsina por espectroscopia de absorción atómica previa mineralización con una mezcla HNO<sub>3</sub> - HClO<sub>4</sub> (50:50).

La dializabilidad mineral se calcula como el porcentaje del mineral dializado con respecto a la concentración total de mineral presente en cada muestra.

$$\text{Dializabilidad \% del mineral} = \frac{\text{mg de mineral en el dializado} \times 100}{\text{mg de mineral en el digerido}}$$

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y Test de Dunnet a posteriori con  $p < 0,05$ .

### **ANEXO 3.**

#### **DETERMINACIÓN DE LA DIGESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA.**

**MONTATIXE, G. 2005.** Método multienzimático de Hsu et al. (1977). (Adaptado en el Dpto. de Nutrición y Calidad del INIAP).

Procedimiento:

- Se parte de una muestra molida finamente (80 mesh).
- 50 mL de una suspensión acuosa 6,25 mg proteína / mL en un vaso de agua destilada se ajusta a pH 8.0 con 0,1N HCl y NaOH, agitados en un baño de agua a 37 °C por 15 minutos.
- Una solución multienzimática (1,6 mg de tripsina, 3,1 mg de chymotripsina y 1,3 mg de peptidasa / mL) se mantienen en un baño de agua helada y se ajusta a pH 8.0 con 0,1 HCl y NaOH, 5 mL de la solución multienzimática se añade a la suspensión de proteína que estaba siendo agitada a 37 °C, una rápida determinación de pH se realiza inmediatamente. Esto es debido a la liberación de grupos COOH de las cadenas de proteínas por la proteólisis enzimático. El descenso de pH se registra automáticamente durante 10 minutos a 37 °C usando pHmetro.
- La solución multienzimática se prepara frescamente antes de cada serie de pruebas y su actividad se determina usando caseína de digestibilidad aparentemente conocida en vivo.



### **Cálculos.**

$$Y = 210,46 - X18,10$$

Y = digestibilidad in Vitro de la proteína

X = valor del pH después de 10 minutos de digestión con la solución multienzimática.

### **ANEXO 4.**

#### **DETERMINACIÓN DE LISINA DISPONIBLE**

Este método se basa en el sugerido por Kakade y Liener. Como la muestra es mayor que en este método la reproducibilidad es mejor.

Por no disponer del reactivo □ – TNP – lisina, se uso monoclóhidrato de L-lisina dándole en tratamiento correspondiente y haciéndole las correcciones necesarias. Este método determina como lisina disponible aquella que tiene libre el grupo épsilon amino y que es capaz de unirse al ácido trinitrobencensulfónico.

Determinación de la curva estándar:

Pesar 50 mg de lisina-HCl, en un en un matraz con tapón.

Adicionar 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> al 4% (pH 8.5)

Agitar 10 minutos en un baño a 40 °C y con una agitación de 80 r.p.m.

Agregar 10 ml de ácido trinitrobencensulfónico al 0.1 %.

Agitar durante dos horas a 80 r.p.m. y a una temperatura de 40°C.

Agregar 30 ml de HCl concentrado, tapar y poner en autoclave a 115 °C (13lb/pulg<sup>2</sup>) durante una hora.

Enfriar y adicionar 50 ml de agua destilada

Filtrar a través de papel ederol N. 1

Tomar del filtrado una alícuota de 20 ml y extraerla 2 veces con 10 ml de éter etílico cada vez. Eliminar el éter residual poniendo la solución ya extraída en un baño de vapor durante 10 min. De esta alícuota extraída se toman los siguientes volúmenes: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 y se llevan a 10 ml en un matraz volumétrico que contiene 0.05 mg, 0.1mg, 0.15 mg, 0.20 mg, 0.25mg de lisina respectivamente y se leen a 346 nm ajustando a cero con agua destilada.

#### DETERMINACIÓN DE LISINA EN LA MUESTRA:

Pesar 100 mg de la muestra en un matraz con tapa (la muestra molida y pesada a través de una criba de mm (malla No. 20).

Adicionar 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> al 4% (pH = 8.5)

Agitar 10 minutos en un baño a 40°C y a 80 r.p.m.

Agregar 10 ml de ácido trinitrobencensulfónico al 0.1%

Agitar durante dos horas a 40°C y 80 R.P.M.

Agregar 30 ml de HCl concentrado. Tapar y poner en el autoclave a 115 C (13 lb/pulg<sup>2</sup>), durante una hora.

Enfriar y adicionar 50 ml de agua destilada.

Filtrar a través de papel hederlo N.1.

Tomar una alícuota de 10 ml y extraerla 2 veces con 10 ml de éter etílico cada vez.

Eliminar el éter residual poniendo la solución ya extraída en un baño de vapor durante 10 minutos.

Leer la absorbancia a 346 nm ajustando a cero con el blanco.

Comparar con una curva estándar.

#### PREPARACIÓN DEL BLANCO:

En un matraz con tapón poner 10 ml NAHCO<sub>3</sub> al 4% con pH 8.5.

Agitar 10 minutos en un baño a 40 °C con una agitación de 80 r.p.m.

Adicionar 30 ml de HCl concentrado.

Continuar la agitación durante 2 horas.

Adicionar a la muestra 10 ml de la solución de T.N.B.S al 0.1 % e hidrolizar en autoclave 1 hora a 115°C (13 lb/pulg<sup>2</sup>).

Enfriar y adicionar 50 ml de agua destilada y filtrar a través de papel ederol No. 1.

Tomar del filtrado una alícuota de 10 ml y extraerla 2 veces con 10 ml de éter etílico cada vez.

Eliminar el éter residual poniendo la solución ya extraída en un baño de vapor durante 10 minutos.

Leer la absorbancia a 346 nm ajustando a cero con agua destilada.

#### CÁLCULOS:

Para la determinación se hizo una curva estándar con gradiente de concentración desde 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2 de lisina respectivamente, se toman estos valores y no los descritos en la técnica (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, y 0.25) ya que se hace la corrección estequiométrica multiplicando por 0.8, este valor se obtiene al dividir el peso molecular de la lisina/peso molecular del monoclóhidrato de L-lisina.

Se lee en el espectrofotómetro a 346 nm.