

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE EXPANDIDO SOBRE LA
CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN GRANOS DE
Amaranthus caudatus (KIWICHA), VARIEDAD OSCAR BLANCO**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

AUTOR: ZÚÑIGA QUISPE Camilo, Br.

ASESOR: Prof. TORRES GARCIA Luz Azucena, M.Sc.

CO-ASESOR: Prof. CHOQUE QUISPE David, M.Sc.

ANDAHUAYLAS – PERÚ

2014

A Dios por la fortaleza espiritual que en momentos difíciles me incitó a levantarme.

Con gratitud a mis padres Julián Zuñiga Ccente y María J. Quispe Silvera quienes me apoyaron en forma incondicional en mi formación profesional.

A mis hermanos Alfonso, Celia, Roberto, Gregorio, Washington, Richard, Jaime, Yovana, Fredy, Héctor y Edison por alentar para seguir adelante.

PRESENTACIÓN

El amaranto es considerado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una fuente importante de proteínas, por su alto contenido en aminoácidos esenciales. Este trabajo de tesis brinda conocimientos a la comunidad universitaria, acerca de los efectos de la temperatura de expandido sobre la concentración de aminoácidos esenciales en granos de *Amaranthus caudatus* (kiwicha o amaranto); variedad Oscar Blanco, obtenidos de la cosecha de cultivos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), Andahuaylas, Apurímac.

Las muestras destinadas a tratamiento, fueron expandidos en una máquina popeadora dejando las muestras listas para ser transportadas al laboratorio donde se determinaron las concentraciones de aminoácidos esenciales (AAE), mediante la metodología de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Se ha demostrado que los efectos a distintas temperaturas de expandido, el *Amarantus caudatus* (kiwicha); presenta diferencia significativa sobre los tratamientos en el contenido de aminoácidos esenciales. Por esta razón, el presente trabajo permite contribuir a un mayor conocimiento y difusión del mismo acerca de la presencia de aminoácidos esenciales en la kiwicha a diferentes temperaturas; esperando que a futuro se realicen trabajos relacionados en esta temática.

AGRADECIMIENTO

- Al M.Sc. Luz Azucena Torres García y al M.Sc. David Choque Quispe por el asesoramiento de la presente investigación.
- Al Dr. Manuel Octavio Fernández Athó, por la revisión del informe final de tesis.
- Al Químico Jorge Choqueneira Pari, por la orientación profesional para el desarrollo del análisis de las muestras de kiwicha.
- A la Dirección de Investigación, Creación Intelectual y Artística de la Universidad Nacional José María Arguedas, por el cofinanciamiento del presente trabajo.
- Al Laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco por el análisis de las muestras de kiwicha expandida.

ÍNDICE GENERAL

PRESENTACIÓN.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	16
2. MATERIAL DE ESTUDIO	16
3. MÉTODO.....	17
4. DISEÑO ESTADÍSTICO.....	23
CAPÍTULO III: RESULTADOS	25
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS	46

ÌNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Composición química de la kiwicha por 100 g en base húmeda.....	5
Tabla 02: Cantidad calculada de proteína de kiwicha que es necesario ingerir para satisfacer los requerimientos de aminoácidos esenciales en pre-escolares (2 a 5 años de edad).....	9
Tabla 03: Niveles de los aminoácidos de <i>Amaranthus caudatus</i> determinados mediante HPLC.....	10
Tabla 04: Comparación de aminoácidos en la elaboración de expandido tipo snak.....	11
Tabla 05: ANOVA para el DCA.....	23
Tabla 06: Cuantificación de aminoácidos esenciales de la kiwicha.....	28
Tabla 07: Correlación de datos del contenido de aminoácidos esenciales de la kiwicha en función a la temperatura.....	30
Tabla 08: ANOVA de un factor para los aminoácidos esenciales.....	30
Tabla 09: Comparación múltiple de los aminoácidos esenciales mediante el modelo de diferencia mínima significativa (LSD).....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Diagrama de flujo para el procesamiento de popeo o expandido.....	19
Figura 02: Diagrama de flujo para el proceso de análisis cromatográfico-HPLC....	21
Figura 03: Elevación de picos en la Treonina.....	25
Figura 04: Elevación de picos de la Valina y Metionina.....	26
Figura 05: Elevación de picos de Fenilalanina e Isoleucina.....	27
Figura 06: Elevación de picos de la Leucina y Lisina.....	28
Figura 07: Variación del contenido de AAE en función a la temperatura.....	30
Figura 08: Comparación del efecto temperatura sobre los AAE*.....	32

ANEXOS

Anexo 01: Comparación de picos, estándar a 250 pico moles (<i>pmol</i>) vs muestra sin tratamiento de Kiwicha.....	47
Anexo 02: Altura de <i>pmol</i> en blanco de kiwicha.....	48
Anexo 03: Comparación de picos (Blanco, 180 °C, 200 °C y 215 °C).....	49
Anexo 04: Cuantificación de AAE por triplicado.....	50
Anexo 05: Cuantificación de AAE por triplicado.....	51
Anexo 06: ANOVA de la regresión de datos de los AAE.....	52
Treonina.....	52
Valina.....	54
Metionina.....	56
Fenilalanina.....	58
Isoleucina.....	60
Leucina.....	62
Lisina.....	64
Anexo 07: ANOVA de la comparación múltiple.....	66
Anexo 08: Evaluación FISHER – LSD.....	67
Anexo 09: Puntos porcentuales del estadístico del rango studentizado.....	69
Anexo 10: Puntos críticos para la distribución T de Student.....	70
Anexo 11: Proceso de análisis por cromatografía líquida de alta performance (PHLC).....	71

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se determinó el efecto de las temperaturas de expandido (180 °C, 200 °C y 215 °C) sobre la concentración de aminoácidos esenciales en granos de *Amaranthus caudatus* (kiwicha), variedad Oscar Blanco. Las muestras obtenidas fueron previamente tratadas a diferentes temperaturas, obteniéndose el expandido de kiwicha. Posteriormente a este, los granos expandidos se pulverizaron para realizar la hidrólisis de las muestras, permitiendo la lectura de aminoácidos a través de la metodología de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). A través de esta, se determinó las concentraciones de aminoácidos esenciales (AAE) en microgramos (μg), encontrándose una disminución significativa a temperaturas de 180 °C, 200 °C y 215 °C respecto al grupo control (sin tratamiento). Tales aminoácidos esenciales son Treonina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina y Lisina. Consecuentemente los aminoácidos esenciales, sufren una disminución al ser sometidos a elevadas temperaturas, excepto la metionina manteniendo una disminución en la concentración no significativa.

Palabras claves:

Amaranthus caudatus (kiwicha), aminoácidos esenciales, expandido, concentración, temperatura.

ABSTRACT

The effect of expanded temperatures (180 °C, 200 °C and 215 °C) on the concentration of essential amino acids in grains of *Amaranthus caudatus* (kiwicha), Oscar Blanco variety was determined. The obtained samples were pretreated at different temperatures to give the expanded kiwicha. Subsequent to this, the expanded grains were sprayed to achieve hydrolysis of the amino acids, allowing the reading of amino acids through the methodology of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Through this, the concentrations of essential amino acids (EAA) in micrograms (ug), finding a significant decrease at temperatures of 180 ° C, 200 ° C and 215 ° C compared to the control group (no treatment) was determined. These essential amino acids are Threonine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Isoleucine, Leucine and Lysine. Consequently the essential amino acids, suffer a decrease when subjected to high temperatures, but maintaining methionine no significant decrease in the concentration.

Key Words:

Amaranthus caudatus (kiwicha), essential amino acids, expanded, concentration, temperature.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La escasa nutrición calórico proteica, es uno de los problemas más graves del mundo, presentándose en los países en vías de desarrollo, especialmente en aquellos más pobres, donde se encuentra ubicado el Perú, siendo la población infantil la más perjudicada, derivado de una insuficiente ingestión de nutrientes mayores, como son proteínas, carbohidratos y grasas; y en ese contexto del estado nutricional de los grupos más vulnerables, como son los niños, ancianos y madres gestantes en los estratos económicos menos favorecidos. Una de las posibilidades para superar la mala nutrición, consiste en hacer llegar a grupos nutricionalmente vulnerables, alimentos de alto valor nutritivo, bajo costo y que en lo posible satisfaga sus hábitos de consumo. Esta situación alimentaria difícil, nos obliga a encarar el problema, por lo que es necesaria la explotación nacional de nuestros productos agrícolas típicos, desarrollando tecnologías apropiadas para obtener mezclas vegetales, estables en la conservación y de alto contenido calórico proteico. En la antigüedad se cultivaba desde el año 5000 a.C. aproximadamente, esta planta es originaria de México luego fue trasladada a otros países. Los incas y los mayas la consideraban como un cultivo de alto rendimiento y de alto poder curativo. Esta planta crece en suelos pobres y ricos, en climas fríos y tropicales de Asia, África, América central y América del sur. Lo extraordinario de la proteína del amaranto es su riqueza en aminoácidos esenciales incluyendo la lisina y la metionina, los cuales como es bien sabido tienen una proporción que limita el valor biológico de los cereales. La eficiencia proteica es comparable con la caseína. Las proteínas difieren en valor nutritivo debido a las diferencias en la clase y cantidad de sus aminoácidos constitutivos. La lisina es el

primer aminoácido limitante en los cereales. La proteína de la kiwicha contiene niveles relativamente altos de lisina (50%) casi el doble del trigo y tres veces más que el maíz y contenidos de aminoácidos azufrados (4,4%) en comparación a los granos más comunes. En los tres cultivos andinos, quinua, kañihua y kiwicha, se destaca el alto contenido de lisina, el aminoácido limitante en los cereales comunes. La FAO ha señalado que una proteína es biológicamente completa cuando contiene todos los aminoácidos esenciales en una cantidad igual o superior a la establecida para cada aminoácido en una proteína de referencia o patrón. Todas las especies de ***Amaranthus*** tienen un contenido proteico alto y su composición en aminoácidos esenciales bastante bien balanceada. La digestibilidad proteica de la kiwicha es alta, 88%. La kiwicha variedad Oscar Blanco, fue lanzado al mercado después de su mejoramiento genético mediante una selección individual, a partir de la entrada CAC-038, cuyo material genético fue colectado en la provincia de San Lorenzo, Bolivia. Su fruto, es una cápsula pequeña denominado pixidio, unilocular de color rosado claro, en la madurez se abre transversalmente dejando caer la parte superior llamado opérculo, por la que cae con facilidad la semilla. La semilla es lisa de color blanco crema, de 1 mm de diámetro promedio, siendo el contenido de proteínas de 16 % (Álvarez et. al, 2010). La kiwicha tradicionalmente se siembra en los valles interandinos zona "quechua", zona ecológica ubicada entre 2700 - 3500 m.s.n.m. crece al igual que el maíz en la Costa, Sierra y Selva hasta los 3000 m.s.n.m. a diferencia del maíz se necesita menos cantidad de agua para su riego. Los primeros estudios agronómicos se iniciaron en la Universidad del Cusco, entre 1973 a cargo del Ing. Oscar Blanco y recibieron mayor impulso en la década del ochenta, gracias al entusiasmo del Ing. Luis Sumar, emprendiéndose una gran campaña para su fomento en 1984 (Higinio 2011).

La kiwicha es una especie anual, parecida en su forma a la quinua, que alcanza gran desarrollo y elevada altura en algunos casos hasta 2.60 metros. El ***Amaranthus caudatus*** (kiwicha) tiene su origen en los andes de América del Sur; esta especie crece en zonas de Bolivia, Perú y Argentina. Su altura es generalmente de 1.50 a 2.0 metros. En la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, han coleccionado distintas variedades de la especie para construir un banco de germoplasma que incluye variedades del Perú, Bolivia y Argentina. Hasta el momento se han desarrollado dos variedades: Noel Vietmeyer y Oscar Blanco. La kiwicha tiene características nutricionales únicas, con los mayores valores nutritivos que la leche, la carne y los huevos. Tiene aminoácidos esenciales como: lisina, metionina y cisteína. La lisina es el factor primordial para el desarrollo orgánico y mental del hombre. Además tiene un alto contenido de proteínas y minerales. El principal carbohidrato contenido en el grano de kiwicha es el almidón, el cual representa el 62-69 % del total de carbohidratos. Las características del almidón de los amarantos son distintas de las del trigo; el almidón del amaranto contiene considerablemente menos amilosa (5-7 %) que el almidón del trigo. Así la capacidad del Amaranto para hincharse cuando se mezcla con agua es mucho más bajo que la del trigo (Malca, 2001).

Las semillas del amaranto contienen de 13 a 18 % de proteínas cruda. Las semillas negras de ***A. caudatus*** tiene contenidos de proteína cruda más alto que las semillas de colores más claros. Los análisis de composición indican que los contenidos de proteína cruda, grasa, fibra y ceniza del amaranto son generalmente más altos que en otros cereales (Mapes, 2009).

La semilla de la kiwicha contiene aproximadamente 11.1 % de proteínas en promedio y se puede comparar con semillas convencionales como el maíz con 13.8 %, arroz 11.7 %, trigo 12.5 %. El contenido de la grasa es relativamente alto 7.7 %, sin

embargo este valor es mucho menor que en algunas leguminosas consumidas como la soya con un valor 20.14 %. Los análisis de composición indican que los contenidos de proteína cruda, grasa, fibra y cenizas de la kiwicha son generalmente altos que en los cereales, sin embargo el contenido de carbohidratos es bajo (Silva, 2007).

Los granos andinos (quinua, cañihua y amaranto) son uno de los principales sustentos de las familias campesinas, y con muchas perspectivas en el mercado regional y nacional. Con la finalidad de realizar los aspectos productivos y de agroindustria de estos cultivos, se ha implementado una serie de actividades que permiten el desarrollo con diferentes instituciones estatales y privadas, organización de productores y transformadores agroindustriales que están involucrados y comprometidos con el desarrollo y transformación de los granos andinos en mención; en muchos casos se han desarrollado trabajos de investigación que contribuirán a un mejor conocimiento del uso y transformación (Valdivia, 2002).

En el Perú, la especie que más se cultiva es el ***Amaranthus caudatus***, conocido como “kiwicha”, la cual es una planta de aprovechamiento integral; sus hojas se consumen como verdura, mientras que las semillas son usadas como cereales. Su contenido de proteína cruda oscila entre 13 y 17 %, es relativamente rica en lisina, triptófano, metionina y pobre en leucina e isoleucina. Esto hace que el grano de amaranto sea un excelente complemento para los cereales (arroz, maíz, trigo), los cuales son deficientes en lisina. Las proteínas de almacenamiento más importantes en amaranto son albúminas y globulinas, que representan entre 60 y 70 % del nitrógeno proteínico total en el grano, y las glutelinas, que se hallan en menor porcentaje. Existe mucho interés por el estudio de estas proteínas, no solo por su reconocido valor nutricional, sino también por ciertas características que permiten su aplicación en otros campos. Tal es el caso de la globulina, que es un excelente agente emulsificante,

estable al calor. Se ha hecho estudios de composición de aminoácidos y patrones electroforéticos de las fracciones proteicas totales presentes en el grano (albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas), así como de perfil de carga, asociación covalente de subunidades y estudios calorimétricos y electroforéticos (Villanueva, 2007).

Proteínas.

Las proteínas son los elementos más importantes dentro de los alimentos por tal motivo el organismo humano necesita el consumo diario de estos compuestos a través de los alimentos. Las proteínas presentan una estructura muy compleja por ese motivo puede mostrar un comportamiento extraordinariamente dispar. Sin duda, este aspecto tiene que ver con las altas masas moleculares, a lo que hay que añadir que las proteínas no se componen a partir de una única sustancia original, como sucedía con el almidón y la celulosa, sino que están formadas a partir de 20 aminoácidos distintos. Las proteínas se muestran muy sensibles a los ácidos base o diluidos pueden provocar una floculación, porque modifican la distribución de las cargas de los grupos aminos o carboxilos. Dado que los enlaces covalentes no se ven afectados por este hecho sino que únicamente se esperan alteraciones en los enlaces de las cadenas laterales (Baltes, 2006).

Tabla 01: Composición química de kiwicha por 100 g en base húmeda

Componentes	<i>Amaranthus caudatus</i>
Humedad (g)	12.4
Proteínas (g)	12.50
Grasa (g)	7.15
Carbohidratos (g)	63.49
Fibra (g)	1.90
Ceniza (g)	2.32

Fuente: Collazos, 1996

La velocidad de pérdida de aminoácidos sobre una base molar, suele ser menor que la pérdida de azúcares. Las reacciones con proteínas son esencialmente las mismas; las aldosas y las cetosas se condensan con grupos aminos libres de las proteínas (grupo ϵ -amino de la lisina, grupo amino terminales). En presencia de compuestos dicarbonílicos, los aminoácidos se descarboxilan, esta reacción conocida bajo el nombre de degradación de Strecker, da como resultado la desaminación y la descarboxilación del aminoácido, que pasa a aldehído. Mediante el empleo de trazadores isotópicos, se ha demostrado que entre el 90 y el 100% de CO_2 expelido durante la reacción de Maillard se origina partir del aminoácido y no del azúcar (Braverman, 1980).

Desnaturalización.

La desnaturalización desencadenada de las proteínas por los ácidos y bases es a menudo reversible que se producen por acción de ciertas soluciones orgánicas (alcohol etílico). El frío extremo, sobre todo el calor extremo, tiene un efecto altamente desnaturalizante; en este proceso no solo la temperatura es importante, sino que el tiempo de calentamiento también constituye un parámetro esencial. Por regla general, la desnaturalización por calor sucede a unos 60-80°C, aunque cabe contar que las proteínas poseen distintas resistencias al calor, producto de su estructura y su composición. A estas temperaturas no es habitual que se produzcan alteraciones químicas por lo que refieren a la composición de las proteínas. La desnaturalización causa una modificación de las características físicas que pueden repercutir de forma importante en el proceso posterior de los productos. La desnaturalización también modifica la digestibilidad de las proteínas, puesto que la formación de las estructuras al azar puede dar lugar a zonas resistentes a la acción de enzimas (Baltes, 2006).

Las proteínas sufren varios cambios químicos durante su proceso a temperaturas elevadas. En estos cambios, cabe citar la racemización, la hidrólisis, la desulfuración y la desamidación de algunos aminoácidos. La mayor parte de estos cambios químicos son irreversibles y algunas de estas reacciones dan por resultado aminoácidos potencialmente tóxicos. El tratamiento térmico de las proteínas a pH alcalino, como se lleva a efecto para la preparación de alimentos, invariablemente conduce a la racemización parcial de los L-aminoácidos a los D-aminoácidos. Las proteínas sufren cambios sutiles de la estructura, que no se alteran drásticamente la arquitectura molecular de una proteína, suelen considerarse como “adaptabilidad conformacional”; en cambio, las modificaciones más importantes de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, sin escisión de los enlaces peptídicos del esqueleto, se consideran una “desnaturalización”. Dependiendo a las condiciones de desnaturalización, las proteínas pueden hallarse en diversos “estados desnaturalizados” que difieren ligeramente en energía libre. monoméricas exhiben perfiles de desnaturalización. Los términos de los estados nativo (γ_N) y estado desnaturalizado (γ_D) de una proteína. Por la mayor parte de las proteínas, a medida que aumenta la concentración de desnaturalizante (temperatura) el valor de γ permanece inicialmente constante y cambia de una forma abrupta por encima de un punto crítico, de γ_N a γ_D en un rango estrecho de concentración de desnaturalizante o de temperatura. Una vez que una molécula proteica empieza a desplegarse, o una vez que se han roto unas pocas interacciones, un ligero incremento de la concentración del agente desnaturalizante o de la temperatura despliega por completa la totalidad de la molécula. En la región de transición, donde se encuentran algunos estados desnaturalizados poseen más estructura plegada residual que otros. Las proteínas globulares, cuando están completamente desnaturalizadas, adquieren una configuración semejante a un

enrollamiento al azar. Cuando se miden los cambios de una propiedad física o química, en función de un agente desnaturizante o de la temperatura, muchas proteínas y moléculas de proteínas en estado nativo y en estado desnaturizado, el valor de γ viene dado por:

$$\gamma = f_N \gamma_N + f_D \gamma_D \quad (1)$$

f_N y f_D : son fracciones de la proteína que se encuentran en los estados nativos y desnaturizado.

γ_N y γ_D : valores para los estados nativo y desnaturizado

$$f_N = (\gamma_D - \gamma) / (\gamma_D - \gamma_N) \quad (2)$$

$$f_D = (\gamma - \gamma_N) / (\gamma_D - \gamma_N) \quad (3)$$

(Fenema, 2000).

Dentro de los aminoácidos esenciales podemos considerar: a) Lisina: Es importante, dada la existencia de los grupos amino. La reacción selectiva de uno u otro grupo es posible la acilación selectiva del grupo ϵ -amino de la lisina por transformación del complejo Cu^{2+} , b) Metionina: Se oxida a sulfona vía sulfóxido esta reacción ocurre durante el proceso de elaboración de los alimentos produciéndose la pérdida de este aminoácido esencial y c) Cisteína: Se transforma por oxidación suave hexacianoferrato de potasio en el disulfuro de cistina. Con NaBH_4 o con el tioleno conocido como mercaptometanol o ditriol (Belitz *et.al*, 2012).

La kiwicha es un grano andino cuyo valor nutritivo es casi similar al de alimentos como carne, el pescado y huevo, ya que en su coeficiente de proteínas se encuentra dentro de un rango de 1.5 a 2 (corregido a la caseína de 2.5%) para el grano cocido y su

digestibilidad total es cercana al 90%. La proteína de la kiwicha con un valor biológico de 75 se acerca más que cualquier otra proteína de alimentos (Ruiz, 2002). La kiwicha autoclavada fue de 2.3 valores que representan un porcentaje ligeramente menor con relación a la caseína de la relación de eficiencia de proteína de 2.5. La calidad de una proteína depende de la concentración de aminoácidos esenciales y la digestibilidad de la proteína. Si al evaluar ambos factores están en menos del 100% significa que debe corregirse el aporte de proteína, aumentando su cantidad para compensar la menor utilización biológica (Ayala, 2007).

Tabla 02: Cantidad calculada de proteína de kiwicha que es necesario ingerir para satisfacer los requerimientos de aminoácidos esenciales en pre-escolares (2 a 5 años de edad).

Aminoácidos	Contenido de aminoácidos en proteínas (mg/g)
Isoleucina	52
Leucina	46
Lisina	67
Metionina	35
Fenilalanina	35
Treonina	51
Valina	45

Fuente: Ayala, 2007

El Amaranto tiene un alto nivel de lisina, el cual se encuentra limitados en muchos cereales, como el maíz, sorgo y trigo. Por esta razón, el grano de amaranto es un excelente complemento para los cereales (Bressani, 1991).

La elaboración de productos expandidos mediante el empleo de extrusores presenta grandes ventajas, puesto que no utiliza grasa durante la cocción, el producto *snack* mantiene las propiedades químicas de la materia prima, emplea menor cantidad de materia prima que otros procesos alternativos y sobre todo es un método rápido. Sin embargo, el proceso de extrusión eleva la temperatura, por lo cual puede degradar los componentes. Por otro lado, el producto final es de buena calidad y de bajo costo (Sandoval, 1993). El proceso de expandido es someter una sustancia a humedad, presión y temperatura para gelatinizar la parte de almidón. Una vez expandida, se logra incrementar su volumen mediante una gran reducción de la presión (<http://www.fao.org/docrep/005/y1453s/y1453s05.htm>).

La composición de aminoácidos de la harina deslipidada (sin contenido de lípidos), de la fracción de albúmina y de la proteína, hay un aumento en el contenido de los aminoácidos esenciales lisina, fenilalanina y leucina. Y una disminución en los aminoácidos azufrados metionina, en la proteína purificada, con respecto de la harina deslipidada y a la fracción albúmina (Villanueva y Arnao, 2007).

Tabla 03: Niveles de los aminoácidos de *Amaranthus caudatus* determinados mediante HPLC

Aminoácidos	Harina deslipidada (moles %)	Fracción albúmina (moles %)
Treonina	5.26	7.22
Valina	4.34	6.33
Metionina	5.11	4.56
Isoleucina	4.68	5.21
Leucina	4.81	5.92
Fenilalanina	3.12	2.27
Lisina	1.55	2.66

Fuente: Villanueva y Arnao, 2007

Expandido de kiwicha

El expandido del *Amaranthus caudatus*, una variedad ecuatoriana. Un popeado por aire caliente se utiliza para estudiar el efecto de la temperatura (200, 220 y 240 °C), el flujo de aire (0.013; 0.014 y 0.015), carga (14, 18 y 22) y contenido de humedad (12, 14 y 16 %) en la capacidad de estallido natural del grano de amaranto. Todo tratamiento de combinación derivada de los tres niveles de temperatura, carga, flujo de aire y la humedad contenidos fueron eficaces para alcanzar rendimientos de grano de amaranto por encima de 75 %, el volumen de expansión cerca de 5 veces mayor que el volumen de grano en bruto, las densidades tan bajo como 0.178 g/cm, tiempos de residencia no más de 31.60 segundos. Sin embargo, el mayor rendimiento y la expansión volumen y la densidad más baja del grano apreciado se obtuvieron a 240 °C, carga de 22 g y 0.013 cm y 12 % de contenido de humedad (Janvekar, 2010).

Con el grano reventado de la kiwicha se preparan turrone, así como también harinas además se preparan hojuelas, etc. De acuerdo al aminograma y computo químico del *Amarantus* (g/16gN).

Tabla 04: Aminograma y cómputo químico de *Amaranthus* (g/16 gN)

Aminoácidos	<i>Amaranthus caudatus</i>	
	a	a.1
Isoleucina	3.5	3.2
Leucina	5.4	5.4
Lisina	6.4	6.0
Fenilalanina	7.2	6.4
Metionina	4.8	6.1
Treonina	3.6	3.3
Valina	4.6	3.8

Fuente: Higinio, 2011

En la elaboración de productos expandidos tipo “snak” el almidón no solo pierde estructura cristalina sino también la mayor parte de la estructura granular desaparece y los componentes del gránulo (molecular de amilosa y amilopectina), son dispersados en la matriz; en la elaboración de proteínas texturizadas, las proteínas (o cuerpos proteicos) son dispersadas y las reacciones proteicas desnaturalizadas, alineándose en las corrientes de flujo.

Fuente: (<http://tecgranosysemillas.files.wordpress.com/2013/05/desarrollo-de-alimentos-precocidos-por-extrusion-a-base-de-maiz-leguminosa.pdf>)

Muchos avances tecnológicos han sido realizados en el transcurso de los años en los equipos utilizados en la expansión, buscando obtener mayores rendimientos durante el proceso, aumentar la capacidad de producción, disminuir la intensidad del ruido ocasionada durante la liberación del producto, etc. Sin embargo el principio de expansión de los granos sigue siendo el mismo. Tanto es así que en algunos países como Perú y Brasil utilizan ampliamente cañones manuales para la elaboración de cereales expandidos a pequeña escala. Los cereales representan una fuente económica de nutrientes, principalmente carbohidratos y proteínas. Durante el proceso de expansión se mejora la digestibilidad de estos granos y además se observa un incremento del porcentaje de las proteínas por la pérdida de humedad. Por esta razón este tipo de productos tiene gran importancia en la alimentación humana. Dentro de este contexto los cereales expandidos representan una gran opción de alimento, principalmente para los niños (Paggi, 2003).

El grano de amaranto es un pseudo cereal y una buena fuente potencial de nutrientes, el interés por el grano de amaranto se basa en su capacidad de explosión o expandido. El potencial del grano reventado como un ingrediente en productos de aperitivos alimenticios tales como: “alegrías” de México, “turrónes de Perú”, “nigua y

alboroto de Guatemala”, etc. En este tipo de productos, grano reventado se aglomera con miel, melaza y jarabes. La importancia de ofrecer una buena fuente de proteínas y energía en los cereales, que los niños y los adolescentes tengan preferencia por este tipo de productos. Sin embargo como ocurre en muchos bocadillos, la oxidación de los lípidos y la pérdida de textura crujiente son los principales aspectos que reducen la vida útil del grano de amaranto reventado (Lara *et. al*, 2004).

Durante el proceso de expandido ocurren cambios en la estructura micro y macromolecular del almidón, se incrementa la relación área superficial/volumen de la fase sólida, hay una modificación de la cristalinidad del almidón por efecto de la gelatinización, gelación y rompimiento de las cadenas de amilasa y amilopectina (Villacrés *et. al*, 2011).

El amaranto se revienta en condiciones muy calientes y se convierte en un producto expandido con alto contenido nutritivo, con 15 a 18 % de proteína y presencia de lisina y metionina, alto contenido de fibra, calcio, hierro y vitaminas A y C. El balance aminoacídico está cercano al requerido para la nutrición humana y su aminoácido más limitante es la leucina que permite que la proteína de ***A. caudatus*** se absorba y utilice el 70 %, cifra que asciende hasta el 79% según las variedades (Ochoa, 2012).

En los últimos años el análisis de aminoácidos libres se ha extendido a diferentes productos alimenticios y nutricionales, ya sea porque resultan indicadores del proceso tecnológico empleado en la elaboración, o porque se trata de productos que han sido fortificados para satisfacer requerimientos nutricionales específicos, entre otras razones. En general, la metodología predominante para cuantificar aminoácidos presentes en una muestra está basada en técnicas cromatográficas, las cuales se complementan frecuentemente con el uso de un detector de fluorescencia,

tal como la cromatografía en la fase reversa (RP-HPLC) con el uso de agentes derivatizantes (Ramo *et. al*, 2009).

Los niveles de aminoácidos en el grano de ***Amaranthus caudatus*** antes y después del tratamiento térmico, se detectó un alto contenido de lisina y arginina en tanto tratada térmicamente y los granos no tratados, resultó satisfactorio el contenido de cistina y en menores niveles de metionina, valina, isoleucina y leucina. Aparecen los tres últimos aminoácidos como limitantes. Los índices químicos de los aminoácidos esenciales (IAAE). Valor de 90.40 % muestra la calidad nutricional proteico favorable del amaranto, que es casi comparable con la proteína del huevo. El tratamiento térmico por hacer estallar a 170°C y 190°C de 30 g resultó el IAAE a 85.40% de aminoácidos esenciales en estudio, valina y contenido de leucina disminuyeron significativamente (Janvekar, 2010).

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

El **(HPLC)** se encuentra dentro de la cromatografía de elución. En ésta un líquido (fase móvil A) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria B); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf).

El Perú es uno de los países más ricos en biodiversidad alimentaria, en el cual se encuentra ***Amaranthus caudatus*** (kiwicha), uno de los alimentos que tiene relevancia a nivel mundial al igual que la quinua, la importancia que se le da a este producto es

por el potencial nutricional es por ello que en la región de Apurímac se viene intensificando la producción de kiwicha, del mismo modo en la provincia de Andahuaylas se incrementa el cultivo de este cereal por presentar una fuente de economía para las familias. Es por ello que el trabajo de investigación busca determinar el efecto de las temperaturas de expandido (180 °C, 200 °C y 215 °C) sobre la concentración de los aminoácidos esenciales en los granos de **Amaranthus caudatus** (kiwicha), variedad Oscar Blanco, cuantificar la presencia de aminoácidos esenciales en el **Amaranthus caudatus** (kiwicha) de la variedad Oscar Blanco, sometida a expandido a las temperaturas de 180 °C, 200 °C y 215 °C y comparar el nivel de los aminoácidos esenciales en el **Amaranthus caudatus** (kiwicha), variedad Oscar Blanco sometidos a expansión.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El distrito de Talavera se encuentra ubicado en la provincia de Andahuaylas región Apurímac a una altitud de 2926 msnm y una latitud 13°39'27'' Sur, 73°23'00'' Oeste.

2. MATERIAL DE ESTUDIO

Se utilizaron los granos de *Amaranthus caudatus* (kiwicha) variedad Oscar Blanco, obtenida de la cosecha del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), de la localidad de Chumbibamba, Andahuaylas.

Según Herrera y Montenegro, (2012)

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Tipo: Embryophyta siphonogama

Subtipo: Angiosperma

Clase: Dicotiledoneae

Subclase: Archyclamideae

Orden: Centrospermales

Familia: Amaranthaceae

Género: Amaranthus

Especies: caudatus, cruentus e hypochondriacus

Nombre científico: *Amaranthus caudatus*

Se obtuvo una muestra representativa de un kilo, de la variedad Oscar Blanco. Del cual se sacó una muestra blanca de 100 g, del resto de la muestra se fraccionó en partes iguales, posteriormente fueron sometidos a diferentes tratamientos de temperatura respectivamente 180 °C, 200 °C y 250 °C.

3. MÉTODO

Determinación de aminoácidos esenciales por el Método de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) descrita por Agilent Zorbax Eclipse AAA.

a. Preparación de la muestra

- Se preparó la solución de ácido clorhídrico HCl 6N
- Se pulverizó las muestras de *Amaranthus caudatus* (kiwicha).
- Se pesó 0,1 g cada una de las muestras y se colocó en viales de 20 ml de capacidad.

b. Preparación de aminoácidos estándar.

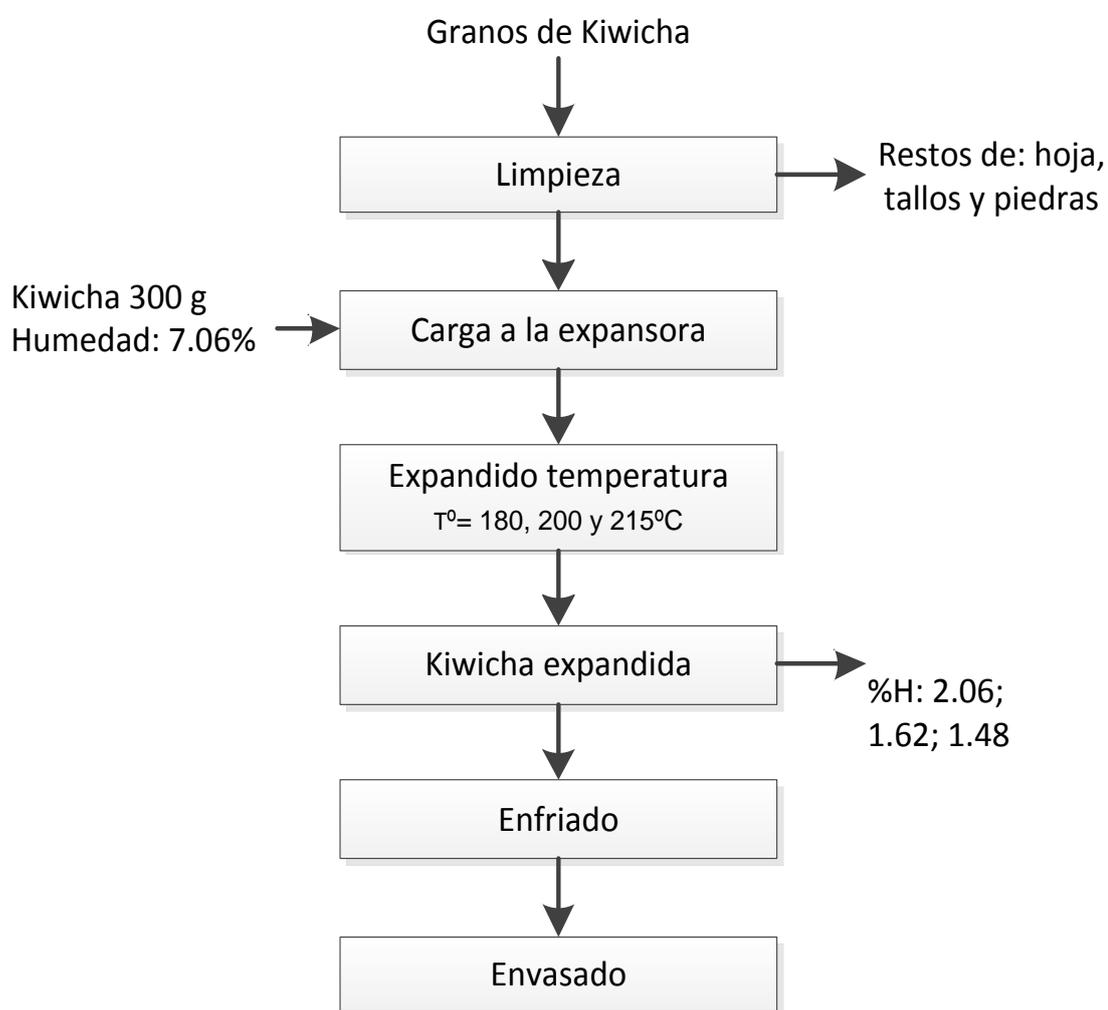
- En un vial se colocó los estándares de aminoácidos (pak de 17 aminoácidos) en las siguientes concentraciones 100 y 250 pmol/ μ l para la cuantificación. Se ha acondicionado el HPLC con la fase A por una hora.
- Se agregó 15 ml de la solución de HCl 6N, en los viales con muestra pulverizada de kiwicha, sellándose en atmosfera inerte con N₂
- Se hidrolizó a una temperatura de 110 °C por 24 horas en una estufa. Una vez enfriado se hizo una dilución de la muestra hidrolizada con agua destilada en una proporción de 3:5 respectivamente, luego fue centrifugado

y pasado por un filtro de 0.45 μm de porosidad, luego se tomó un volumen de filtrado en un vial ámbar y se analiza por el HPLC.

c. Análisis por HPLC

- Las condiciones para el análisis por HPLC, se siguió la metodología descrita por Agilent Zorbax se ha realizado con un cromatógrafo HPLC Agilent 1200 con desgasificador en línea, bomba binaria, inyector automático programable, termostizador de columna, detector por arreglo de diodos DAD.
- La columna que se utilizó Agilent Zorbax Eclipse AAA 3.0 x 75 mm x 3.5 μm , precolumna 12 x 4.6 mm x 5 μm C18, fase móvil A,
- Solvente A: Buffer fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 a pH 7.8.
- Solvente B: Acetonitrilo, metano y agua (45; 45; 10)
- Temperatura de análisis 40 $^{\circ}C$.
- Gradiente de análisis 0.00 a 3.80 min, 0 % de B; a 36 min, 57 % de B; de 37 a 44.60 min 100 % de B, 44.60 a 54 min 0 % de B.
- Detector: se ha realizado a 262 y 336 nm a un flujo de 1 ml/min.
- Tiempo de análisis 55 minutos
- Se derivatizó usando ortoftaldeido (OPA) para los aminoácidos primarios y fluorometilcloroformiato de metilo (FMOC) para los aminoácidos secundarios. La combinación de este protocolo permite un rápido pre-derivatización de aminoácidos. La mezcla de reacción es taponada a pH 10.2, que permite el análisis directo.

Figura 01: Flujo de operaciones para el expandido de la kiwicha



Fuente: Elaboración propia

Descripción de las operaciones de acondicionamiento de las muestras

- **Granos de kiwicha**

La muestra fue obtenida del almacén del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), de un total de 500 Kg, los mismos que se encontraban en sacos de 50 Kg extrayendo 200 g aproximadamente de cada uno de los sacos finalmente se homogenizó las cantidades y se obtuvo 1 Kg de kiwicha, variedad Oscar Blanco.

- **Limpieza**

Esta operación se realizó manualmente para la separación de hojas, tallos, semillas de hierbas, además de se utilizó un tamiz con agujeros de 1mm de diámetro para la eliminación de arenillas.

- **Carga a la expansora**

Se pesaron 300 g de muestra para cada tratamiento, fueron cargados de forma manual en el embuto de la popeadora, con 7.06 % de humedad inicial.

- **Expandido**

Las muestras son expandidos a diferentes tratamientos de temperaturas: 180 °C, 200 °C y 215 °C a una presión de 180 *psi*.

- **Kiwicha expandida**

Los granos de kiwicha son expandidos los cuales presentan un aumento de volumen con una apariencia agradable a la vista, presentando una humedad final de: 2.06 %, 1.62 % y 1.48 % a 180 °C, 200 °C y 215 °C respectivamente.

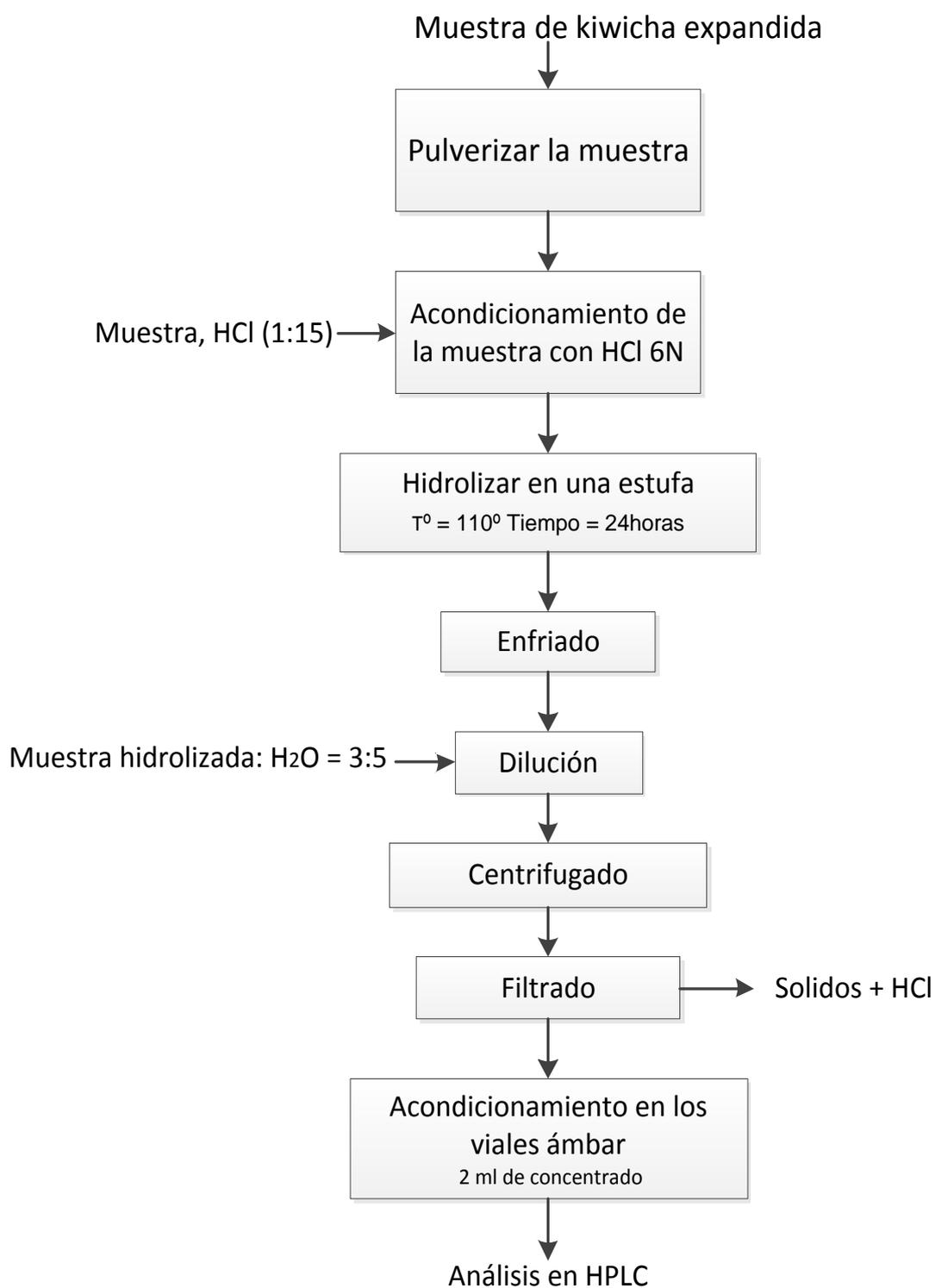
- **Enfriado**

Los granos de kiwicha expandida se dejan por unos minutos a temperatura ambiente de 19.8 °C.

- **Envasado**

Las muestras de kiwicha expandida son envasados en bolsas de polietileno de baja densidad. Posterior al acondicionamiento de las muestras de los granos de kiwicha, los mismos son transportados al Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Química de la UNSAAC.

Figura 02: Flujo de operaciones para el análisis cromatográfico-HPLC



Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC.

Descripción de las operaciones para el análisis de aminoácidos en el HPLC

- **Pulverización de las muestras**

Todas las muestras son pulverizadas en una cantidad de dos gramos por cada tratamiento utilizando un mortero hasta obtener una harina fina.

- **Acondicionamiento de la muestra**

La muestra pulverizada es diluido con HCl 6N, en los viales de 20 *ml*. En una proporción de 1:15 respectivamente, finalmente se selló los viales en atmosfera inerte.

- **Hidrólisis**

Se realiza en una estufa a una temperatura de 110 °C por 24 horas.

- **Enfriado**

Es expuesto a temperatura ambiente para un enfriado lento.

- **Dilución**

Una vez enfriado se toma 3 *ml* de la muestra hidrolizada y se deposita en un tubo de ensayo al que se le adiciona 5 *ml* agua destilada.

- **Centrifugado y filtrado**

La dilución fue centrifugada a 94000 *rpm* por 10 minutos con la finalidad de separar la materia líquida del sólido el que posteriormente se filtró obteniendo finalmente una concentración de proteínas de la kiwicha.

- **Acondicionamiento en viales de 2 *ml***

La concentración obtenida se alistó en los viales de color ámbar cada uno con 2 *ml*, que se colocaron en la cámara de lectura del HPLC.

- **Análisis de aminoácidos en HPLC**

Se realiza la lectura de los aminoácidos de la kiwicha tomando en consideración con los aminoácidos estándar. Por un tiempo de 55 minutos a una temperatura de 40 °C.

4. DISEÑO ESTADÍSTICO

- **Análisis estadístico**

Los resultados se procesaron estadísticamente mediante el Diseño Completamente al Azar (DCA), porque todas las corridas experimentales se realizaron en orden aleatorio completo. De esta manera, durante el estudio se hicieron en total 9 pruebas, estas se corren al azar, de manera que los posibles efectos se vayan repartiendo equitativamente entre los tratamientos.

Tabla 05: Tabla de ANOVA para el DCA.

ANOVA para DCA					
Variabilidad	SC	GL	CM	F ₀	Valor- p
Variedad	$SC_{trat} = \sum_{i=1}^k \frac{Y_i^2}{n_i} - \frac{Y_{..}^2}{N}$	k - 1	$CM_{trat} = \frac{SC_{trat}}{k - 1}$	$\frac{CM_{trat}}{CM_E}$	p(F > F ₀)
Error	$SC_E = SC_T - SC_{trat}$	N - k	$CM_E = \frac{SC_E}{N - k}$		
Total	$SC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N}$	N - 1			

SC: suma de cuadrados.

GL: grado de libertad.

CM: cuadrado medio.

Para realizar la comparación de los tratamientos, se utilizó el modelo de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) al 5 % de significancia, que debe haber entre dos medias muestrales para considerar que los tratamientos correspondientes son significativamente diferentes. Así cada diferencia de

medias muestrales en valor absoluto que sea mayor que el número LSD se declara significativa.

$$LSD = t_{\alpha/2, (N - k)} \sqrt{\frac{2CM_E}{n}}$$

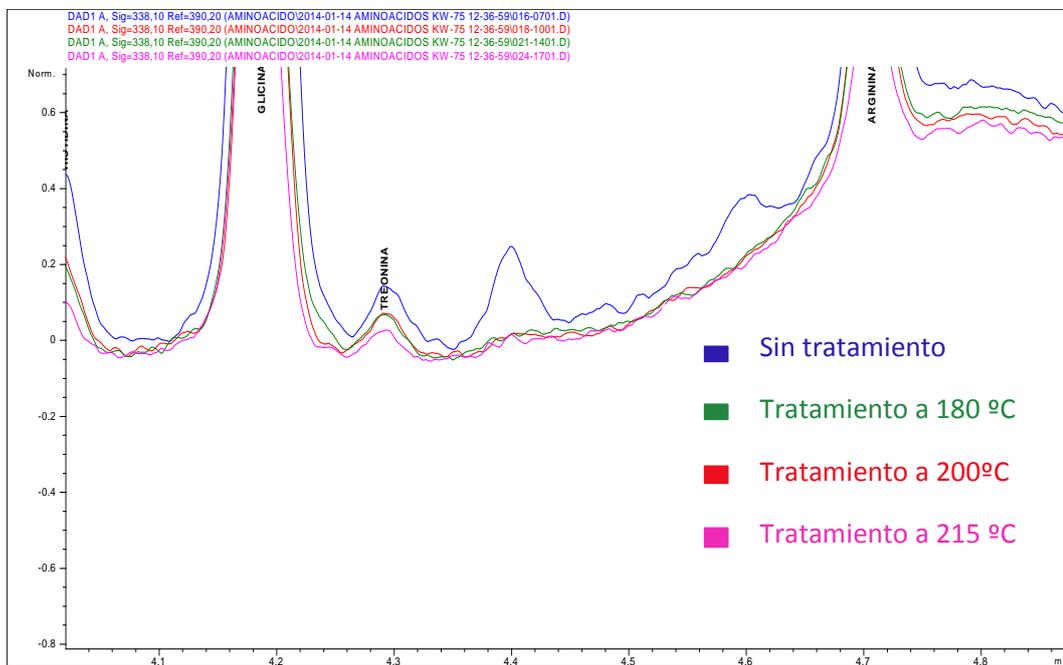
(Gutiérrez, 2008)

CAPÍTULO III

RESULTADOS

1. Evaluación de la concentración de los aminoácidos esenciales de los granos de *Amaranthus caudatus* (kiwicha) reportados por cromatografía HPLC

Figura 03: Altura de picos en la treonina



Norm: Mili unidades de absorbancia

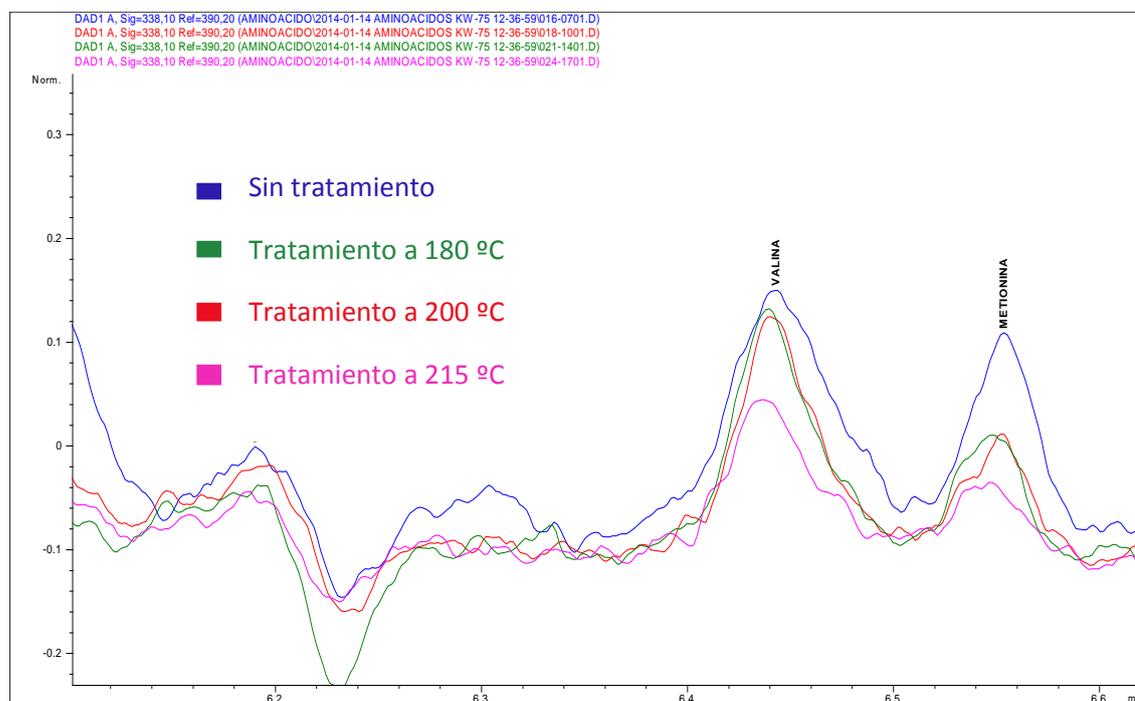
Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, reporte equipo HPLC

A. TREONINA

En la Figura 03, se muestra una altura de pico, los cuales se hicieron una comparación con los resultados de la muestra sin tratamiento, en los resultados de las muestras con tratamientos a 180 °C y 200 °C, se observa que las alturas de picos son similares entre ambos tratamientos; en el caso del tratamiento a 215 °C la reducción en la altura de picos es mayor, esto

indica que a mayor temperatura la concentración de aminoácidos disminuyen considerablemente.

Figura 04: Altura de picos de la valina y metionina.



Norm: Mili unidades de absorbancia

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, reporte equipo HPLC

B. VALINA

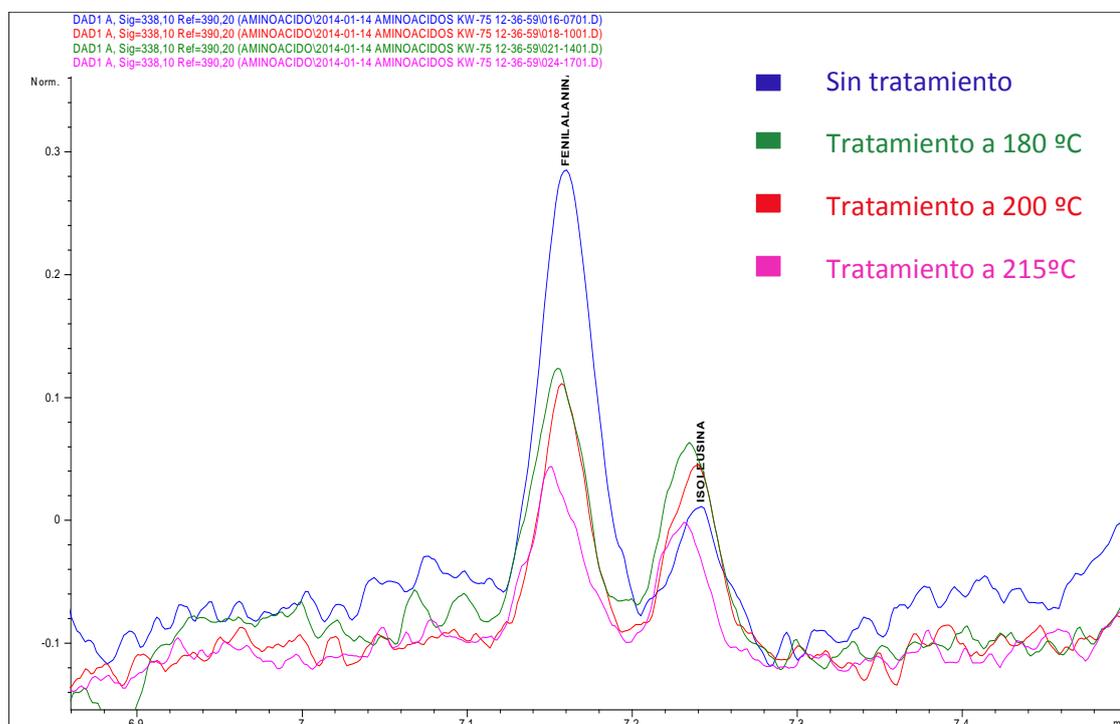
En la Figura 04, se observa una disminución en la altura de picos no obstante, las muestras que fueron sometidos a 200 °C fue mayor que los que fueron tratados a 180 °C, en cuanto a los que fueron tratados a 215 °C la disminución de la altura fue mayor.

C. METIONINA

En la figura 04, se observa la altura de picos para los tratamientos de 180 °C es igual a 200 °C, los que representa que en ambos tratamientos, el AAE valina se mantiene constante a diferencia de los que fueron sometidos a

215 °C, hay una mayor pérdida y una sensibilidad a la acción de la temperatura, en comparación de los resultados de la muestra sin tratamiento.

Figura 05: Altura de picos de fenilalanina e isoleucina



Norm: Mili unidades de absorbancia

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, reporte equipo HPLC

D. FENILALANINA

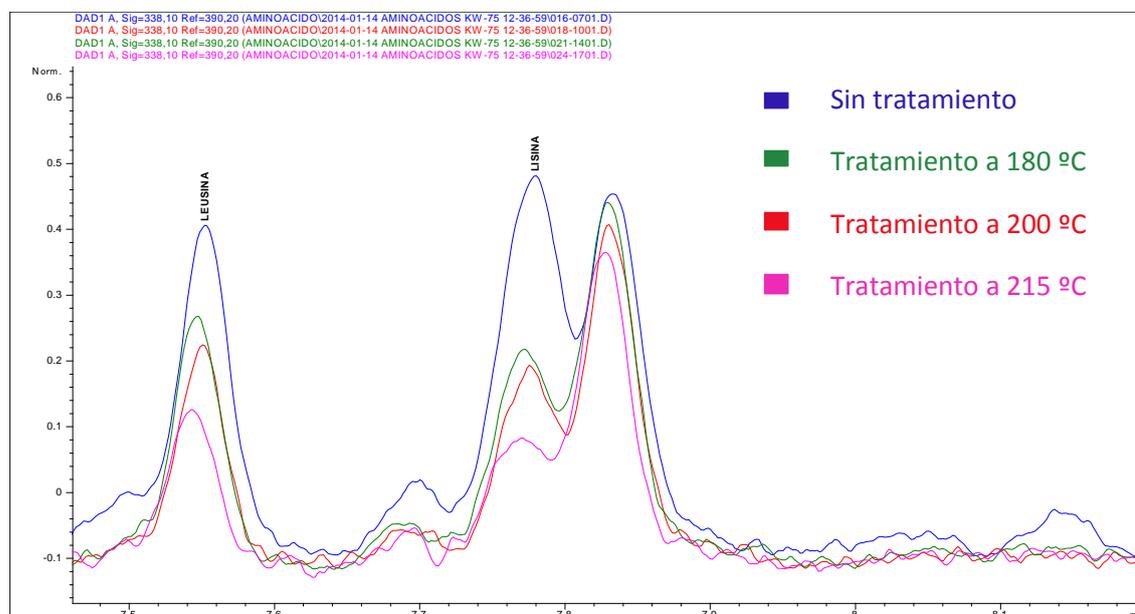
En la Figura 05, se observa una disminución en la altura de picos de la fenilalanina lo que indica que la alteración es gradual de acuerdo al tratamiento que se fue sometido respectivamente cada una de las muestras de kiwicha.

E. ISOLEUCINA

En la Figura 05, se observa una altura de picos reportado por el equipo cromatográfico (HPLC), de los granos de *Amaranthus caudatus* que fueron sometidos a 180 °C, 200 °C y 215 °C, donde este aminoácido presenta un

comportamiento diferente a la altura de picos con respecto a los demás aminoácidos esenciales.

Figura 06: Altura de picos de la leucina y lisina



Norm: Mili unidades de absorbancia

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, reporte equipo HPLC

F. LEUCINA

La Figura 06, las muestras presentan una decaída en los picos a partir de los 180 °C, en cuanto a los tratamientos a 215 °C hay una disminución en las cantidades de este aminoácido.

G. LISINA

En este AAE, el efecto de la temperatura es mayor teniendo una reducción considerable en la altura de pico desde los 180 °C, en cuanto a las muestras que fueron expandidos a una temperatura de 215 °C este aminoácido disminuyó considerablemente. Esto indica que la lisina se muestra sensible a la exposición a altas temperaturas.

2. Cuantificación de aminoácidos esenciales de *Amaranthus caudatus* “kiwicha” a temperaturas de 180 °C, 200 °C y 215 °C

Tabla 06: Cuantificación de aminoácidos esenciales de la kiwicha

Aminoácido ($\mu g/g$)	ST	Expandido a 180°C *	Expandido a 200°C *	Expandido a 215°C *
Treonina	0.0058	0.0038 \pm 0.0007	0.0036 \pm 0.0001	0.0028 \pm 0.0004
Valina	0.0146	0.0118 \pm 0.0007	0.0094 \pm 0.0010	0.0077 \pm 0.0023
Metionina	0.0079	0.0057 \pm 0.0002	0.0056 \pm 0.0004	0.0055 \pm 0.0031
Fenilalanina	0.0232	0.0127 \pm 0.0004	0.0121 \pm 0.0007	0.0092 \pm 0.0002
Isoleucina	0.0126	0.0083 \pm 0.0004	0.0070 \pm 0.0006	0.0057 \pm 0.0008
Leucina	0.0268	0.0168 \pm 0.0013	0.0147 \pm 0.0021	0.0119 \pm 0.0017
Lisina	0.0216	0.0094 \pm 0.0002	0.0077 \pm 0.0031	0.0051 \pm 0.0002

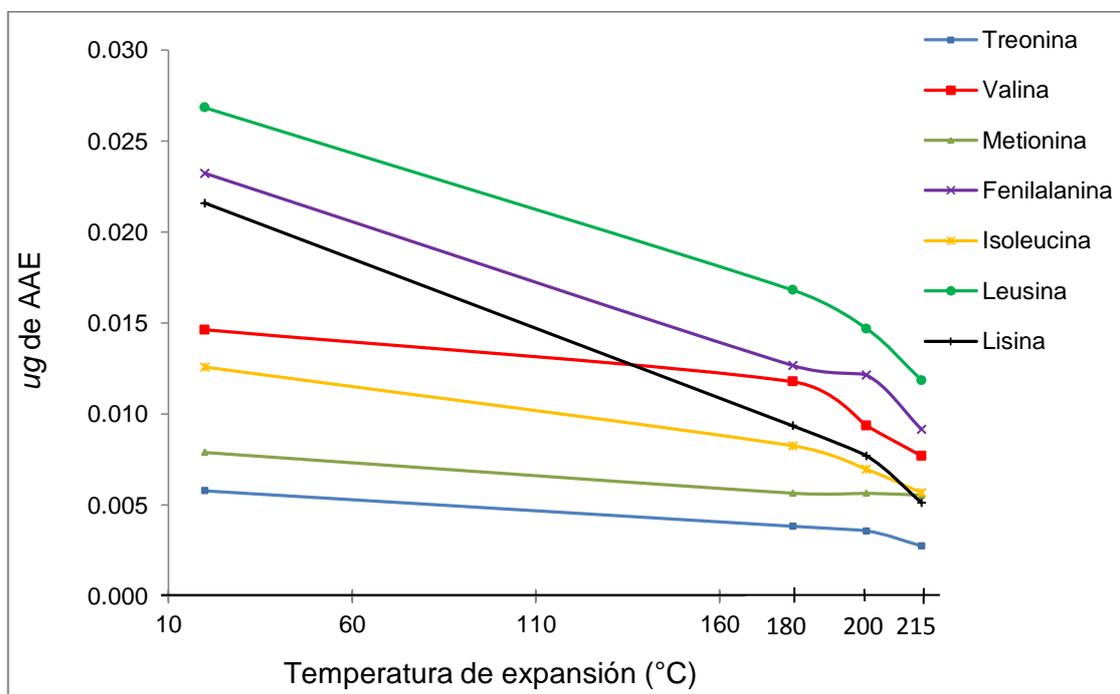
ST, grano de kiwicha sin tratamiento.

*Los resultados por triplicado se muestran en el anexo (05).

Fuente: Laboratorio de cromatografía de la UNSAAC – Elaboración propia.

La cuantificación de los AAE en la kiwicha sometida ha expandido a las temperaturas de 180 °C, 200 °C y 215 °C, se realizó a través de un método cromatográfico en HPLC, los resultados se muestran en la Tabla 06, en ella se aprecia que el AAE Leucina se encuentra en mayor cantidad 0.0268 μg , seguido de la Fenilalanina 0.0232 μg , mientras que la Treonina es de 0.0058 μg , esta jerarquía se mantiene a las diferentes temperaturas, aunque la cantidad se ve disminuida. Por otra parte se observa que la desviación estándar es mínima para todos los casos, esto quiere decir que los errores se deben sobre todo al tipo aleatorio, y que este es un indicativo de que la técnica HPLC, es la más recomendada.

Figura 07: Variación del contenido de aminoácidos esenciales en función a la temperatura de 180 °C, 200 °C y 215 °C.



Fuente: Elaboración propia.

La disminución del contenido de AAE en función a la temperatura se representó en la figura (07), siendo la Lisina la que disminuye con mayor rapidez, este hecho es contrario para la Metionina y Treonina, no obstante en todos los casos existe disminución del contenido de AAE cuando se incrementa la temperatura de expansión.

Por otro lado, se ha realizado una correlación lineal y cuadrática del contenido de AAE, utilizando el software estadístico Excel (2010), los resultados se muestran en la tabla (07), en ella se observa que el comportamiento lineal del contenido de AAE presenta un R^2 adecuado, sin embargo una correlación cuadrática resulta en mejor representación ya que R^2 está más cercano a la unidad, es así que para conocer la disminución del contenido de los AAE se tomara en cuenta una ecuación de segundo grado.

Tabla 07: Correlación de datos del contenido de aminoácidos esenciales en función a la temperatura.

Ecuación	Coef.*	Treonina	Valina	Metionina	Fenilalanina	Isoleucina	Leucina	Lisina
Lineal $Y = a + bX$	<i>a</i>	0.0061	0.0155	0.0081	0.0247	0.0134	0.0285	0.0233
	<i>b</i>	-1.4E-05	-3.0E-05	-1.3E-05	-6.8E-05	-3.3E-05	-7.1E-05	-8.1E-05
	R^2	0.948	0.828	0.985	0.983	0.960	0.974	0.992
Cuadrática $Y = a + bX + cX^2$	<i>a</i>	0.0057	0.0132	0.0084	0.0238	0.0123	0.0266	0.0223
	<i>b</i>	8.2E-06	8.2E-05	-2.5E-05	-2.6E-05	2.1E-05	2.0E-05	-2.9E-05
	<i>c</i>	-9.8E-08	-5.0E-07	5.5E-08	-1.8E-07	-2.4E-07	-4.1E-07	-2.3E-07
	R^2	0.985	0.999	0.999	0.988	1.000	0.998	0.998

*El resultado de los análisis se muestra en el anexo (06)

Fuente: Elaboración propia.

3. Comparación múltiple del contenido de aminoácidos esenciales en la kiwicha expandida

Se comparó la existencia de diferencia significativa del contenido en μg de AAE expuestos a diferentes temperaturas de expansión, a través de un ANOVA, los resultados se muestran en la Tabla 08.

Tabla 08: ANOVA de un factor para los AAE

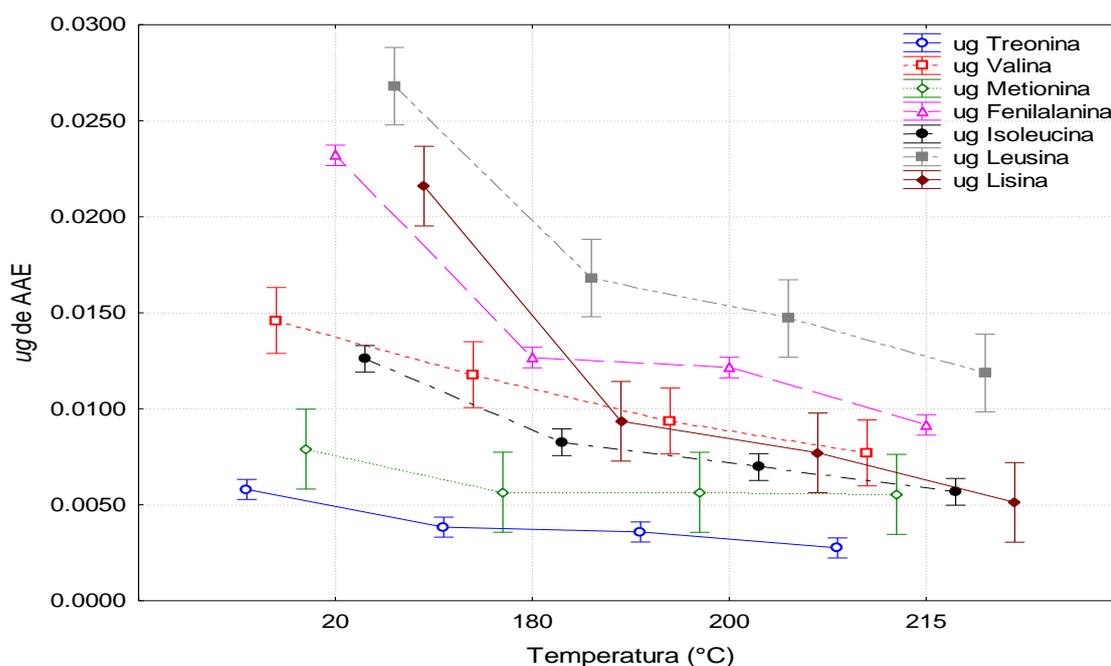
AAE (μg)	F_{cal}	<i>p-value</i>	Nivel de significancia (α)	Diferencia entre tratamientos*
Treonina	32.6369	7.77E-05	0.05	Significativa
Valina	16.2504	9.15E-04	0.05	Significativa
Metionina	1.6023	2.64E-01	0.05	No significativa
Fenilalanina	699.4252	5.11E-10	0.05	Significativa
Isoleucina	99.2836	1.14E-06	0.05	Significativa
Leucina	55.0906	1.10E-05	0.05	Significativa
Lisina	66.0967	5.48E-06	0.05	Significativa

*Se rechaza H_0 si $\alpha > p\text{-value}$, H_0 : no existe diferencia significativa entre tratamientos, el análisis completo se observa en el anexo (07)

Fuente: Elaboración propia, Statistica 8.0

De la Tabla 08, se aprecia que el efecto de la temperatura sobre los AAE, genera una diferencia significativa en el contenido de estos, a excepción de la Metionina, es decir que cualquier cambio de la temperatura hasta 215 °C, no modifica considerablemente el contenido de este AAE ($p - value < 0.05$), este hecho también se puede apreciar en la figura (08), donde se observa claramente los intervalos del contenido de Metionina para los diferentes tratamientos se sobrepone, mientras que en los otros AAE, este hecho no sucede.

Figura 08: Comparación del efecto temperatura de expandido a 180 °C, 200 °C y 215 °C sobre los aminoácidos esenciales de *Amaranthus caudatus* (kiwicha)



*Comparación múltiple de AAE, para $\alpha = 0.05$
Fuente: Elaboración propia, Statistica 8.0

Por otro lado se realizó la comparación individual del efecto de la temperatura sobre cada AAE, a través de una prueba Fisher o LSD, los resultados se muestran en la tabla (09), de ella se desprende por ejemplo, que para el caso de la Treonina se observa que el contenido inicial es de 0.0058 $\mu\text{g/g}$ de kiwicha, y

que se disminuye a 0.0038 $\mu\text{g/g}$ cuando se expande la kiwicha a 180 °C, y este valor luego disminuye a 0.0036 $\mu\text{g/g}$ cuando se expande a 200 °C, este cambio del contenido de Treonina no es significativo, letras iguales, mientras que a 250 °C disminuye a 0.0028 $\mu\text{g/g}$, indicando que si existe diferencia significativa, es decir el expandido a 180 °C y 200 °C no modifican significativamente el contenido de este AAE entre ellos, aunque si en comparación de la muestra inicial. Por otro lado en la tabla (09), se aprecia que el AAE Isoleucina modificó su contenido a las diferentes temperaturas de expansión (letras diferentes), mientras que para el caso de la Leucina y Lisina, el contenido a 180 °C y 200 °C son similares y que el de 200 °C y 215 °C también.

Tabla 09: Comparación múltiple de los aminoácidos esenciales de *Amaranthus caudatus* (kiwicha) mediante Método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher.

AAE ($\mu\text{g/g}$)	Temperatura (°C)			
	ST*	180	200	215
Treonina	a** 0.0058	b 0.0038	b 0.0036	c 0.0028
Valina	a 0.0146	b 0.0118	b,c 0.0094	c 0.0077
Metionina	a 0.0079	a 0.0057	a 0.0056	a 0.0055
Fenilalanina	a 0.0232	b 0.0127	b 0.0121	c 0.0092
Isoleucina	a 0.0126	b 0.0083	c 0.0070	d 0.0057
Leucina	a 0.0268	b 0.0168	b,c 0.0147	c 0.0119
Lisina	a 0.0216	b 0.0094	b,c 0.0077	c 0.0051

*ST, sin tratamiento.

**Las letras iguales en las filas significan que no existe diferencia significativa ($p - \text{value} < 0.05$), el análisis completo se muestra en el anexo 08.

Fuente: Elaboración propia, Statistica 8.0

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

- **EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES REPORTADOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO – HPLC**

A través de la técnica cromatográfica – HPLC, se determinó la presencia de los aminoácidos esenciales tales como: treonina, valina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, los mismos que presentan una ligera disminución a diferentes tratamientos de temperatura además que se encontró aminoácidos no esenciales como: ácido aspártico, ácido glutámico serina, histidina, glicina, arginina, alanina, tirosina y cistina. Estos AAE, fueron identificados en el grano de kiwicha de la variedad Oscar Blanco sin tratamiento, así como luego de un proceso de expandido a 180°C, 200°C y 215°C. En el caso exclusivo del contenido de Metionina, el cual no muestra una disminución significativa, este hecho se puede explicar a la interacción proteína-almidón. (Valls, 1993); la expansión de productos con elevado contenido proteico se suele realizar generalmente para controlar los inhibidores del crecimiento que están contenidos en las materias primas. Se intenta en estos procesos conseguir por un lado el mínimo contenido en factores antitripsicos y por otro la máxima lisina disponible en el producto. Es conocido que la lisina es un aminoácido muy reactivo y el proceso que sea menos agresivo será el mejor desde el punto de vista nutritivo. La extrusión produce el desenredamiento de las cadenas proteicas vegetales. Para (Paggi, 2003); el aminoácido que sufre ligera variación en los cereales es la Lisina cuando son sometidos a procesos de extrusión o expansión, de otro lado los AAE que generalmente se encuentran en los

cereales son: Metionina, Treonina, isoleucina, Fenilalanina, Tirosina e Isoleucina. En ausencia de cantidades importantes de almidón, la cocción por expansión reduce la solubilidad de la proteína cuando la temperatura aumenta. Existe un proceso por el cual a medida que la temperatura se va elevando, la proteína se va afectando. (Ascheri, 2005); menciona que en el momento en que el producto sale de la matriz del expansor, el agua que está íntimamente mezclada con el producto sufre un brusco cambio de presión y se evapora instantáneamente. Es por ello que el producto sufre una expansión y las cadenas proteicas así como las de almidón son modificadas, aumentando la superficie y haciéndose más atacable por las enzimas, de esta manera el producto se hace más digestible. (Villanueva *et al.*, 2007); la hidrólisis con HCl 6N y fenol, por 24 horas a 110 °C se observa una composición en aminoácidos de la harina deslipidada, de la fracción albúmina y de la proteína de 35 KDa de ***Amaranthus caudatus*** representa un aumento en el contenido de los aminoácidos esenciales: lisina, fenilalanina, leucina y una disminución en el aminoácido azufrado metionina.

(López, 1999); Muchas proteínas son desnaturalizadas por la extrusión y expansión perdiendo por tanto sus propiedades funcionales, sin embargo (Zamora, 2003); indica que el proceso de expansión y/o extrusión de cereales aumentó significativamente el aprovechamiento proteico. (Zamora, 2003; Asp y Björck, 1989); observaron, en maíz extrudido, que los gránulos se encuentran incrustados en la matriz proteica (glutelinas), y en los cuerpos proteicos (zeínas). Adicionalmente, considerando que una característica de la amilosa es su capacidad de interactuar con los lípidos, se puede inferir que en el material extrudido pudiera haber la presencia de estos complejos, los cuales se someten a un ordenamiento conformacional de espiral a hélice, haciéndolos estables térmicamente e insolubles,

razón por la cual, posiblemente no disminuyó notablemente el contenido de Metionina.

- **COMPARACIÓN MÚLTIPLE DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN LA KIWICHA EXPANDIDA**

De acuerdo a los reportes del equipo cromatográfico, la muestra del ***Amaranthus caudatus*** que fue expuesto a un proceso de expandido a una temperatura de 215 °C, la disminución de los AAE fue relevante. Treonina 0.0028 *ug/g*, Valina 0.0077 *ug/g*, Metionina 0.0055 *ug/g*, Fenilalanina 0.0092 *ug/g*, Isoleucina 0.0057 *ug/g*, Leucina 0.0119 *ug/g* y Lisina 0.0051 *ug/g*. a diferencia de la muestra sin tratamiento, estos aminoácidos presentan una concentración inicial de: Treonina 0.0058 *ug/g*, Valina 0.0146 *ug/g*, Metionina 0.0079 *ug/g*, Fenilalanina 0.0232 *ug/g*, Isoleucina 0.0126 *ug/g*, Leucina 0.0268 *ug/g* y Lisina 0.0216 *ug/g*. Lara et al., (2004), El proceso de hacer estallar a 240 °C, del grano alcanza el rendimiento de más del 80 % del amaranto reventado. Siendo el aminoácido relevante y disponible la lisina. (Janvekar, 2010); El tratamiento térmico por hacer estallar a 170 °C y 190 °C de 30 *gr* resultó el índice de aminoácidos esenciales a 85.40 % de aminoácidos esenciales en estudio, valina y contenido de leucina disminuyeron significativamente. (Coultrate, 2007); Los aminoácidos de una proteína se encuentran unidos entre sí mediante el denominado “enlace peptídico”, formado cuando en grupo amino de un aminoácido reacciona con el carboxilo de otro con la pérdida de una molécula de agua. (Badui, 2006); el paso previo es la hidrolisis de la proteína a sus aminoácidos constituyentes en el que se somete la proteína a una temperatura de 120 °C, con HCl 6N durante 10-24 horas. En estas condiciones se destruye un porcentaje de la treonina, además que se produce una fuerte racemización en la mayoría de los aminoácidos y la destrucción de un porcentaje de la treonina y lisina. Un factor más involucrado en la desnaturalización

por temperatura, es el contenido y tipo de aminoácidos predominantes en las proteínas. Las proteínas con altos contenidos de aminoácidos hidrofóbicos como valina, leucina, isoleucina y fenilalanina resultan más estables. La aplicación de calor es uno de los agentes desnaturalizantes que se utilizan con mayor frecuencia en alimentos ya que facilita la digestión de las proteínas, y logra desnaturalizar los inhibidores de proteasas que frecuentemente se hallan en alimentos basados en proteínas, la aplicación de calor afecta la estabilidad de las acciones no-covalentes de la estructura tridimensional de las proteínas, pues se eleva la entalpía de la molécula. Fenema (2000); el mecanismo por el que se induce la desnaturalización es muy complejo e implica fundamentalmente la desnaturalización de interacciones no covalentes primordiales. La composición aminoacídica afecta a la estabilidad térmica de las proteínas más ricas en restos de aminoácidos hidrófobos, especialmente Valina, isoleucina, Leucina y fenilalanina tienden a ser más estables. Las proteínas sufren varios cambios químicos durante su proceso a temperaturas elevadas. En estos cambios, cabe citar: (a) la racemización parcial de los L-aminoácidos a los D-aminoácidos, ocurre en el tostado de las proteínas o de los alimentos que las contienen a temperaturas superiores a 200 °C, disminuyendo la digestibilidad de las proteínas porque los enlaces peptídicos en que participan los D-aminoácidos son menos eficientemente hidrolizados por las proteasas gástricas y pancreáticas. (b) la hidrólisis cuando se calienta una solución proteica durante varias horas en HCl 6N, las proteínas se hidrolizan completamente en sus aminoácidos constitutivos, rompiéndose sus enlaces polipeptídico aminoacídico. (c) la desulfuración y la desamidación de algunos aminoácidos. La mayor parte de estos cambios químicos son irreversibles y algunas de estas reacciones dan por resultado aminoácidos potencialmente tóxicos. (Braverman 1980); menciona que el químico Francés Maillard al estudiar la

condensación de azúcares con aminoácidos calentando la una mezcla de estos dos componentes, se forman sustancias parduscas. Donde los azúcares reaccionan con aminos primarias y secundarias para formar glucosilaminas. Similares reacciones de condensación ocurren con los aminoácidos libres y los grupos amino libres de los péptidos y las proteínas. La actividad de los reactivos entre sí, depende de los tipos de azúcar así como del aminoácido. En presencia de ciertos compuestos dicarbonílicos, los aminoácidos se descarboxilan, esta reacción conocida con el nombre de degradación de Strecker, da como resultado la desaminación y la descarboxilación simultánea del aminoácido, que pasa a aldehído. Mediante el empleo de trazadores isotópicos, demuestra que entre el 90 y 100% de CO₂ expelido durante la reacción de Maillard se origina a partir del aminoácido y no del azúcar.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración los aminoácidos esenciales de ***Amaranthus caudatus*** (kiwicha) de la variedad Oscar Blanco a través de un método cromatográfico – HPLC, sometidos a un proceso de expansión a 180 °C, 200 °C y 215 °C, siendo estos Treonina, Valina, Metionina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina y Lisina los mismos que sufren una disminución en la concentración de sus aminoácidos.
- Se ha cuantificado los aminoácidos esenciales de ***Amaranthus caudatus*** (kiwicha), variedad Oscar Blanco, encontrándose en orden de cantidad decreciente: Leucina, Fenilalanina, Lisina, Valina, Isoleucina, Metionina y Treonina, y que estas disminuyen ligeramente con la temperatura cuando son sometidos a un proceso de expansión a las temperaturas de experimentación de 180 °C, 200 °C y 215 °C.
- Se realizó una comparación múltiple del proceso de expansión tomando como referencia el contenido inicial aminoácidos esenciales de ***Amaranthus caudatus*** (kiwicha), variedad Oscar Blanco, observándose que la Metionina ofrece mejor resistencia a la temperatura, es decir no varía notablemente (p -value < 0.05), en todos los demás caso disminuyen significativamente (p -value > 0.05).

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Elaborar productos alimenticios a partir de granos de kiwicha sometiendo a un proceso de extrusión a temperatura de 180 °C, puesto que este proceso permite que los aminoácidos esenciales disminuyan ligeramente, lo que ayudará obtener un producto final con un mayor porcentaje de nutrientes.
- Desarrollar trabajos de investigación a diferentes grados de temperaturas en proceso de extrusión en granos de quinua y kiwicha. el que permita cuantificar, el grado de concentración de aminoácidos esenciales en estos alimentos.
- Desarrollar e implementar proyectos para la producción de una cadena de derivados de la kiwicha, que en su composición representa una rica fuente de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, grasa, minerales como (fosforo, calcio, hierro, magnesio y potasio).
- Realizar investigaciones con respecto al aminoácido esencial isoleucina puesto que en la presente investigación, presenta un comportamiento diferente respecto a la altura de picos de los demás aminoácidos.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez Cáceres Aquilino; Céspedes Flores Elizabeth y Sumar Kalinowski Luis. Conservación y mejoramiento genético de la kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*) en la región cusco. Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola. Escuela de pst grado. La Molina, Lima-Perú, 2010. p. 125, mayo 2010.
- Ayala Guido. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Lima-Perú. Trabajo de habilitación. 2007. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p 103-104.
- Asp N, Björck I. Nutritional properties of extruded foods. Extrusion Cooking. Minnessota: AACC. 1989 En: Mercier C. Linko P., Harper J, editors.
- Ascheri, J.L.R. et al. Extrusión de harina mixta de amaranto integral y arroz: Parte 1. Caracterización físicoquímica. Alimentaria, v.367, p.74-83, 2005.
- Badui Derbal Salvador. Química de los alimentos. 4a. ed. México. Ed. Pearson educación. 2006. P. 145; 169.
- Baltes Werner. Química de los alimentos. 5a. ed. Zaragoza-España. Ed. ACRIBIA, S.A. 2006. p. 119. p. 132-133. p. 134.
- Belitz. H. D; Grosch, W y Schieberle. P. Química de los alimentos. 3a. ed. Zaragoza-España. Ed. ACRIBIA, S.A. 2012. p. 22-23.
- Braverman J.B.S. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 1a. ed. México D. F. Ed. El manual moderno, S.A. 1980. p. 174.
- Bressani, R. El amaranto, Inc, avances en alimentación y nutrición. Panamá, vol (II): p 7-8, 1991.

- Bressani, R. Efectos del procesamiento sobre la calidad nutricional del amaranto. El amaranto y su potencial vol, v.3, p.10-11, 1987.
- Collazos Chiriboga Carlos. Tabla peruana de composición de alimentos. 7a. ed. Lima Perú. 1996.
- Coultate T. P. Manual de química y bioquímica de los alimentos. 3a. ed. Zaragoza-España. Ed. Acribia. 2007. p. 131.
- Fenema Owen R. Química de los alimentos. 2a. ed. Zaragoza-España. Ed. ACRIBIA, S.A. 2000. p. 481.
- Gutiérrez Pulido Humberto y De La Vara Salazar Román. Análisis y diseño de experimentos. 2a. ed. México. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. 2008. p. 66; p. 69; p. 74-75.
- Higinio Rubio Víctor Alexis. "Elaboración de una Mezcla Instantánea de arroz (***Oryza sativa***), Cañihua (***Chenopodium pallidicaule*** Aellen) y Kiwicha (***Amaranthus caudatus***) Por el Método de Cocción Extrusión". Callao – Perú. Facultad de ingeniería pesquera y de alimentos. Universidad nacional del callao. 2011. p. 17.
- Herrera Silvia; Montenegro Amparito. Amaranto prodigioso alimento para la longevidad de la vida. Quito-Ecuador, N° 359: p 2, Enero 2012.
- Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). Programa Nacional de Investigación en Cultivos Andinos. Lima. 2011. Trabajo de habilitación.
- Janvekar Shaheen. Development and evaluation of popped sorghum breakfast cereal for nutrient adequacy. Dharwad, Junio, 2010. Testis Mg. Colegio rural casa de ciencias Dharwad, Universidad de ciencias agrícolas. 90 p.
- Lara N; Mejía A y Cangas A. Popped amaranth grain and its products breakfast cereal and crunchy bars: popping process, nutritive value and shelf life. Quito-Ecuador, 2004. Trabajo de habilitación. Departamento de nutrición y calidad, de la

estación experimental santa catalina de agricultura instituto de investigación (INIAP), 4 p.

López, Y. Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos del arroz (*Sitophilus oryzae*). Caracas Venezuela, 1999. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela.

Malca G. Oscar. Fideos imperial enriquecido con kiwicha. Lima-Perú. 2001. Seminario de agro negocios. Departamento académico, Administración y contabilidad, Escuela ciencias administrativas, Facultad de administración y contabilidad, Universidad del pacífico, p. 4; p. 9

Mapes Sánchez. Emma Cridstina. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del genero *Amaranthus* cultivadas y de sus posibles parientes silvestres en México. Trabajo de habilitación. México, 2009. p 232.

Nielsen Suzane S. Análisis de los alimentos. 1a. ed. Zaragoza-España. Ed. ACRIBIA, S.A. 2007. p. 39-43.

Ochoa Saltos Catherine Lorena. Formulación, elaboración y control de calidad de barras energéticas a base de miel y avena para la empresa apicare. Riobamaba-Ecuador, 2012. Tesis Bquim. Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de ciencias, Escuela superior politécnica de Chimborazo, 124 p.

Paggi Meza Vania. Adecuación de una maquina expansora de cereales tipo cañón para prácticas de laboratorio en la universidad tecnológica equinoccial. Estudio del caso: arroz (*Oriza sativa L*), maíz (*Zea mays L*), quinua (*Chenopodium quinua*) y trigo (*triticum vulgare L*). Quito-Ecuador, 2003. Tesis Ing. Escuela de ingeniería en industrialización de alimentos, Facultad de ciencias de la ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial, 300 p.

- Ramo P; Rubiola AZ; Zorrilla SE y Sihufe GA. Determinación por RP-HPLC de aminoácidos libres presentes en matrices alimenticias. Ciencia y tecnología de los alimentos: avances en análisis físicos, químicos y sensoriales, Córdoba-Argentina, Vol (1): 8, 2009.
- Ruiz R. R. Obtención y caracterización de una bebida en polvo en base a maca (*Lepidium meyenii walp*), kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*) y cacao (*teobroma cacao L.*). Lima-Perú, 2002. Tesis.
- Sandoval N. Elaboración de un producto tipo *snack* (bocaditos) a partir de la mezcla de harina de maíz (*Zea mays L.*) y pituca (*Colocasia esculenta*). Lima-Perú, 1993. Tesis para optar el título de ingeniero de industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Silva Sánchez Cecilia. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivo en San Luis Potosí. San Luis Potosí. 2007. Tesis Br. Tesis Dr. Escuela de posgrado en biología molecular. Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, A.C. p. 10.
- Tresierra, A. Metodología de la investigación científica. 1a. ed. Trujillo Perú. Ed. Biociencia. 2000. 165 p.
- Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). Investigaciones en la obtención de nuevas en los programas de investigación y proyección social de la UNALM. Lima. 2006. Trabajo de habilitación. Oficina Académica de Investigación. Facultad de agronomía. p. 2.
- Valdivia Fernández Roberto. Elevar la contribución que hacen las especies olvidadas y subutilizadas a la seguridad alimentaria y a los ingresos de la población rural de escasos recursos: quinua, cañihua y amaranto. Puno, 2002. Trabajo de

habilitación. Centro de investigación de recursos naturales y medio ambiente (CIRNMA), 20 p.

Villacrés P. Elena; Peralta I. Eduardo; Egas A. Luis y Mazón O. Nelson. Proceso de expansión y obtención del cereal instantáneo. Potencial agroindustrial de la quinua. Quito-Ecuador, Boletín divulgativo N°146: 15, Abril 2011.

Villanueva Orinda; Arnao Inés. Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción de albumina de *Amaranthus caudatus* (Kiwicha). Relatos de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima 2007. Trabajo de Habilidadación. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. p. 345.

Zamora N. Efecto de la extrusión sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad in vitro de proteínas y almidón en harinas de *Canavalia ensiformis*. Arch Latinoamer Nutr 2003; 53: 293-298.

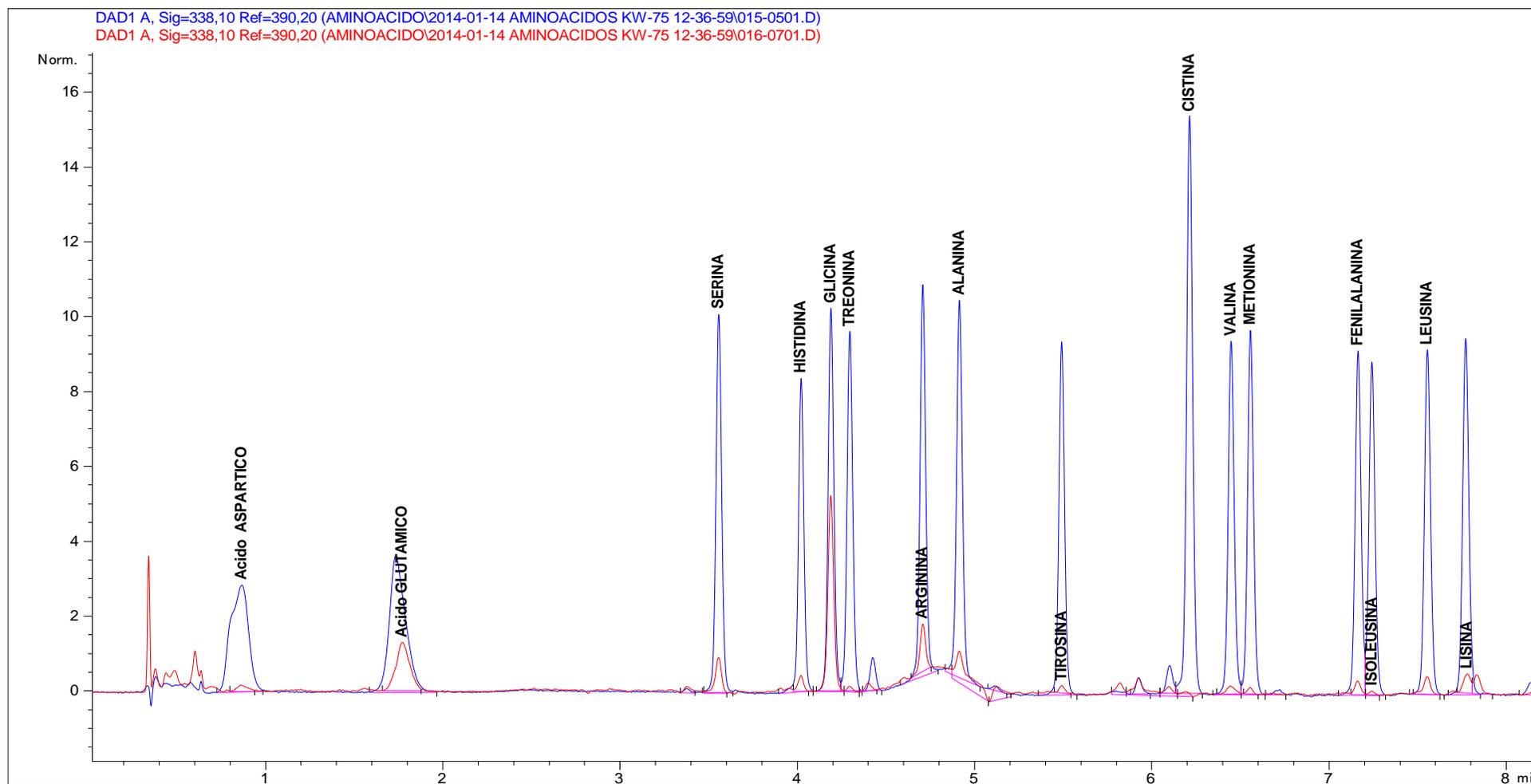
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf

<http://www.fao.org/docrep/005/y1453s/y1453s05.htm>

<http://tecgranosysemillas.files.wordpress.com/2013/05/desarrollo-de-alimentos-precocidos-por-extrusion-a-base-de-mac3adz-leguminosa.pdf>

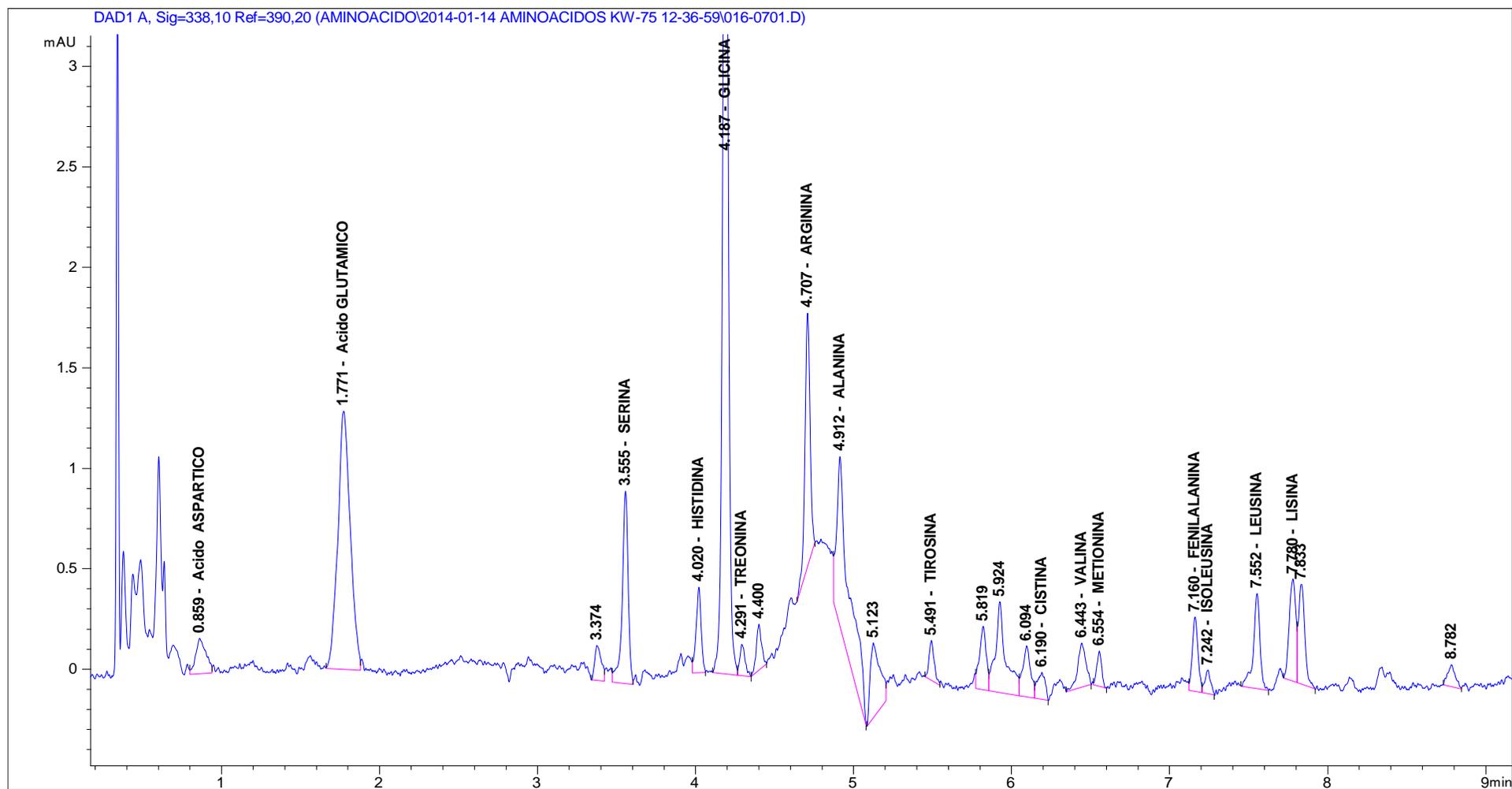
ANEXOS

Anexo 01: Comparación de picos, Estándar a 250 pico moles (pmol) vs Blanco de Kiwicha



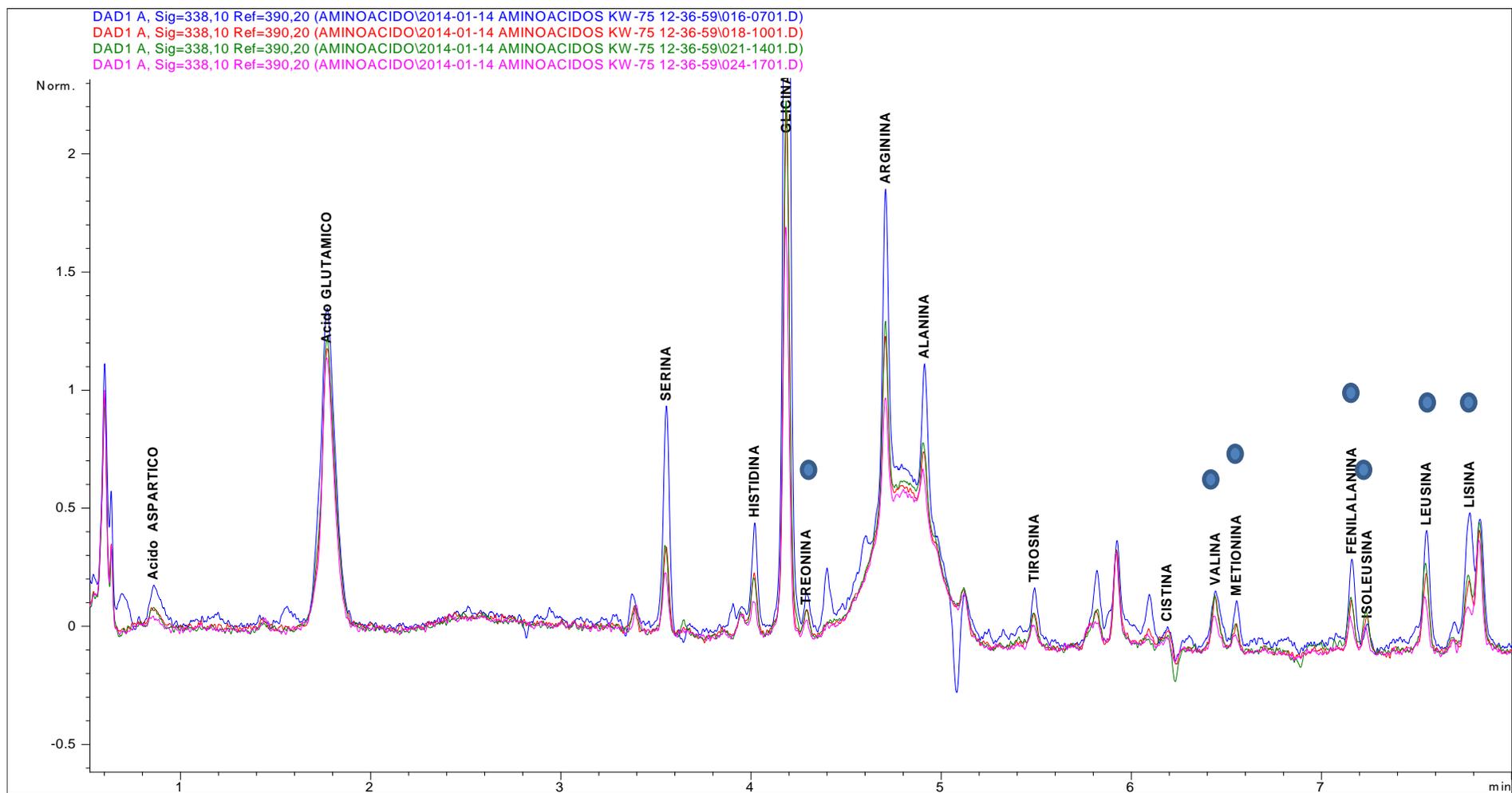
Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, equipo HPLC

Anexo 02: Altura de pmol en Blanco de Kiwicha



Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, equipo HPLC

Anexo 03: Comparación de picos (Blanco, 180°C, 200°C y 215°C)



Fuente: Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC, equipo HPLC

Anexo 04: Resultados por triplicado de las muestras de kiwicha.

Tratamiento	Repeticiones de las muestras de kiwicha	Treonina		Valina		Metionina		Fenilalanina		Isoleucina		Leusina		Lisina	
		ug	%	ug	%	ug	%	ug	%	ug	%	ug	%	ug	%
		0.0058	5.72E-06	0.0146	1.45E-05	0.0079	7.81E-06	0.0232	2.30E-05	0.0126	1.26E-02	0.0268	2.66E-05	0.0216	2.14E-05
180°C	K-4	0.0039	3.95E-06	0.0125	1.25E-05	0.0059	5.86E-06	0.0127	1.27E-05	0.0080	7.98E-06	0.0179	1.78E-05	0.0095	9.45E-06
	K-5	0.0031	3.09E-06	0.0118	1.17E-05	0.0054	5.39E-06	0.0123	1.22E-05	0.0081	8.05E-06	0.0153	1.52E-05	0.0091	9.04E-06
	K-6	0.0044	4.43E-06	0.0111	1.10E-05	0.0057	5.65E-06	0.0130	1.30E-05	0.0087	8.65E-06	0.0173	1.72E-05	0.0095	9.46E-06
200°C	K-1	0.0036	4.16E-06	0.0088	8.38E-06	0.0056	5.29E-06	0.0125	1.19E-05	0.0075	7.08E-06	0.0164	1.56E-05	0.0100	9.46E-06
	K-2	0.0035	3.63E-06	0.0087	8.60E-06	0.0053	5.21E-06	0.0126	1.24E-05	0.0071	6.99E-06	0.0153	1.51E-05	0.0090	8.85E-06
	K-3	0.0037	3.63E-06	0.0105	1.03E-05	0.0061	5.97E-06	0.0114	1.11E-05	0.0064	6.22E-06	0.0123	1.21E-05	0.0042	4.09E-06
215°C	K-7	0.0028	2.76E-06	0.0067	6.66E-06	0.0032	3.16E-06	0.0090	8.93E-06	0.0052	5.21E-06	0.0101	1.01E-05	0.0049	4.86E-06
	K-8	0.0031	3.09E-06	0.0103	1.02E-05	0.0044	4.38E-06	0.0092	1.02E-05	0.0066	6.53E-06	0.0136	1.35E-05	0.0051	5.09E-06
	K-9	0.0024	2.46E-06	0.0061	1.35E-05	0.0090	9.00E-06	0.0093	1.92E-05	0.0052	1.31E-05	0.0118	2.17E-05	0.0054	1.53E-05

Anexo 05: Cuantificación de AAE por triplicado

AAE (ug)	Blanco Kiwicha	180°C			200°C			215°C		
		K-4 (ug)	K-5 (ug)	K-6 (ug)	K-1 (ug)	K-2 (ug)	K-3 (ug)	K-7 (ug)	K-8 (ug)	K-9 (ug)
Treonina	0.0058	0.0039	0.0031	0.0044	0.0036	0.0035	0.0037	0.0028	0.0031	0.0024
Valina	0.0146	0.0125	0.0118	0.0111	0.0088	0.0087	0.0105	0.0067	0.0103	0.0061
Metionina	0.0079	0.0059	0.0054	0.0057	0.0056	0.0053	0.0061	0.0032	0.0044	0.0090
Fenilalanina	0.0232	0.0127	0.0123	0.0130	0.0125	0.0126	0.0114	0.0090	0.0092	0.0093
Isoleucina	0.0126	0.0080	0.0081	0.0087	0.0075	0.0071	0.0064	0.0052	0.0066	0.0052
Leusina	0.0268	0.0179	0.0153	0.0173	0.0164	0.0153	0.0123	0.0101	0.0136	0.0118
Lisina	0.0216	0.0095	0.0091	0.0095	0.0100	0.0090	0.0042	0.0049	0.0051	0.0054

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 06: ANOVA de la Regresión de datos de los AAE

TREONINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA							
			<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	4.6752E-06	4.6752E-06	36.8070294	0.02610938		
Coefficiente de correlación múltiple	0.973891	Residuos	2	2.5404E-07	1.2702E-07				
Coefficiente de determinación R ²	0.948463	Total	3	4.9292E-06					
								<i>Superior</i>	
R ² ajustado	0.922694		<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>95%</i>	
Error típico	0.000356	Intercepción	0.006113	0.00039302	15.5542603	0.00410789	0.00442212	0.00780419	
								-4.0196E-	
Observaciones	4	T	-1.4E-05	2.2784E-06	-6.06687971	0.02610938	-2.3626E-05	06	

Resumen

ANÁLISIS DE VARIANZA

		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	2	4.8532E-06	2.4266E-06	31.9226082	0.12418268
Coeficiente de correlación múltiple	0.992259	Residuos	1	7.6015E-08	7.6015E-08		
Coeficiente de determinación R ²	0.984579	Total	3	4.9292E-06			
R ² ajustado	0.953736						
							<i>Superior</i>
Error típico	0.000276	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>95%</i>
Observaciones	4	Intercepción	0.005654	0.00042706	13.2399583	0.0479921	0.00022794 0.01108049
		T	8.2E-06	1.4495E-05	0.56538718	0.67240821	-0.00017599 0.00019238
		TT	-9.8E-08	6.4263E-08	-1.53033705	0.36847379	-9.1488E-07 7.182E-07

VALINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA						
		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	2.2627E-05	2.2627E-05	9.60168718	0.09026857	
Coeficiente de correlación múltiple	0.909731	Residuos	2	4.713E-06	2.3565E-06			
Coeficiente de determinación R ²	0.827611	Total	3	2.734E-05				
R ² ajustado	0.741417							
Error típico	0.001535						<i>Superior</i>	
Observaciones	4						<i>95%</i>	
		Intercepción	0.015546	0.00169285	9.18345554	0.01165054	0.00826246	0.02282995
		T	-3E-05	9.8136E-06	-3.09865893	0.09026857	-7.2634E-05	1.1816E-05

Resumen

ANÁLISIS DE VARIANZA

		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>		
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	2	2.7303E-05	1.3651E-05	369.100836	0.03678058	
Coeficiente de correlación múltiple	0.999323	Residuos	1	3.6985E-08	3.6985E-08			
Coeficiente de determinación R ²	0.998647	Total	3	2.734E-05				
R ² ajustado	0.995942							
		<i>Superior</i>						
Error típico	0.000192	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>95%</i>	
Observaciones	4	Intercepción	0.013194	0.00029789	44.2923388	0.01437069	0.00940908	0.0169791
		T	8.24E-05	1.0111E-05	8.15315266	0.0776946	-4.6036E-05	0.00021091
		TT	-5E-07	4.4826E-08	-11.2441109	0.05646949	-1.0736E-06	6.5539E-08

METIONINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA					
			<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	3.8317E-06	3.8317E-06	128.206476	0.00770983
Coeficiente de correlación múltiple	0.99229	Residuos	2	5.9774E-08	2.9887E-08		
Coeficiente de determinación R^2	0.98464	Total	3	3.8915E-06			
R^2 ajustado	0.97696						
Error típico	0.000173						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>Inferior 95%</i>
		Intercepción	0.008108	0.00019064	42.5303697	0.00055238	0.0072879
		T	-1.3E-05	1.1052E-06	-11.3228298	0.00770983	0.00892845
							-7.7586E-06

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA				
		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>

<i>Estadísticas de la regresión</i>		<i>cuadrados</i>						
Coeficiente de correlación múltiple	0.999528	Regresión	2	3.8878E-06	1.9439E-06	528.83055	0.03073417	
Coeficiente de determinación R ²	0.999055	Residuos	1	3.6758E-09	3.6758E-09			
R ² ajustado	0.997166	Total	3	3.8915E-06				
Error típico	6.06E-05							<i>Superior</i>
Observaciones	4							<i>95%</i>
				<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>
		Intercepción		0.008366	9.3911E-05	89.0824989	0.00714611	0.00717255
		T		-2.5E-05	3.1876E-06	-7.80341214	0.08113999	-6.5376E-05
		TT		5.52E-08	1.4132E-08	3.9065671	0.15953577	-1.2435E-07
								0.00955905
								1.5628E-05
								2.3476E-07

FENILALANINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA					
			<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	0.00011161	0.00011161	113.031121	0.00873142
Coeficiente de correlación múltiple	0.991269	Residuos	2	1.9748E-06	9.874E-07		
Coeficiente de determinación R ²	0.982613	Total	3	0.00011358			
R ² ajustado	0.97392						
Error típico	0.000994						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>Inferior 95%</i>
		Intercepción	0.024687	0.0010958	22.5287369	0.00196447	0.01997205
		T	-6.8E-05	6.3524E-06	-10.6316095	0.00873142	-9.4869E-05
							0.0294017
							-4.0204E-05

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA				
		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>

<i>Estadísticas de la regresión</i>		<i>cuadrados</i>							
Coeficiente de correlación múltiple	0.994036	Regresión	2	0.00011223	5.6115E-05	41.5419802	0.10905446		
Coeficiente de determinación R ²	0.988107	Residuos	1	1.3508E-06	1.3508E-06				
R ² ajustado	0.964321	Total	3	0.00011358					
Error típico	0.001162						<i>Superior</i>		
Observaciones	4						<i>95%</i>		
				<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	
		Intercepción		0.023828	0.00180025	13.2357144	0.04800743	0.00095325	0.04670206
		T		-2.6E-05	6.1105E-05	-0.43064087	0.7411257	-0.00080273	0.0007501
		TT		-1.8E-07	2.709E-07	-0.67965736	0.61997472	-3.6262E-06	3.258E-06

ISOLEUCINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA					
		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	2.5947E-05	2.5947E-05	48.3837431	0.02004865
Coefficiente de correlación múltiple	0.979951	Residuos	2	1.0725E-06	5.3627E-07		
Coefficiente de determinación R ²	0.960305	Total	3	2.7019E-05			
R ² ajustado	0.940457						
Error típico	0.000732						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>95%</i>
		Intercepción	0.013377	0.00080756	16.5651029	0.00362448	0.00990264
							0.01685193
							-1.2421E-
		T	-3.3E-05	4.6815E-06	-6.95584238	0.02004865	-5.2707E-05
							05

Resumen

ANÁLISIS DE VARIANZA

		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	2	2.7011E-05	1.3505E-05	1644.79673	0.01743263
Coeficiente de correlación múltiple		Residuos	1	8.211E-09	8.211E-09		
0.999848		Total	3	2.7019E-05			
Coeficiente de determinación R ²							
0.999696							
R ² ajustado							
0.999088							
Error típico							<i>Superior</i>
9.06E-05		<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>95%</i>
Observaciones		Intercepción	0.012255	0.00014036	87.313665	0.00729086	0.01047171
4		T	2.13E-05	4.7641E-06	4.46537417	0.14025398	-3.926E-05
		TT	-2.4E-07	2.1121E-08	-11.3851323	0.05577363	-5.0883E-07
							2.7902E-08

LEUCINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA					
		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	0.00012407	0.00012407	75.3777299	0.01300822
Coefficiente de correlación múltiple	0.986992	Residuos	2	3.2919E-06	1.646E-06		
Coefficiente de determinación R ²	0.974153	Total	3	0.00012736			
R ² ajustado	0.961229						
Error típico	0.001283						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>95%</i>
		Intercepción	0.028501	0.00141479	20.1453803	0.00245498	0.02241414
							0.03458884
							-3.5918E-
		T	-7.1E-05	8.2017E-06	-8.68203489	0.01300822	-0.0001065
							05

Resumen

ANÁLISIS DE VARIANZA

		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	2	0.00012712	6.3562E-05	269.479284	0.0430348
Coeficiente de correlación múltiple		Residuos	1	2.3587E-07	2.3587E-07		
0.999074		Total	3	0.00012736			
Coeficiente de determinación R ²							
0.998148							
R ² ajustado							
0.994444							
Error típico		<i>Superior</i>					
0.000486		<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>95%</i>
Observaciones		Intercepción	0.0266	0.00075227	35.3596511	0.01799933	0.01704149
4		T	2E-05	2.5534E-05	0.78405366	0.576685	-0.00030442
		TT	-4.1E-07	1.132E-07	-3.59950461	0.17251272	-1.8458E-06
							1.0309E-06

LISINA

Resumen		ANÁLISIS DE VARIANZA					
			<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	1	0.00015903	0.00015903	244.009058	0.00407319
Coeficiente de correlación múltiple	0.995927	Residuos	2	1.3035E-06	6.5175E-07		
Coeficiente de determinación R^2	0.99187	Total	3	0.00016034			
R^2 ajustado	0.987805						
Error típico	0.000807						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>Inferior 95%</i>
							<i>95%</i>
		Intercepción	0.02334	0.00089027	26.2171506	0.00145172	0.01950992
		T	-8.1E-05	5.161E-06	-15.6207893	0.00407319	-0.00010283
							-5.8413E-05

Resumen

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>

<i>Estadísticas de la regresión</i>		Regresión	2	0.00016001	8.0005E-05	245.454885	0.04508762
Coeficiente de correlación múltiple	0.998983	Residuos	1	3.2595E-07	3.2595E-07		
Coeficiente de determinación R ²	0.997967	Total	3	0.00016034			
R ² ajustado	0.993901						
Error típico	0.000571						<i>Superior</i>
Observaciones	4						<i>95%</i>
				<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
		Intercepción	0.022265	0.00088432	25.1775058	0.02527198	0.01102864
		T	-2.9E-05	3.0016E-05	-0.96692215	0.51070506	-0.00041041
		TT	-2.3E-07	1.3307E-07	-1.73179652	0.33337381	-1.9213E-06

Anexo 07: ANOVA de la comparación múltiple

Test of SS Whole Model vs. SS Residual (datos)											
	Multiple - R	Multiple - R ²	Adjusted - R ²	SS - Model	df - Model	MS - Model	SS - Residual	df - Residual	MS - Residual	F	p
ug Treonina	0.961491	0.924465	0.896139	0.000015	3	0.000005	0.000001	8	0.000000	32.6369	0.000078
ug Valina	0.926841	0.859034	0.806172	0.000081	3	0.000027	0.000013	8	0.000002	16.2504	0.000915
ug Metionina	0.612645	0.375334	0.141085	0.000012	3	0.000004	0.000020	8	0.000002	1.6023	0.263748
ug Fenilalanina	0.998099	0.996202	0.994778	0.000339	3	0.000113	0.000001	8	0.000000	699.4252	0.000000
ug Isoleucina	0.986835	0.973843	0.964035	0.000081	3	0.000027	0.000002	8	0.000000	99.2836	0.000001
ug Leusina	0.976642	0.953830	0.936516	0.000380	3	0.000127	0.000018	8	0.000002	55.0906	0.000011
ug Lisina	0.980418	0.961220	0.946677	0.000481	3	0.000160	0.000019	8	0.000002	66.0967	0.000005

ANEXO 08: Evaluación FISHER – LSD

LSD test; variable ug <i>Treonina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between					
MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .00580	{2} - .00383	{3} - .00358	{4} - .00275
1	20		0.000274	0.000120	0.000012
2	180	0.000274		0.454673	0.009509
3	200	0.000120	0.454673		0.031441
4	215	0.000012	0.009509	0.031441	

LSD test; variable ug <i>Valina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between					
MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .01460	{2} - .01178	{3} - .00936	{4} - .00770
1	20		0.027944	0.001091	0.000179
2	180	0.027944		0.051129	0.004744
3	200	0.001091	0.051129		0.153226
4	215	0.000179	0.004744	0.153226	

LSD test; variable ug <i>Metionina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error:					
Between MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .00790	{2} - .00565	{3} - .00565	{4} - .00554
1	20		0.116708	0.116042	0.102365
2	180	0.116708		0.997093	0.933744
3	200	0.116042	0.997093		0.936639
4	215	0.102365	0.933744	0.936639	

LSD test; variable ug <i>Fenilalanina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .02320	{2} - .01267	{3} - .01215	{4} - .00916
1	20		0.000000	0.000000	0.000000
2	180	0.000000		0.148815	0.000005
3	200	0.000000	0.148815		0.000017
4	215	0.000000	0.000005	0.000017	

LSD test; variable ug <i>Isoleucina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .01260	{2} - .00826	{3} - .00696	{4} - .00567
1	20		0.000007	0.000001	0.000000
2	180	0.000007		0.016357	0.000306
3	200	0.000001	0.016357		0.016497
4	215	0.000000	0.000306	0.016497	

LSD test; variable ug <i>Leusina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .02680	{2} - .01681	{3} - .01470	{4} - .01186
1	20		0.000041	0.000010	0.000002
2	180	0.000041		0.126532	0.003952
3	200	0.000010	0.126532		0.050922
4	215	0.000002	0.003952	0.050922	

LSD test; variable ug <i>Lisina</i> (datos) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 8.0000					
	T	{1} - .02160	{2} - .00935	{3} - .00771	{4} - .00513
1	20		0.000011	0.000004	0.000001
2	180	0.000011		0.232311	0.010529
3	200	0.000004	0.232311		0.077056
4	215	0.000001	0.010529	0.077056	

ANEXO 09: Puntos porcentuales del estadístico del rango studentizado, $F_{0.05, v_1, v_2}(p, f)$

Grados de libertad del numerador v_1																			
f	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	18.1	26.7	32.8	37.2	40.5	43.1	45.4	47.3	49.1	50.6	51.9	53.2	54.3	55.4	56.3	57.2	58	58.8	59.6
2	6.09	8.28	9.8	10.9	11.7	12.4	13	13.5	14	14.4	14.8	15.1	15.4	15.7	15.9	16.1	16.4	16.6	16.8
3	4.5	5.88	6.83	7.51	8.04	8.47	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.2	10.4	10.5	10.7	10.8	11	11.1	11.2
4	3.93	5	5.76	6.31	6.73	7.06	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.67	8.80	8.92	9.03	9.14	9.24
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.6	7.72	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21
6	3.46	4.34	4.9	5.31	5.63	5.89	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.04	7.14	7.24	7.34	7.43	7.51	7.59
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.35	5.59	5.80	5.99	6.15	6.29	6.42	6.54	6.65	6.75	6.84	6.93	7.01	7.08	7.16
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87
9	3.2	3.95	4.42	4.76	5.02	5.24	5.43	5.60	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28	6.36	6.44	6.51	6.58	6.65
10	3.15	3.88	4.33	4.66	4.91	5.12	5.3	5.46	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.12	6.20	6.27	6.34	6.41	6.47
11	3.11	3.82	4.26	4.58	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98	6.06	6.14	6.20	6.27	6.33
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.40	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21
13	3.06	3.73	4.15	4.46	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79	5.86	5.93	6.00	6.06	6.11
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36	5.46	5.56	5.64	5.72	5.79	5.86	5.92	5.98	6.03
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65	5.72	5.79	5.8	5.91	5.96
16	3.00	3.65	4.05	4.34	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90
17	2.98	3.62	4.02	4.31	4.52	4.7	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.55	5.61	5.68	5.74	5.79	5.84
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.83	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79
19	2.96	3.59	3.98	4.26	4.47	4.64	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.32	5.39	5.46	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75
20	2.95	3.58	3.96	4.24	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43	5.50	5.56	5.61	5.66	5.71

Fuente: Gutiérrez, 2008

ANEXO 10: Puntos críticos para la distribución T de Student

Grados de libertad	Área a la derecha de los puntos, $p(X > x)$			
	0.1	0.05	0.025	0.015
1	3.0776835	6.3137515	12.706205	21.204949
2	1.8856181	2.9199856	4.3026527	5.6427784
3	1.6377444	2.3533634	3.1824463	3.8960459
4	1.5332063	2.1318438	2.7764451	3.2976297
5	1.475884	2.0150484	2.5705818	3.002875
6	1.4397557	1.9431803	2.4469119	2.8289279
7	1.4149239	1.8945786	2.3646243	2.714573
8	1.3968153	1.859548	2.3060041	2.6338144
9	1.3830287	1.8331129	2.2621572	2.573804
10	1.3721836	1.8124611	2.2281389	2.5274842
11	1.3634303	1.7958848	2.2009852	2.4906639
12	1.3562173	1.7822876	2.1788128	2.4607002
13	1.3501713	1.7709334	2.1603687	2.4358452
14	1.3450304	1.7613101	1.1447867	2.4148977
15	1.3406056	1.7530504	2.1314495	2.397005
16	1.3367572	1.7458837	2.1199053	2.3815454
17	1.3333794	1.7396067	2.1098156	2.3680548
18	1.3303909	1.7340636	2.100922	2.35618
19	1.3277282	1.7291328	2.0930241	2.3456475
20	1.3253407	1.7247182	2.0859634	2.3632422
21	1.3213879	1.7207429	2.0796138	2.3277923
22	1.3212367	1.7171444	2.0738731	2.3201596
23	1.3194602	1.7138715	2.0686576	2.313231
24	1.3178359	1.7108821	2.0638986	2.3069134
25	1.3163451	1.7081408	2.0595386	2.3011295
26	1.3149719	1.7056197	2.0555294	2.2958145
27	1.3137029	1.7032884	2.0518305	2.2909136
28	1.3125268	1.7011309	2.0484071	2.2863802
29	1.3114336	1.699127	2.0452296	2.2821746
30	1.310415	1.6972609	2.0422725	2.2782623

Fuente: Gutiérrez, 2008

Anexo 11: Proceso de análisis cromatográfico PHLC

Acondicionamiento de la muestra



Muestra hidrolizada



Equipo Cromatográfico líquido de alto rendimiento (HPLC)





Columna para y guarda columna el HPLC



Guarda columna



Cámara de lectura del HPLC

