

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS, FARMACEÚTICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“Fraccionamiento, caracterización y cuantificación de proteínas de reserva presentes en semillas de *Salvia hispánica L.* (chía) en comparación con *Linum usitatissimum* (linaza) y *Chenopodium quinoa* (quinua).”**

**TESIS PRESENTADA POR LAS BACHILLER**

Delgado Lazo, Andrea Graciela

Pinto Díaz, Milagros Mariann

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

Ingeniera Biotecnóloga

**ASESOR:**

Dr. José Villanueva Salas

AREQUIPA – PERÚ

2015

## Dedicatoria

A mis papás que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, se preocuparon de mí desde el momento en que llegué a este mundo, me siguen formando para conocer lo bueno y lo malo de esta vida, me apoyan en todos los aspectos y es por ellos que obtengo este nuevo logro por lo que me siento muy agradecida.

Los quiero mucho

Andrea



### *Dedicatoria*

*La presente tesis se la dedico a mis padres, que con este logro quiero devolverles un poco de todo lo que me han dado. A mi padre, Miguel al cual amo, que con su apoyo brindado en todo este tiempo fue posible terminar mis estudios superiores dándome ejemplo de lucha y superación. A mi madre Soraya, que siempre creyó en mí dándome su apoyo, paciencia y comprensión en los momentos buenos y malos aconsejándome para ser una mejor persona; jamás olvides lo mucho que te amo.*

*Gracias por su apoyo y amor*

*Miñi*



## Agradecimientos

A Dios por acompañarme todos los días.

A mi maíta y a mi papito por darme una carrera para mi futuro, todo esto se los debo a ustedes , porque están conmigo y me apoyan siempre.

A mi mamá Andrea por cuidarme y querer lo mejor para mi hermano y para mí.

A mi hermano por ser como es y que se que siempre estaremos el uno para el otro en lo que necesitemos.

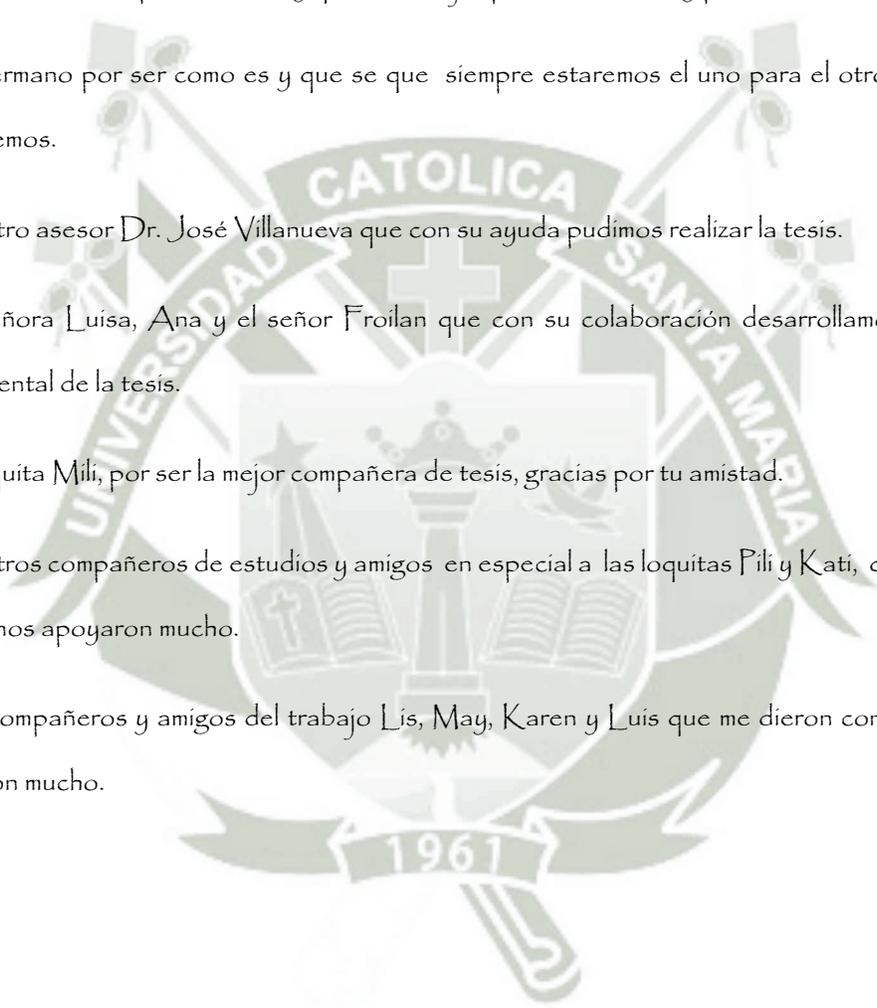
A nuestro asesor Dr. José Villanueva que con su ayuda pudimos realizar la tesis.

A la señora Luisa, Ana y el señor Froilan que con su colaboración desarrollamos la parte experimental de la tesis.

A la loquita Mili, por ser la mejor compañera de tesis, gracias por tu amistad.

A nuestros compañeros de estudios y amigos en especial a las loquitas Pili y Kati, que con sus ánimos nos apoyaron mucho.

A mis compañeros y amigos del trabajo Lis, May, Karen y Luis que me dieron consejos y me ayudaron mucho.



## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ser guía y darme la oportunidad de cumplir mis metas, por ayudarme a levantar y superar caídas y obstáculos a lo largo de mi vida

A mis padres (**Miguel y Soraya**) por el apoyo, amor y ayuda incondicional.

A mi abuelito (**Juan**) que desde el cielo me sigue cuidando y acompañando en todo momento

A mi **lela**, mi abuelita, que siempre tuvo paciencia, comprensión y buenos consejos. Te amo

A mis hermanos (**Juan Miguel y Marbela**) por su compañía y por hacerme reír siempre.

A mi tía **Nanito** por el apoyo y ayuda en los momentos de tensión, te quiero mucho

A toda mi familia: mi tía **Made**, mi tío **Carlos**; mis abuelitos **Alberto y Vilma** porque cada uno me dio un ejemplo para terminar este trabajo.

Al Dr. José Villanueva, por su asesoría y colaboración para la culminación de este trabajo ofreciendo sus conocimientos para mejorar profesionalmente

A mi compañera de tesis **Andrea** por su paciencia, responsabilidad y sobre todo por su buena amistad.

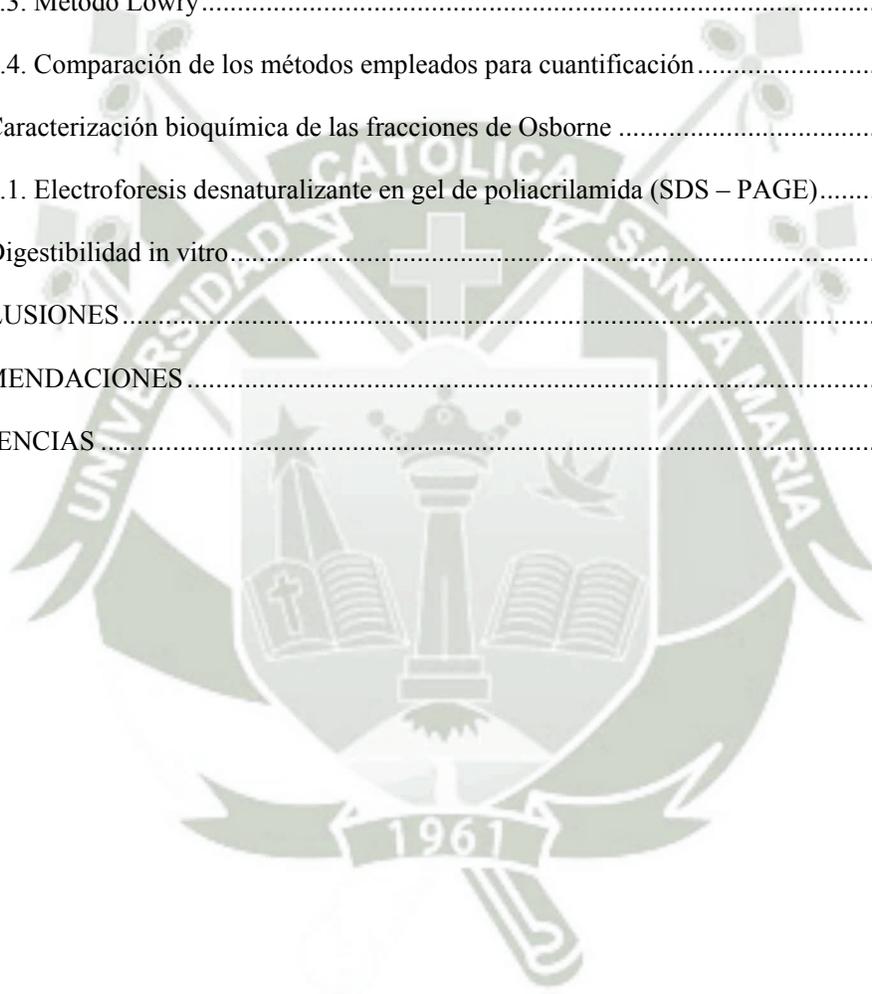
A mis amigas, **Kathy B., Karlita A., Andrea D. y Pily G.** porque "tenemos el mismo daño mental" gracias por su amistad, y los buenos momentos. Las quiero mucho.

## Índice de contenidos

RESUMEN.....	14
ABSTRACT .....	16
CAPÍTULO I: GENERALIDADES .....	18
1.1 INTRODUCCIÓN.....	18
1.2 OBJETIVOS .....	20
1.2.1. Objetivo General .....	20
1.2.2. Objetivos Específicos .....	20
1.3. HIPÓTESIS.....	21
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	22
2.1. Chía ( <i>Salvia hispánica L.</i> ) .....	22
2.1.1 Antecedentes históricos .....	22
2.1.2. Datos del cultivo.....	22
2.1.3. Descripción de la planta.....	23
2.1.4. Importancia del cultivo .....	24
2.2. Linaza ( <i>Linum usitatissimum</i> ).....	26
2.2.1. Antecedentes históricos .....	26
2.2.2. Datos del cultivo.....	26
2.2.3. Descripción de la planta.....	27
2.2.4 Importancia del cultivo .....	28
2.3. Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> ).....	29
2.3.1. Antecedentes históricos .....	29
2.3.2. Datos del cultivo.....	30
2.3.3. Descripción de la planta.....	31
2.3.4. Importancia del cultivo .....	31
2.4. PROTEÍNAS .....	33

2.4.1. Proteínas de reserva .....	33
2.4.1.1 Albúminas .....	34
2.4.1.2 Glutelinas .....	34
2.4.1.3 Prolaminas .....	34
2.4.1.4 Globulinas .....	35
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
3.1 MATERIALES .....	36
3.1.1. Ambientes a utilizar .....	36
3.1.2. Materiales biológicos .....	36
3.1.3. Equipos .....	36
3.1.3. Reactivos .....	37
3.1.4 Material de vidrio .....	39
3.1.5 Otros .....	40
3.2. MÉTODOS .....	40
3.2.1 Esquema general de trabajo .....	40
3.2.2 Obtención de harina .....	42
3.2.3. Desgrasado de harina por sistema Soxhlet .....	42
3.2.4. Fraccionamiento secuencial de las proteínas de reserva de semillas de chíá, linaza y quinua .....	42
3.2.5. Cuantificación Proteínica .....	43
3.2.5.1. Método de Biuret .....	43
3.2.5.2. Método de Bradford .....	44
3.2.5.3. Método de Lowry .....	45
3.2.6. Caracterización Bioquímica .....	48
3.2.6.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) .....	48
3.2.7. Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	48
3.2.8. Análisis estadístico .....	49

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
4.1. Desgrasado de harina por sistema Soxhlet.....	50
4.2. Fraccionamiento de las proteínas de reserva en semillas.....	52
4.3. Cuantificación de proteínas reserva por métodos colorimétricos.....	54
4.3.1. Método de Biuret.....	54
4.3.2. Método Bradford .....	59
4.3.3. Método Lowry.....	64
4.3.4. Comparación de los métodos empleados para cuantificación.....	68
4.2. Caracterización bioquímica de las fracciones de Osborne .....	70
4.2.1. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE).....	70
4.3. Digestibilidad in vitro.....	72
CONCLUSIONES.....	76
RECOMENDACIONES.....	78
REFERENCIAS.....	79



## Índice de Tablas

Tabla N° 1: Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas. ....	47
Tabla N° 2: Porcentajes de grasa en muestras de semillas molidas. ....	51
Tabla N° 3: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de chí. Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar .....	56
Tabla N° 4: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de quinua. Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar .....	56
Tabla N° 5: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de chí. Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar .....	57
Tabla N° 6: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de chí usando el método Bradford. ....	61
Tabla N° 7: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de quinua usando el método Bradford. ....	62
Tabla N° 8: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de linaza usando el método Bradford. ....	62
Tabla N° 9: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de chí usando el método Lowry .....	66
Tabla N° 10: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de quinua usando el método Lowry .....	66
Tabla N° 11: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de linaza usando el método Lowry .....	67
Tabla N° 12: Comparación de los datos obtenidos en los tres métodos empleados para cuantificación. ....	69
Tabla N° 13: Primera medida de la caída del pH .....	73
Tabla N° 14: Segunda medida de la caída del pH .....	73
Tabla N° 15: Tercera medida de la caída del pH .....	73
Tabla N° 16: Resultados de digestibilidad in vitro de harina de semilla de chí, quinua y linaza ..	74
Tabla N° 17: Masas de los balones con grasa de las 3 repeticiones .....	84
Tabla N° 18: Promedio y desviación estándar del % de grasa de cada semilla. ....	100

Tabla N° 19: Análisis de varianza a partir de los promedios de % de grasa. ....	100
Tabla N° 20: Obtención del valor de HSD.....	101
Tabla N° 21: Diferencia significativa entre el contenido de grasa de cada harina de semilla. ....	101
Tabla N° 22: Promedios y desviación estándar del contenido de albúminas. ....	102
Tabla N° 23: Análisis de varianza del contenido de albúminas en cada semilla. ....	102
Tabla N° 24: Promedio y desviación estándar del contenido de globulinas.....	103
Tabla N° 25: Análisis de varianza del contenido de globulinas. ....	103
Tabla N° 26: Obtención del valor de HSD.....	103
Tabla N° 27: Diferencia significativa de los promedios del contenido de globulinas en harina de semillas de chía, quinua y linaza. ....	104
Tabla N° 28: Promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de prolaminas. ....	104
Tabla N° 29: Análisis de varianza del contenido de prolaminas. ....	104
Tabla N° 30: Valor de HSD. ....	105
Tabla N° 31: Diferencia significativa del contenido de prolaminas en semillas de chía, quinua y linaza.....	105
Tabla N° 32: Promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de glutelinas. ....	106
Tabla N° 33: Análisis de varianza. ....	106
Tabla N° 34: Obtención valor de HSD. ....	107
Tabla N° 35: Diferencia significativa entre el contenido de glutelinas.....	107
Tabla N° 36: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH. ....	108
Tabla N° 37: Análisis de varianza. ....	108
Tabla N° 38: Obtención valor de HSD. ....	109
Tabla N° 39: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH. ....	109

Tabla N° 40: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH .....	109
Tabla N° 41: Análisis de varianza .....	110
Tabla N° 42: Obtención del valor de HSD.....	110
Tabla N° 43: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH .....	111
Tabla N° 44: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH .....	111
Tabla N° 45: Análisis de varianza .....	112
Tabla N° 46: Obtención del valor de HSD.....	112
Tabla N° 47: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH .....	112



## Índice de Figuras

Figura N° 1: Chía ( <i>Salvia hispánica L.</i> ) A. Dimensiones de la semilla B. Semilla seca entera, C. Semilla seca entera blanca y negra D. Flor, E. Semillas incluidas en el cáliz. (6) .....	25
Figura N° 2: Linaza ( <i>Linum usitatissimum.</i> ) A. Flor B. semilla seca entera, C. Semilla seca entera y aceite de linaza. (13). .....	28
Figura N° 3: Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> ) A. Planta B. Fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro C. Semillas de quinoa y sus diferentes colores.....	32
Figura N° 4: Esquema de la metodología del proyecto. ....	41
Figura N° 5: Reacción de Biuret. ....	44
Figura N° 6: Molécula del Azul de Coomassie.....	45
Figura N° 7: Reacción entre la proteína y los reactivos. ....	46
Figura N° 8: Ecuación de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	49
Figura N° 9: Equipo Soxhlet.....	50
Figura N° 10: Ecuación del porcentaje de grasa. ....	52
Figura N° 11: Fracciones proteicas obtenidas a partir del método de Osborne. A) albúminas, B) globulinas, C) prolaminas, D) glutelinas. ....	53
Figura N° 12: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína usando el método de Biuret. ....	54
Figura N° 13: BSA (10 mg/ mL) a diferentes concentraciones, mostrando presencia de proteínas con el método colorimétrico de Biuret.....	55
Figura N° 14: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chía, linaza y quinoa usando el método Biuret. ....	58
Figura N° 15: Interferencia presentada con SDS 1% en el método de Bradford utilizado en la extracción de glutelinas.....	60

Figura N° 16: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína. Albúmina de Suero Bovino (BSA) a una concentración de 0; 0.150; 0.300; 0.350; 0.400; 0.450 y 0.500 mg/mL a una longitud de onda de 520 nm. ....	60
Figura N° 17: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chía, linaza y quinua usando el método Bradford. ....	63
Figura N° 18: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína por el método de Lowry. Albúmina de Suero Bovino (BSA) a una concentración de 0; 0.05; 0.150; 0.250; 0.350; 0.450 y 0.600 mg/mL a una longitud de onda de 520 nm. ....	64
Figura N° 19: BSA (2 mg/mL) a diferentes concentraciones, mostrando presencia de proteínas con el método colorimétrico de Lowry. ....	65
Figura N° 20: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chía, linaza y quinua usando el método Lowry. ....	67
Figura N° 21: Cuadro comparativo de los métodos empleados para cuantificación de proteínas. Barras azules M. de Biuret; barras rojas M. de Bradford; barras verdes M. de Lowry. ....	68
Figura N° 22: Perfil electroforético de Osborne. Análisis SDS-PAGE de proteínas de reserva de semillas de chía, linaza y quinua. ....	71
Figura N° 23: Marcador molecular See Blue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard, con un rango de 4 a 250 kDa. ....	72

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se realizó el fraccionamiento, cuantificación y caracterización de proteínas de reserva en semillas de chíá (*Salvia hispánica L.*), variedad negra; linaza (*Linum usitatissimum*), variedad marrón y quinua (*Chenopodium quinoa*), variedad INIA Salcedo.

Primero se hizo la extracción de aceite a partir de las semillas pulverizadas mediante el método de Soxhlet realizando 20 reflujos con una duración de 10 minutos cada uno, usando como solvente el hexano. Los resultados obtenidos mostraron que la quinua presenta menor porcentaje de grasa (8.25 %), seguida de chíá (24.45 %) y finalmente linaza con mayor porcentaje de grasa (26.45 %).

Posteriormente se fraccionaron las proteínas de reserva: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas de las respectivas semillas utilizando el método de Osborne modificado; método sencillo donde la temperatura, pH, tiempo y velocidad de centrifugación juegan un papel importante en el proceso de fraccionamiento proteico.

Luego se procedió a ejecutar la cuantificación de las fracciones proteicas usando métodos colorimétricos tal como la reacción de Biuret, donde la absorbancia de cada muestra fue leída a 540 nm; Bradford fue el siguiente método donde la lectura se hizo a 595 nm, finalmente se realizó el método de Lowry en el cual las absorbancias fueron leídas a 500 nm. Los resultados obtenidos demostraron que tanto la chíá como la linaza presentan cantidades similares de proteínas de reserva con fracción mayoritaria a las glutelinas en comparación a los valores presentados por la quinua. Por las ventajas que tiene el método de Biuret y los resultados mostrados se puede decir que es el más óptimo respecto a cuantificación proteica ya que los otros dos métodos presentaron interferencias e inconvenientes.

Por último se efectuó la caracterización de las proteínas de reserva de las diferentes semillas mediante electroforesis SDS-PAGE que confirmó la presencia de glutelinas como fracción mayoritaria para las tres semillas. Se usó como marcador molecular See Blue® Plus2 Pre-stained Protein Standard para la lectura de los pesos moleculares, consiguiendo bandas comprendidas entre 10 y 20 kDa. como resultado para la fracción proteica mayoritaria.

Se concluyó que las semillas de chía (*Salvia hispánica L.*) al igual que las semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) presentan mayor contenido de proteínas de reserva (glutelinas), demostrando sus altos valores proteicos por encima de las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*), lo que significa que la chía y la linaza son una excelente opción natural como alimento y fuente nutritiva.

**Palabras Clave:** Chía (*Salvia hispánica L.*), Quinua (*Chenopodium quinoa*), Linaza (*Linum usitatissimum*), proteína de reserva, albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas.



## ABSTRACT

In the present research was carried out fractionation, quantification and characterisation of proteins of reservation in seeds of chia (*Salvia hispanica l.*), black variety; Flaxseed (*Linum usitatissimum*), common variety and quinoa (*Chenopodium quinoa*), INIA Salcedo variety.

First was the extraction of oil from the seeds powdered using Soxhlet performing 20 ebbs with a duration of 10 minutes each, using as solvent hexane. The results showed that quinoa has a lower percentage of fat (8.25%), followed by chia (24.45%) and finally the flaxseed with a higher percentage of fat (26.45%).

Is subsequently divided the reserve proteins: albumins, globulins, prolamins and glutelinas of the respective seeds using the method of modified Osborne; simple method where the temperature, pH, time and speed of centrifugation play an important role in the process of protein fractionation.

Then proceeded to execute the quantification of protein fractions using such as the Biuret reaction colorimetric methods, where the absorbance of each sample was read at 540 nm; Bradford was the following method where the reading is made at 595 nm, finally was the method of Lowry in which the absorbances were read at 500 nm. The results showed that both the chia and flaxseed have similar amounts of reserve with majority fraction to the glutelinas proteins in comparison to the values presented by the quinoa. Because of the advantages that has the Biuret method and the results shown is that it is the most optimal for protein quantification since other methods presented interference and inconvenience.

Lastly was the characterization of the proteins of the different seed reserve by SDS-PAGE electrophoresis that confirmed the presence of glutelinas as a majority fraction for three seeds. It was used as a molecular marker See Blue® Plus2 Pre-stained Protein Standard for the reading of the molecular weights, getting bands ranging from 10 to 20 kDa. as a result for the majority protein fraction.

Concluded that chia seed (*Salvia hispanica l.*) like flax seeds (*Linum usitatissimum*) have higher content of reserve (glutelinas) proteins, demonstrating their high protein values above

the quinoa seeds (*Chenopodium quinoa*), which means that the chia and flax are an excellent natural food and nutrient source option.

**KEY WORDS:** Chía (*Salvia hispánica L*), Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Flax (*Linum usitatissimum*), reserve protein, albumins, globulins, prolamins, glutelins



## CAPÍTULO I: GENERALIDADES

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Las semillas de cereales y pseudocereales como la chía, quinua y linaza consideradas cultivos de las sociedades precolombinas de la región, por las virtudes que tienen fueron importantes en la alimentación de los Aztecas y Mayas, Incas y Egipcios pero quedaron al olvido con el paso del tiempo. A principios de este siglo y gracias a los trabajos de investigación realizados se considera en la actualidad a las semillas de chía, quinua y linaza como alimentos superiores a los de las dietas actualmente consumidas por su gran contenido proteínico, además de antioxidantes y ácidos grasos.

La cantidad de estudios acerca de las propiedades y beneficios nutricionales de la chía, quinua y linaza están creciendo rápidamente alrededor de todo el mundo, tales como los realizados acerca de las proteínas de reserva que son especialmente importantes en la alimentación humana debido a que determinan el contenido de proteína total en las semillas, además de la calidad proteica aunque aún son un tanto escasos, sin embargo se sabe que tienen mayor contenido proteico que cualquier otro grano, esto ayuda a que debido al incremento de la población se tengan nuevas fuentes alternativas de proteínas de gran calidad.

Por lo anteriormente expuesto, es necesario efectuar trabajos de investigación de interés biotecnológico que ayuden a fomentar conocimiento más amplio y profundo acerca de las características bioquímicas y nutricionales de las proteínas de reserva tanto de chía, quinua y linaza para lo que se desgrasó, fraccionó, cuantificó y caracterizó estas proteínas de reserva que contienen las semillas, además de comparar cuál de ellas es la que tiene mayor contenido de proteína y mejor digestibilidad para así aprovechar los beneficios de estas semillas.

Debido a que se tiene información limitada acerca de su composición y siendo un producto innovador en cuanto a alimentación ya que se utiliza como ingrediente para el pan, barras energéticas, suplementos dietéticos, en la elaboración de dietas para animales, entre otros usos; es por tal razón que la chía (*Salvia hispánica L.*) es una

semilla que se puede aprovechar para conocer y considerar las propiedades que estas proteínas podrían contribuir en cuanto a calidad proteica comparando con otro tipo de semillas tales como las de quinua (*Chenopodium quinoa*) y linaza (*Linum usitatissimum*); semillas que también se conocen como productos nuevos y con altos contenidos alimenticios. Además de la predilección actual de las personas relacionada al consumo de alimentos ricos en proteínas, ácidos grasos y antioxidantes, favorables para la salud, se busca alimentos que tengan un buen balance nutricional y puedan ser de utilidad para la industria alimentaria, mejorando la nutrición humana y fomentando nuevas tecnologías para el aprovechamiento de proteínas vegetales.

Por lo tanto este trabajo se realizó para dar a conocer la calidad y cantidad de proteínas que se encuentran en las semillas de chía, linaza y quinua; aplicando una tecnología sencilla en lo que respecta a su cuantificación e innovación respecto a la caracterización de las proteínas de reserva y así aprovechar productos naturales con altos niveles proteicos, y evitar el uso de productos artificiales. En relación a la medicina se puede destacar las propiedades conocidas que la semilla de chía tiene ya que gracias a su alto contenido de proteínas ayuda a construir y regenerar músculos y tejidos además de disminuir de peso, generan aporte extra de energía, tiene propiedades depurativas y antioxidantes, disminuyen el colesterol y muchas otras más. En el caso de la quinua es un alimento ideal para las personas con diabetes, controla los niveles de colesterol y tiene los nueve aminoácidos esenciales y finalmente la linaza que sobre la calidad de proteína es considerada una de las mejores de tipo vegetal además que tiene beneficios preventivos en la salud cardiovascular, reduce los niveles de colesterol LDL en sangre.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo General

- Fraccionar, caracterizar y cuantificar proteínas de reserva en semillas de chía (*Salvia hispánica L.*), en comparación con linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Desgrasar la harina de semillas de chía (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*) utilizando el método de Soxhlet.
- Fraccionar proteínas de reserva: globulinas, albúminas, prolaminas, glutelinas de chía (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).
- Cuantificar las proteínas de reserva utilizando los métodos colorimétricos tales como: Biuret, Bradford, Lowry.
- Caracterizar las proteínas de reserva utilizando electroforesis desnaturalizante (SDS-page).
- Evaluar la digestibilidad *in vitro* de la harina de semillas de chía (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).
- Comparar la calidad y cantidad de proteínas de reserva presentes en semillas de chía (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).

### 1.3. HIPÓTESIS

Dado que existen referencias que chíá (*Salvia hispánica L.*) es una semilla con gran contenido proteico es probable que esta tenga mejor calidad y cantidad de proteínas de reserva en comparación con linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*).



## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Chía (*Salvia hispánica L.*)

La chía es originaria de Mesoamérica y la mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico, desde México hasta Guatemala. La chía es un cereal que pertenece a la familia *Labiatae*, considerado un pseudocereal; que comprende aproximadamente 512 especies en todo el país (1). Se sabe que en México se encuentra el 88% de las especies de *Salvia* lo que hace pensar que este país es el centro de origen de esta planta (2). Se conocen dos géneros: *hyptis* y *Salvia* de la cual sobresale *Salvia hispánica L.* que es la variedad que se comercializa (3)

#### 2.1.1 Antecedentes históricos

La palabra Chía viene del náhuatl, lenguaje de los aztecas, cuyo significado es “aceitoso”. Usada por muchas civilizaciones para propósitos religiosos, alimentación y como materia prima para medicamentos y colores. (4). Después de la conquista española sobre México la chía probablemente se introdujo en España en 1521. Era tal la importancia que las semillas se ofrecían a los dioses en ceremonias religiosas, que en la conquista consideraron un sacrílego esta acción y persiguieron el uso hasta prácticamente su desaparición, únicamente logro sobrevivir en áreas montañosas de México, Guatemala y Nicaragua (5).

Fue el famoso botánico Karl Linnaeus (1707-1778), quien dio su nombre científico a la chía. “*Salvia hispánica L.*” La chía ha crecido desde entonces en España de manera silvestre y aislada y se creía erróneamente que era oriunda de esta nación.

#### 2.1.2. Datos del cultivo

El género *Salvia* cuenta con más de mil especies en todo el mundo. México es considerado el país de mayor diversidad de este género, con aproximadamente 300 especies, *Salvia hispánica* es la más abundante. La planta se adapta a suelos arcillosos

y arenosos los cuales debe de tener un buen drenaje, se distribuyen en ambientes semicálidos y templados; sin embargo, bajos niveles de nitrógeno pueden lograr muy buenos rendimientos. Esta planta no tolera las heladas. (6). En estos últimos tiempos se ha empezado a cultivar a nivel mundial como en Argentina, Ecuador, Bolivia y en Perú.

Perú es uno de los países que tiene gran cantidad de suelos y climas lo cual contribuye perfectamente a una buena producción en temporadas de verano-otoño. Sin embargo a pesar de las características sobresalientes de la chía no hay muchos estudios que ofrecen información de su producción y distribución en el mundo. Algunos estudios de la Universidad Agraria, reveló que este producto es originario de Centroamérica y que desapareció tras la llegada de los españoles al Perú. Sin embargo, diferentes trabajos de investigación indican que también fue cultivado por los incas, ya que en ciertas partes del Perú se dan las condiciones para su crecimiento.

Se puede decir que actualmente se están realizando investigaciones de la siembra y producción del producto, en un espacio de 1.000 metros cuadrados. Al ser un producto que crece en climas cálidos, su siembra es fácil en partes de la costa y sierra del Perú, lo que explica cómo pudieron también los Incas cultivarla. Además de que se están empezando nuevos planes agrícolas para promover la producción de chía.

### **2.1.3. Descripción de la planta**

La chía es una planta herbácea de crecimiento anual de la familia de las lamiaceas. Las plantas que pertenecen a esta familia se caracterizan por poseer en todas las partes de la planta aceites esenciales muy aromáticos. Pertenecen a esta familia especias aromáticas conocidas como la menta, el orégano, la chía y el romero. El nombre labiadas o lamiaceas se debe a la peculiar forma de la flor, con apariencia de “labios”. La chía es una planta arbustiva, que mide entre 1 metro y 1,5 metros de altura. El tallo es cuadrangular, sus hojas son ovaladas y están unidas al tallo por el peciolo, son de color verde oscuro y presentan en la parte posterior pubescencia, es decir, una vellosidad que retiene la humedad. Las flores son de color morado, azul o blanco; es monopétala y hermafrodita (figura N° 1D). El fruto de la planta lleva cuatro semillas

muy pequeñas en forma oval (figura N° 1E), cuyas dimensiones oscilan entre 21 mm de largo y 1,4 de ancho (figura N° 1A), son brillantes de color grisáceo con manchas rojizas irregulares (figura N° 1B). En la chía blanca las flores como las semillas son de color blanco (figura N° 1C). (7)

#### **2.1.4. Importancia del cultivo**

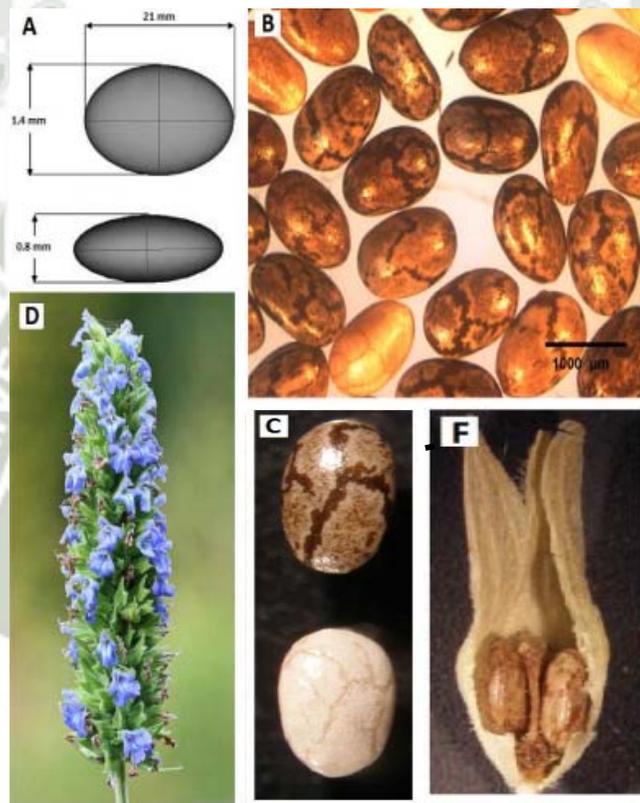
La semilla de chía hoy en día se ha convertido en una fuente potencial de nutrientes para la industria alimentaria humana y animal. Aunque no es un alimento muy conocido, la producción mundial está aumentando cada día más debido a sus propiedades es por eso que la semilla de la chía es conocida como un alimento exótico y se le atribuyen cualidades nutricionales y terapéuticas de alto valor.

La semilla entera se usa en la preparación de bebidas nutritivas y refrescantes, con el aceite se elaboran lacas artesanales y en algunos países se usan para el tratamiento del hígado. También se han comprobado efectos positivos en la reducción de tumores como el de mama o el de colon; también en enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, es decir al corazón, al cerebro y los vasos sanguíneos (8).

Las últimas investigaciones sobre la chía dicen que poseen mayor contenido de aceite que otros granos (40% del peso total de la semilla), se han realizado varios estudios sobre su composición de ácidos grasos omega-3; esenciales en la alimentación y efectivos para disminuir afecciones cardiovasculares colesterol y triglicéridos (9). Los aceites esenciales pueden usarse en la industria de fragancias y saborizantes. También se ha ensayado la inclusión de semillas en la alimentación animal; demostrando que los ácidos grasos saturados y el colesterol presente en huevos de gallinas alimentadas con granos de chía se reducen, sin afectar el sabor. Los antioxidantes naturales del aceite evitan los procesos oxidativos en alimentos. Estos antioxidantes presentes en la chía (miricetina, kaemperol, ácido clorogénico y ácido cafeico) sustituyen el uso de estabilizadores artificiales (10).

La chía también posee un polisacárido con alto contenido de ácido urónico, que se comporta como mucílago con una alta capacidad de retención de agua, útil como fibra soluble y dietética. Más allá del excelente perfil lipídico, las semillas de chía contienen

cantidad de proteínas y aminoácidos que los granos usados tradicionalmente en países de América. Tiene un contenido proteico entre 19 – 23 % en comparación a otros granos como la cebada (9 %), avena (15,3 %); y posee 18 aminoácidos de los 10 aminoácidos esenciales. Estos aspectos han logrado el interés por la *Salvia hispánica*, introduciendo su producción y consumo en países de Latinoamérica, Estados Unidos, y Australia (productos alimenticios y medicinales, galletas y barras nutritivas). (11)



**Figura N° 1: Chía (*Salvia hispánica* L.) A. Dimensiones de la semilla B. Semilla seca entera, C. Semilla seca entera blanca y negra D. Flor, E. Semillas incluidas en el cáliz.**

(6)

Extraído de: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/654/1/RI000267.pdf>

## 2.2. Linaza (*Linum usitatissimum*)

La linaza es una buena fuente de grasa vegetal omega-3, fibra dietética y otros nutrientes. Su composición nutricional la distingue de otras oleaginosas importantes como la canola y el girasol. La linaza es una pequeña semilla proveniente de la planta de lino con sorprendentes propiedades benéficas para la salud, las cuales se deben a su gran cantidad de fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados y fitoquímicos como los lignanos (12)

### 2.2.1. Antecedentes históricos

Desde el principio de la civilización los humanos han consumido la linaza. Antes del año 5000 A.C., los egipcios llevaron la linaza en sus bolsos médicos. La linaza comestible era predominantemente cultivada en India, es consumida en la dieta como aceite en China, en Etiopía en un guisado (wat), como una avena (gufmo), y como una bebida (chilka), y ha sido la parte de la comida tradicional en Egipto desde el tiempo de los Faraones.

### 2.2.2. Datos del cultivo

El nombre botánico de la linaza es *Linum usitatissimum* de la familia *Linaceae* considerado como un pseudocereal. La linaza es un cultivo de flor azul con semillas que son utilizadas para alimentación humana y animal, son cosechadas y posteriormente tamizadas a través de una malla fina, lo que resulta en un conjunto uniforme de semillas enteras (consideradas 99.9 % puras).

Requiere de suelos bien preparados (suelos), de profundidad media (30 – 40 cm.) y mezclada con buena cantidad de abonos (compost, humus de lombriz, etc.) Las mejores condiciones ambientales para su crecimiento se presentan en climas templados - fríos (donde las temperaturas mínimas son de 12 °C y las máximas de 20 °C.), es decir a finales de otoño, invierno y comienzos de primavera.

Como el producto a cosechar son los granos secos se va a requerir de abundante cantidad agua durante el crecimiento del cultivo hasta la formación del fruto, en especial durante la floración y llenado del fruto, debido a la carencia de este elemento puede reducir la producción. Luego, se debe de cortar el riego para que todos los nutrientes de la planta empiecen a migrar hasta las semillas.

Una condición importante para la formación y llenado de los granos se debe a la iluminación de la planta durante todo su periodo de crecimiento, debido a lugares iluminación de la planta durante todo su periodo de crecimiento, lugares oscuros puede ocasionar que las flores no cuajen y caigan al suelo. La cosecha se realiza manualmente extrayendo los frutos secos. Cada planta puede producir entre 6-12 frutos; para obtener las semillas se debe de aplastar los frutos secos y ponerlos cerca de corrientes de aire para que las cáscaras y pajas se separen de las semillas. La parte comestible de las plantas son los granos maduros y secos, estos se consumen en emolientes o en otras bebidas.

### **2.2.3. Descripción de la planta**

Planta anual con tallos huecos de hasta 80 cm, erectos, estriados, generalmente sólo ramificados en la mitad superior. La inflorescencia está compuesta por flores de color azul (figura N° 2A). La semilla de linaza es plana y ovalada con un borde puntiagudo. Es un poco más grande que la semilla de sésamo y mide entre 4 y 6 mm. La semilla tiene una textura tostada y tiene un agradable sabor a nuez.

Las semillas de linaza pueden variar de color desde café-oscuro hasta amarillo claro (figura N° 2B). El color de la semilla se determina a través de la cantidad de pigmento en la cubierta exterior de la semilla: entre más pigmentación, más oscura es la semilla.

La semilla de linaza de color café que es rica en ácido alfa-linolénico (AAL), el cual es un ácido graso omega-3 (figura N° 2C), es la semilla de linaza que más comúnmente se produce en Canadá. La semilla de linaza de color amarillo puede ser de dos tipos. El primer tipo, es una variedad desarrollada en los EE.UU.

denominada Omega, la cual es tan rica en AAL como la linaza café. El segundo tipo es una variedad de linaza totalmente diferente denominada solín, la cual es baja en AAL.

#### 2.2.4 Importancia del cultivo

El lino se ha cultivado desde la antigüedad para la extracción de fibra y aceite. El aceite se utiliza fundamentalmente en la industria de pinturas y barnices por su capacidad de secado rápido, lo que conlleva la formación de una capa protectora de los factores ambientales. De ahí que se utilice para proteger la madera, el hierro u otras superficies expuestas a los factores ambientales. Este mismo aceite entra como componente principal en la fabricación del linóleo, un tipo de producto impermeable que se utiliza para cubrir suelos. Una de las zonas importantes de producción de linaza es el norte de EE.UU. y Canadá.

De las fibras del tallo de esta planta se obtiene un hilo con el cual se pueden fabricar telas. El proceso puede realizarse industrial o manualmente.



**Figura N° 2: Linaza (*Linum usitatissimum*.) A. Flor B. semilla seca entera, C. Semilla seca entera y aceite de linaza. (13).**

**Extraído de: <http://bio-esencia.net/wordpress/tag/info-aromaterapia/>**

En el último caso, se permite que la planta cortada quede expuesta a las condiciones ambientales para que la fermentación natural descomponga la planta y permita separar la fibra vegetal de otras partes no deseadas.

Con ella, después de distintos procesos manuales en los que se prepara adecuadamente, se elabora un hilo natural que se utiliza para la fabricación de una tela similar al algodón, aunque más fuerte.

Sus cualidades benéficas se pueden clasificar en: de beneficio nutricional, especialmente por sus contenidos de ácidos grasos benéficos, alto contenido en fibras y por los lignanos vitales (agentes anticancerígenos) que contienen beneficios para la salud: corazón y sistema circulatorio, cáncer, diabetes, funciones inmunológicas, artritis reumatoides, enfermedades del riñón, menopausia y muchas otras. (14).

El aceite de linaza también es apreciado en la dieta vegetariana y/o vegana (sin ningún alimento o subproducto que venga de un animal como leche, cuero o miel) ya que es la principal fuente vegetal de ácido omegas esenciales para el organismo. En Bolivia y Perú se prepara un refresco a base de la semilla de linaza molida, acompañada de un poco de jugo de limón.

### **2.3. Quinua (*Chenopodium quinoa*)**

#### **2.3.1. Antecedentes históricos**

La quinua es originaria de la región andina hace 7000 años, formando parte de la alimentación diaria de las comunidades indígenas de los andes. Con la colonización española, que introdujo nuevos cultivos, el grano quedó relegado, pero con el cuidado y la conservación de pobladores de la región andina se logró mantenerla hasta nuestros días.

La quinua es uno de los alimentos rico en vitaminas, calcio, hierro y fósforo. Asimismo posee gran cantidad y calidad de proteínas; la presencia de aminoácidos en la quinua intervienen en el desarrollo. Todas estas características permitieron que en 1975, sea

declarado como el mejor alimento de origen vegetal para consumo humano por la Academia de Ciencias de Estados Unidos.

La quinua (*Chenopodium quinoa*), es una de las especies domesticadas y cultivadas en el Perú desde épocas prehispánicas (más de cinco mil años). La cuenca del Lago Titicaca es la zona considerada como el principal centro de origen de la quinua y el centro de conservación de la mayor diversidad biológica de esta especie, en la cual existen sistemas ingeniosos de cultivo y una cultura alimentaria que incorpora el grano a la digestión diaria.

El Perú es poseedor de una diversidad genética de quinua tanto silvestre como cultivada, siendo uno de los mayores productores y exportadores, y cuyo cultivo representa un potencial y oportunidad comercial que contribuirá a mejorar la calidad de vida de las poblaciones altoandinas.

### **2.3.2. Datos del cultivo**

La quinua se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4 000 m.s.n.m., existen ecotipos adecuados desde suelos salinos y alcalinos hasta zonas con heladas. Las condiciones climáticas y el suelo tienen influencias muy marcadas en la producción y productividad de la quinua. El clima está determinado por una serie de factores tales como altitud, precipitación, temperatura, latitud, vientos, iluminación, etc.

Dado a su cultivo en zonas marginales de los andes altos, la quinua se enfrenta con altos riesgos ambientales como heladas, sequías prolongadas, granizo, vientos fuertes, suelos pobres y ácidos.

Se propaga mediante semillas, en condiciones normales, la germinación se produce entre los ocho a diez días y con el uso de germinadores se puede realizar a los dos días. (64)

### 2.3.3. Descripción de la planta

La quinua es una planta alimenticia de desarrollo anual, dicotiledónea que usualmente alcanza una altura de 1 a 3 m (figura N° 3A). Las hojas son anchas y poliformas (diferentes formas en la misma planta), El tallo central comprende hojas lobuladas y quebradizas. El tallo puede tener o no ramas, dependiendo de la variedad o densidad del sembrado. Las flores son pequeñas y carecen de pétalos. Generalmente son bisexuales y se autofertilizan.

El fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro, de 250 a 500 semillas por grano (figura N° 3B), circundando al cáliz, el cual es del mismo color que el de la planta. Las semillas pueden ser blancas, cafés amarillas, grises, rosadas, rojas o negras (figura N° 3C), y se clasifican según su tamaño en grandes, medianas y pequeñas.

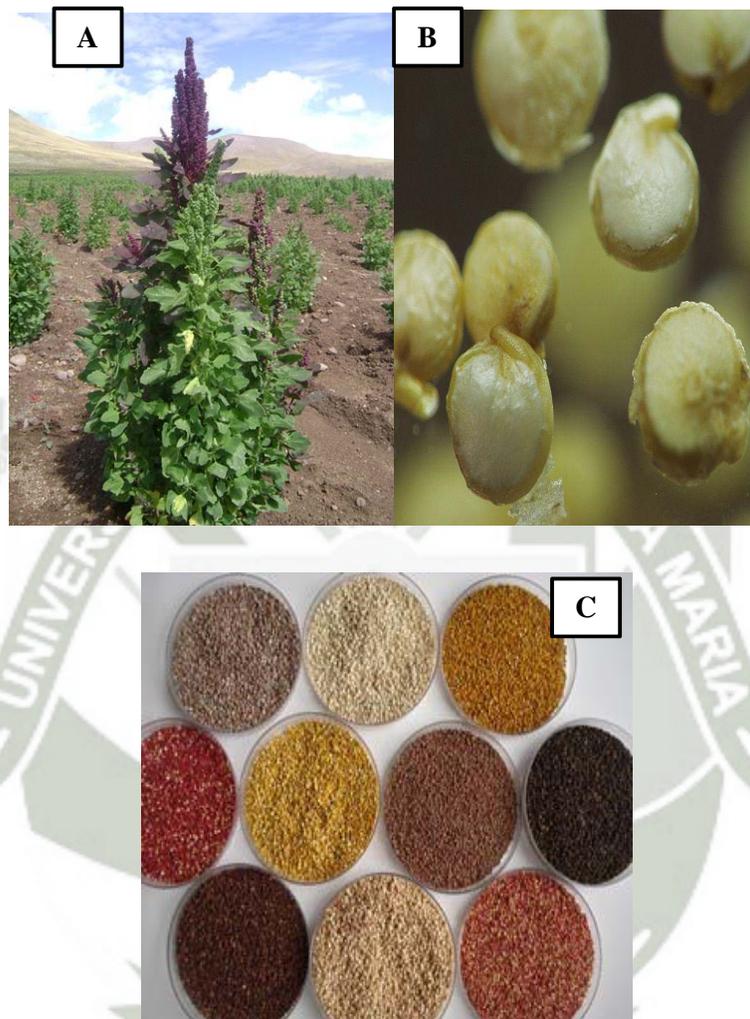
### 2.3.4. Importancia del cultivo

La quinua al poder emplearse como un pseudocereal por su alto contenido en fibra y su mayor aporte proteico respecto a los cereales, se puede decir que tiene un bajo índice glucémico, lo que la vuelve ideal para personas con diabetes o que desean adelgazar comiendo sano.

También es de gran ayuda para controlar los niveles de colesterol en sangre, ya que su fibra y sus lípidos insaturados favorecen el perfil lipídico en el organismo. Si nos referimos a los micronutrientes, en la quinua destaca el contenido de potasio, magnesio, calcio, fósforo, hierro y zinc entre los minerales, mientras que también ofrece vitaminas del complejo B en cantidades apreciables y vitamina E con función antioxidante.

La potencialidad de la quinua desde el punto de vista medicinal es su alta digestibilidad y su naturaleza dietética las cuales tienen un bajo contenido de colesterol y de gluten. Desde el punto de vista social, su adaptación a diferentes

ecosistemas y su fácil conservación, garantiza la seguridad alimentaria de la población. (65).



**Figura N° 3: Quinoa (*Chenopodium quinoa*) A. Planta B. Fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro C. Semillas de quinoa y sus diferentes colores.**

Extraído de: <http://www.inia.gob.pe/ano-internacional-de-la-quinoa/>

## 2.4. PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas orgánicas que están constituidas principalmente por carbono e hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, también pueden contener azufre, fósforo y en menor proporción hierro y cobre.

Pueden clasificarse de acuerdo a:

- Propiedades físicas
- Propiedades químicas.
- Criterios estructurales
- Criterios funcionales. (66)

### 2.4.1. Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva, denominadas de este modo por creerse que no desempeñan función metabólica o estructural alguna, están acumuladas en cuerpos específicos, los denominados cuerpos proteicos, que se encuentran distribuidos al azar en el citoplasma. En ocasiones es posible distinguir dos componentes, el cristalóide (cristal de proteína) y el globoide (lugar de deposición de fitinas, sales de potasio, magnesio y ácido fítico). Durante la germinación, estas sustancias son hidrolizadas y transportadas al eje embrionario en crecimiento, lo que conlleva un cambio en las estructuras que las contienen. Durante la germinación, los cuerpos proteicos sufren un proceso de vacuolización, aumentando de tamaño. (67)

Aproximadamente el 70 % del alimento humano proviene de las semillas y una gran proporción del remanente proviene de los animales que son alimentados con semillas, en consecuencia no es sorprendente la investigación que se realiza actualmente en cuanto a calidad nutricional de las semillas, especialmente en cereales y leguminosas.

Las proteínas de reserva o de interés alimenticio pueden dividirse en relación a la solubilidad

- **Albúminas:** solubles en buffer diluido a pH 8 y en agua
- **Glutelinas:** solubles en ácidos y álcalis diluidos
- **Prolaminas:** solubles en etanol a 70-90%
- **Globulinas:** insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas

#### 2.4.1.1 Albúminas

Son proteínas globulares compactas con residuos de cisteína. Se encuentran principalmente en leguminosas. También están en cereales donde tienen propiedad de inhibidor de tripsina o  $\alpha$ -amilasa. En el trigo al igual que las globulinas se derivan de residuos citoplasmáticos y de otras fracciones subcelulares que forman parte del grano (18).

#### 2.4.1.2 Glutelinas

Son proteínas de tipo globular insolubles en agua. Las glutelinas son agregados insolubles en alcohol, pero son solubles en ácidos y bases diluidos, mostrando una mejor solubilidad a pH básicos, siendo óptima su solubilidad a pH 10; se encuentran presentes en los cereales y pseudocereales, son estabilizadas por enlaces disulfuros. Las glutelinas son las encargadas de las propiedades de viscosidad y elasticidad en los alimentos (18).

#### 2.4.1.3 Prolaminas

Las prolaminas están presentes en el endospermo de muchos cereales siendo una fracción proteica soluble entre 50 – 90 % en etanol. Estas proteínas poseen cantidades altas de prolina y ácido glutámico. Son proteínas monoméricas, que en general son mezclas altamente polimórficas de polipéptidos de 30 – 90 kDa.

#### 2.4.1.4 Globulinas

Proteínas insolubles en agua, solubles en disoluciones salinas, las cuales se encuentran en todos los animales y vegetales. Se encuentran en los embriones de la mayoría de semillas.

Son subcategorizadas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación:

- Vicilinas 7 S: tienen entre 150 y 200 kDa, pierden residuos de cisteína y no forman puentes disulfuro. Se encuentran en el embrión y en la capa de aleurona de cereales, son menos abundantes que las leguminas 11 S.
- Leguminas 11 S: tienen entre 350 y 400 kDa. Forman puentes disulfuro. Son más abundantes que las vicilinas



## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

#### 3.1.1. Ambientes a utilizar

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Universidad Católica Santa María, Arequipa - Perú

- Laboratorio H – 301
- Laboratorio H – 101

#### 3.1.2. Materiales biológicos

- Semillas de quinua – Variedad Salcedo INIA-Puno
- Semillas de chía – Variedad negra - FITOSANA
- Semillas de linaza – Variedad marrón SANTA NATURA

#### 3.1.3. Equipos

- Balanza analítica OHAUS DISCOVERY 1
- Sistema Soxhlet
  - Refrigerante
  - Condensador
  - Balón
- Baño María SELECTA 1375

- Agitador shaker ROTABIT
- Espectrofotómetro SPECTRUM SP 1105
- Centrífuga HETTICH EBA 20 para tubos Falcon de 15mL
- pH-metro HANNA HI 111
- Cronómetro THOMAS
- Equipo de electroforesis
  - Dos placas de vidrio
  - Peine de 15 dientes
  - Dos espaciadores de poliestireno
  - Soporte
  - Tanque de electroforesis
  - Fuente de poder

### 3.1.4. Reactivos

#### Fraccionamiento

- |                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| • Cloruro de Calcio 10 mM             | CaCl <sub>2</sub> |
| • Cloruro de Magnesio 10 mM           | MgCl <sub>2</sub> |
| • Cloruro de Sodio 10 %               | NaCl              |
| • Tris – Ácido Clorhídrico 10 mM pH 8 | Tris-HCl          |
| • Ácido Etildiaminotetraacético 10 mM | EDTA              |

- Etanol 75 % C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O
- Borato de sodio 50 mM pH10 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O
- β- mercaptoetanol 1 % C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS
- Dodecilsulfato sódico 1 % (SDS) NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>

### Cuantificación

- Albúmina de suero bovino ultrapura ALBICOM
- Reactivo de Biuret
  - Tartrato de sodio y potasio KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O
  - Sulfato de cobre pentahidratado CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O
- Reactivo de Bradford
  - Azul de Coomassie G-250 SIGMA
  - Etanol 75 % C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O
  - Ácido Fosfórico 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Reactivo de Lowry
  - Tartrato de sodio y potasio al 2 % KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O
  - Sulfato de cobre pentahidratado al 1 % CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O
  - Carbonato de sodio al 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
  - Reactivo de Folin-Ciocalteu MERCK

## Electroforesis SDS-PAGE

### Buffer simple 2X

- Azul de Bromofenol SIGMA
- Glicerol  $C_3H_8O_3$
- Stalking y Running Buffer
  - Agua  $H_2O$
  - Poliacrilamida ( Acrilamida y Bisacrilamida)  $(C_3H_5NO)_n$
  - Tris pH 6.8 , 0.5 M  $C_4H_{11}NO_3$
  - Dodecilsulfato sódico 1 % (SDS)  $NaC_{12}H_{25}SO_4$
  - Persulfato de amonio APS 10 %  $(NH_4)_2S_2O_8$
  - Tetrametiletilendiamina (TEMED)  $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$
- Azul de Coomassie G-250 SIGMA

### 3.1.5 Material de vidrio

- Tubos de ensayo 250 mL, 500 mL, 1000 mL.
- Vaso de precipitado 200 mL.
- Matraz 500 mL.
- Pipetas 1 mL, 5 mL.
- Probetas 50 mL.
- Espátula

- Mortero
- Bagueta

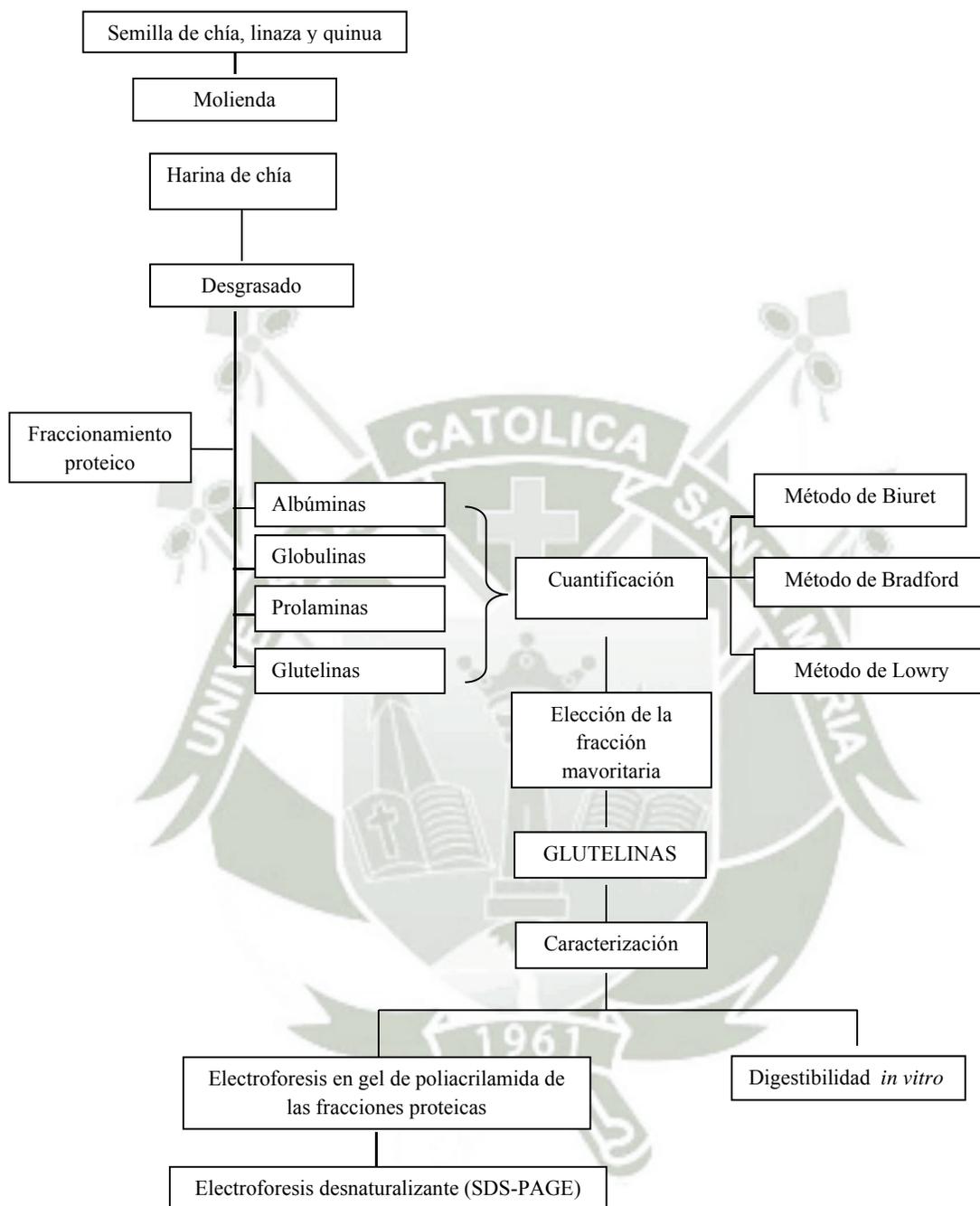
### 3.1.6 Otros

- Pipetas automáticas regulables de 10-100  $\mu$ L y de 100-1000  $\mu$ L. y tips
- Agua destilada
- Cocina eléctrica
- Termómetro
- Tubos eppendorf y falcon

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1 Esquema general de trabajo

La metodología que se siguió en el presente trabajo se resume en la figura N° 4.



**Figura N° 4: Esquema de la metodología del proyecto.**

### **3.2.2 Obtención de harina**

Se trituro en una licuadora las semillas de chíá, linaza y quinua hasta obtener una harina homogénea.

### **3.2.3. Desgrasado de harina por sistema Soxhlet**

A la semilla triturada se le retiró la grasa mediante un sistema Soxhlet, primero se pesó la harina de semillas por separado, se armó cartuchos pequeños de papel filtro donde se colocó la harina pesada, se introdujo este cartucho a la cámara de extracción del sistema Soxhlet empleando hexano como solvente, se conectó a esta cámara el condensador el cual contaba con una entrada y salida de agua; se realizó 20 reflujos con una duración aproximada de 10 minutos/reflujo (20), en el balón volumétrico del sistema se recolectó la grasa más el solvente. La harina desgrasada se llevó a refrigeración donde se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

### **3.2.4. Fraccionamiento secuencial de las proteínas de reserva de semillas de chíá, linaza y quinua**

La extracción de las diferentes fracciones proteínicas se llevó a cabo en harina desgrasada de semillas de chíá, linaza y quinua por separado, con mucílago. Para esta extracción se utilizó el método modificado de Osborne reportado por Franco y col., (1997); Ferreira y col. (2000) (21), con algunas modificaciones como se describe a continuación. Se ha reportado que la presencia de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  durante la extracción de albúminas y de EDTA durante la extracción de globulinas, incrementa la eficiencia de extracción de estas proteínas y evita la contaminación cruzada.

Se realizó una primera extracción suspendiendo harina de las semillas por separado (chía, quinua y linaza) en agua destilada (1:30 p/v) +  $\text{CaCl}_2$  10 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM en tubos falcon y se agitó en un agitador shaker por 4 horas a 4 °C para lograr esta temperatura se colocó los tubos falcon en un recipiente lleno de hielo, se centrifugó

a 6000 rpm durante 1 hora, recuperando en el sobrenadante la fracción de albúminas. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Posteriormente se realizó una segunda extracción resuspendiendo el precipitado con una solución de Tris-HCl a pH 8 + NaCl 10 % + EDTA 10 mM, se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 6000 rpm durante 1 hora, recuperando en el sobrenadante la fracción de globulinas. Se colectó y guardó el sobrenadante a 4 °C hasta su uso.

La tercera extracción se realizó resuspendiendo el precipitado en etanol al 75 % y se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 6000 rpm durante 1 hora recuperando en el sobrenadante la fracción de prolaminas. Se colectó y guardó el sobrenadante a 4 °C hasta su uso.

Por último la cuarta extracción se realizó resuspendiendo el precipitado en una solución de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  pH 10 +  $\beta$  - mercaptoetanol 1% + SDS 1 % (5 mL/g peso seco), se agitó por 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 6000 rpm por 1 hora. Recuperando en el sobrenadante la fracción de glutelinas. Se colectó el sobrenadante y se guardó a 4 °C hasta su uso.

### **3.2.5. Cuantificación Proteínica**

#### **3.2.5.1. Método de Biuret**

El contenido de proteína de las fracciones aisladas se cuantificó mediante el método de Biuret. El reactivo de Biuret contiene  $\text{CuSO}_4$  en solución acuosa alcalina. Este método se basa en la formación de un complejo de color violeta entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico (gracias a la presencia de NaOH o KOH (figura N°5). La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es alta y se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados

Se añadió 2 mL del reactivo de Biuret a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la tabla N° 1. Se colocó en baño maría a 37 °C por 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y se hizo la lectura de las absorbancias en el espectrofotometro a 540 nm frente al blanco.

El color es estable por 1 hora. Se realizó el método por triplicado para cada semilla.

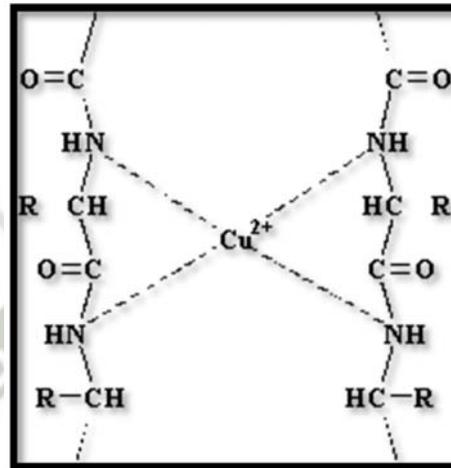


Figura N° 5: Reacción de Biuret.

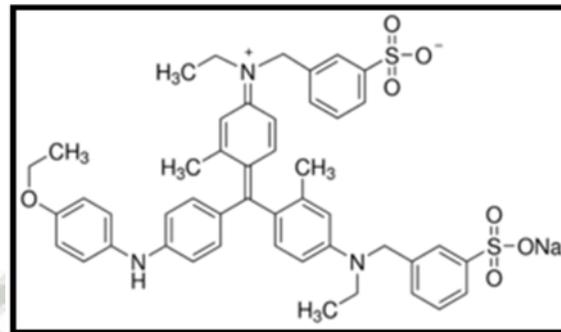
Extraído de: <http://www.madsci.org/posts/archives/2004-12/1102321490.Gb.r.html>

### 3.2.5.2. Método de Bradford

El contenido de proteínas de las fracciones aisladas se cuantificó mediante el método de Bradford. Este método se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 (figura N° 6) a las proteínas. Este colorante tiene dos formas una azul y otra naranja, las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante. Este método es simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

Se añadió 2 mL del reactivo de Bradford a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la tabla N° 1. Se dejó a temperatura ambiente y se hizo la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro a 595 nm frente al blanco. El

color es estable durante 1 hora. Se realizó el método por triplicado para cada semilla.



**Figura N° 6: Molécula del Azul de Coomassie.**

Extraído de: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=04808274&country=167>

### 3.2.5.3. Método de Lowry

El contenido de proteínas de las fracciones aisladas se cuantificó mediante el método de Lowry, es un método colorimétrico de valoración cuantitativa. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas

Este método consta de dos etapas (figura N°7):

- 1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría

de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Se preparó el reactivo A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 %,  $\text{NaOH}$  0.1 M) y el reactivo B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1 % + Tartrato de sodio y potasio al 2 %) según se muestra en el Anexo 2. La mezcla del reactivo A y B dará origen al reactivo C. Se añadió 3 mL del reactivo C a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la tabla N° 1. Se mezcló el contenido de cada tubo y se dejó reposar 15 minutos en oscuridad (dentro de la gradilla). A continuación se añadió a todos los tubos 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1/4), mezclando bien. Se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad para que así se desarrolle completamente la reacción coloreada. Se hizo la lectura de las absorbancias en el espectrofotómetro a 520 nm por la alta concentración de proteínas. Se realizó el método por triplicado para cada semilla.

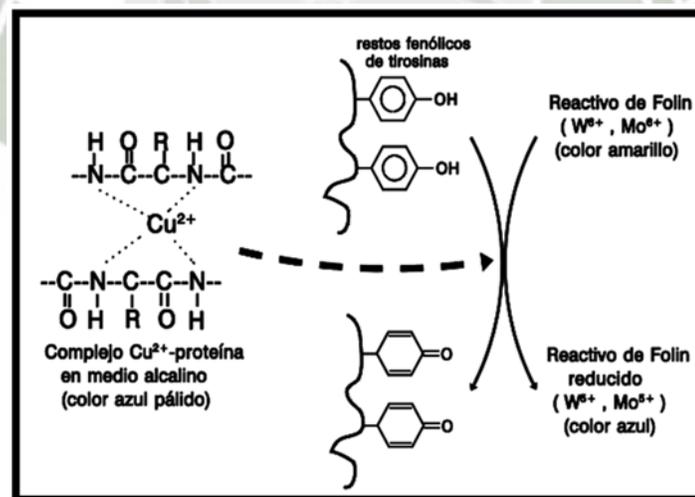


Figura N° 7: Reacción entre la proteína y los reactivos.

Extraído de: [http://yunelijo-k.blogspot.com/2011\\_11\\_01\\_archive.html](http://yunelijo-k.blogspot.com/2011_11_01_archive.html)

Tabla N° 1: Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas.

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Solución patrón (albúmina de suero bovino) (uL)	-	50	150	250	350	450	600	-	-	-	-	-	-	-	-
Fración albúminas (uL)	-	-	-	-	-	-	-	250	500	-	-	-	-	-	-
Fración globulinas (uL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	500	-	-	-	-
Fración prolaminas (uL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	500	-	-
Fración glutelinas (uL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	500
Agua destilada (uL)	1000	950	850	750	650	550	400	750	500	750	500	750	500	750	500
Volumen total (uL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

### 3.2.6. Caracterización Bioquímica

#### 3.2.6.1. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Se llevó a cabo en dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE) utilizando el método estándar obtenido del manual de laboratorio “Molecular Cloning” (22) en geles de poliacrilamida: Stacking gel al 4 % (concentración estándar) y Running gel al 12 % (debido a los pesos moleculares de proteínas de reserva entre 14 y 66 kDa conocidos teóricamente).

Las muestras de proteínas de las tres semillas (chía, linaza y quinua) se disolvieron en Buffer Sample 2x ( $\beta$  mercaptoetanol + glicerol + SDS 1 % + Azul de Bromofenol) en una dilución de 1:1 en tubos eppendorf. La desnaturalización se llevó a cabo a 95 °C por 10 minutos.

Se cargaron los pozos del gel con las proteínas de reserva desnaturalizadas además del marcador de peso molecular conocido “See Blue Plus 2” de Invitrogen con un rango de 4 a 250 kDa; específico para proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a una corriente constante de 150 V durante 90 minutos en presencia de running buffer 1x. El gel se tiñó con azul brillante Coomassie G 250 a una concentración de 0.25 %, para posteriormente ser sometidos a decoloración con agua destilada.

#### 3.2.7. Digestibilidad *in vitro*

Se llevó a cabo la digestibilidad *in vitro* (23). Para lo que se prepararon 50 mL de material proteínico de cada semilla en solución acuosa (6.25 mg de harina/mL) y se ajustó a pH 8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N con agitación en baño maría a 37 °C.

Se realizó la prueba de Biuret para confirmar la presencia de proteínas en suspensión acuosa preparada anteriormente

Se preparó 50 mL de una solución multienzimática que contenía tripsina y peptidasa 17.46 mg/10 mL y 10.40 mg/10 mL respectivamente; datos obtenidos de Vidal-

Guevara, se ajustó a pH 8 y esta solución se mantuvo en baño de hielo. Una vez que se realizó lo anterior, se añadieron 5 mL a la suspensión proteínica y se mantuvo en agitación a 37 °C por un periodo de 10 minutos. Se midió la caída del pH con un potenciómetro digital. Este método se realizó por triplicado para cada harina de semilla. Se calculó la digestibilidad *in vitro* (Y) a partir de la siguiente ecuación (figura N°8):

$$Y = 210.464 - 18.103x$$

**Figura N° 8: Ecuación de digestibilidad *in vitro*.**

Extraído de: <http://www.ajfand.net/Volume10/No4/Mugendi3645.pdf>

Dónde: X= pH de la suspensión proteínica inmediatamente después de 10 min de digestión con la solución multienzimática.

### 3.2.8. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por la prueba de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Desgrasado de harina por sistema Soxhlet

Para la determinación del porcentaje de grasa se utilizó un equipo Soxhlet (figura N° 9) y como solvente hexano donde se encontró la cantidad de contenido lipídico de las harinas de chía, linaza y quinua. Como se muestra en la tabla N° 2, el contenido lipídico fue más alto en la harina de semillas de linaza (26.28 %), seguido por la harina de chía (24.57 %) y por último la harina de semilla de quinua (8.12 %). Lo que confirma que la semilla tanto de la chía como de linaza son una fuente importante de lípidos (4).

Se realizó por triplicado el desgrasado de harina por sistema Soxhlet, escogiendo a la harina que tuvo menor contenido de grasa.



**Figura N° 9: Equipo Soxhlet.**

**Tabla N° 2: Porcentajes de grasa en muestras de semillas molidas.**

	% M1	% M2	% M3	PROMEDIO (%)
<b>QUINUA</b>	8.25	8.1	8.0	8.1167 ± 1.55
<b>LINAZA</b>	26.45	26.3	26.1	26.2833 ± 0.67
<b>CHÍA</b>	24.65	24.3	24.75	24.5667 ± 0.96

### **Análisis cuantitativo de grasa en semillas molidas**

Para la realización del análisis cuantitativo de la grasa presente en las semillas trabajadas primero se pesó el balón vacío, luego se sometió a la harina de semillas de chía, linaza y quinua al sistema Soxhlet, se separó el hexano de la grasa por destilación usando el mismo equipo; seguidamente se pesó el balón con grasa y mediante la ecuación se determinó el porcentaje lipídico de cada semilla. (Figura N° 10).

Se realizó tres veces el desgrasado de cada harina utilizada, con el objetivo de seleccionar la harina tanto de chía, linaza y quinua que tuviera el mayor porcentaje de grasa extraída, con la finalidad de que el fraccionamiento de proteínas de reserva se realice de manera eficaz ya que en la grasa se quedan atrapadas algunas de estas proteínas como las globulinas y prolaminas.

$$\% \text{ grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

**Figura N° 10: Ecuación del porcentaje de grasa.**

Extraído de: <http://www.etpcba.com.ar/DocumentosDconsulta/ALIMENTOS-PROCESOS.pdf>

B<sub>1</sub>= masa del balón vacío

B<sub>2</sub>= masa del balón con grasa

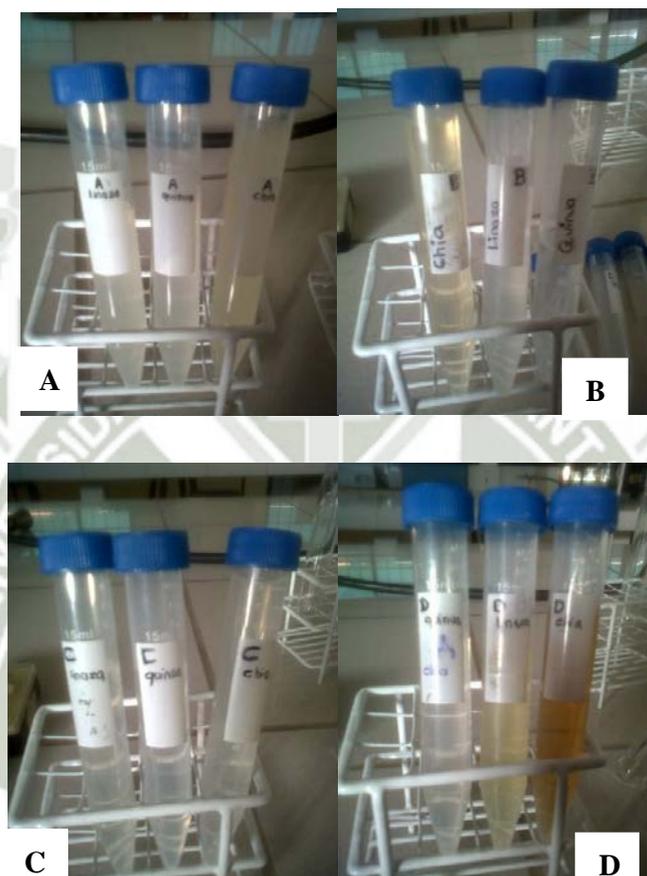
m= masa de la harina

Se realizó el análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula de que los promedios de porcentajes de grasa obtenidos en la harina de semillas son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos uno de los porcentajes difiere de los demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales. Se obtuvo que si hubo diferencia significativa entre los 3 grupos que conforman las harinas de semillas de chía, quinua y linaza, luego de realizar la prueba de Tukey que nos ayuda a conocer entre que grupos existe diferencia. (Anexo N° 6).

#### **4.2. Fraccionamiento de las proteínas de reserva en semillas**

Para el estudio de las proteínas de reserva de chía, quinua y linaza se utilizó el fraccionamiento mediante solubilidad, con la metodología modificada de Osborne, (21) que se basa principalmente en la centrifugación y en las diferencias de solubilidad entre las proteínas. Las fracciones proteínicas que se obtienen son: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas

(solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en álcali diluido). Se utilizaron agentes extractantes diferentes como el EDTA, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>, esto permitió la obtención de patrones electroforéticos más claros y fáciles de analizar.



**Figura N° 11: Fracciones proteicas obtenidas a partir del método de Osborne. A) albúminas, B) globulinas, C) prolaminas, D) glutelinas.**

Se tuvo en cuenta la estandarización de temperatura (4 °C), tiempo y pH que influyeron en el rendimiento y estructura de las fracciones de cada proteína de reserva: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. (Figura N° 11)

La conformación de una proteína depende del pH y de la temperatura principalmente. Cambiando estas condiciones, también puede cambiar la estructura de la proteína. Esta pérdida de la conformación estructural natural se denomina desnaturalización.

Se requieren proteínas que no pierdan su función biológica es decir que no estén desnaturalizadas para que los datos obtenidos en cuantificación y caracterización sean verídicos y que los valores estadísticos no varíen mucho.

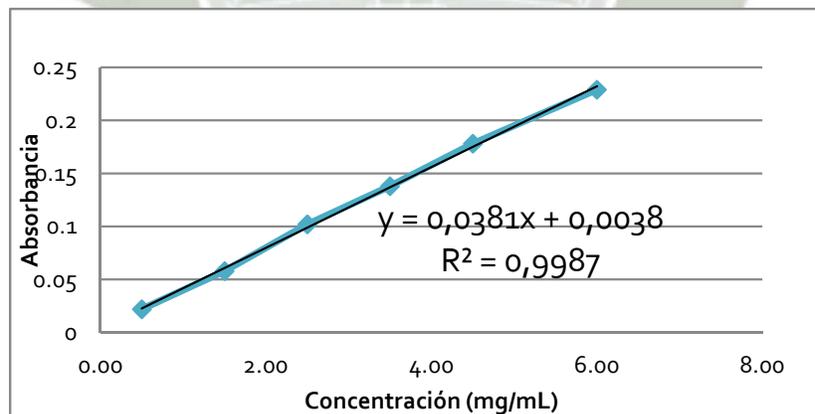
### 4.3. Cuantificación de proteínas reserva por métodos colorimétricos

#### 4.3.1. Método de Biuret

Se cuantificaron las fracciones de globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas mediante el método de Biuret utilizando una curva estándar para la cual se empleó albúmina de suero bovino “BSA Ultrapure Ambiom”. (Figura N° 12)

Con este método se obtuvo mejores resultados ya que no hubo ningún tipo de interferencia. La concentración de la solución patrón para la curva estándar de BSA para el caso de este método fue 10 mg/ mL. (Figura N° 13)

Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado con el fin de obtener datos con mayor exactitud.



**Figura N° 12: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína usando el método de Biuret.**



**Figura N° 13: BSA (10 mg/ mL) a diferentes concentraciones, mostrando presencia de proteínas con el método colorimétrico de Biuret.**

En la tabla N° 3 se muestran los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de chíá .Se puede ver claramente que las glutelinas se encuentran en mayor proporción en comparación con las globulinas, seguidas por las albúminas y en menor cantidad las prolaminas.

En la tabla N° 4 se muestran los resultados de cuantificación de las fracciones proteicas de semillas de quinua .Se observa que las glutelinas se encuentran en mayor proporción en comparación con las albúminas, y en menor cantidad las prolaminas y globulinas.

En la tabla N° 5 se muestran los valores obtenidos para las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de linaza .Se puede evidenciar que las glutelinas se encuentran en mayor proporción en comparación con las albúminas, y en menor cantidad las globulinas y prolaminas.

**Tabla N° 3: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de chíá. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar**

Chía (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
Albúminas	8.4568 $\pm$ 0.26
Globulinas	11.8002 $\pm$ 0.47
Prolaminas	2.6716 $\pm$ 0.07
Glutelinas	19.9245 $\pm$ 0.97

**Tabla N° 4: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de quinua. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar**

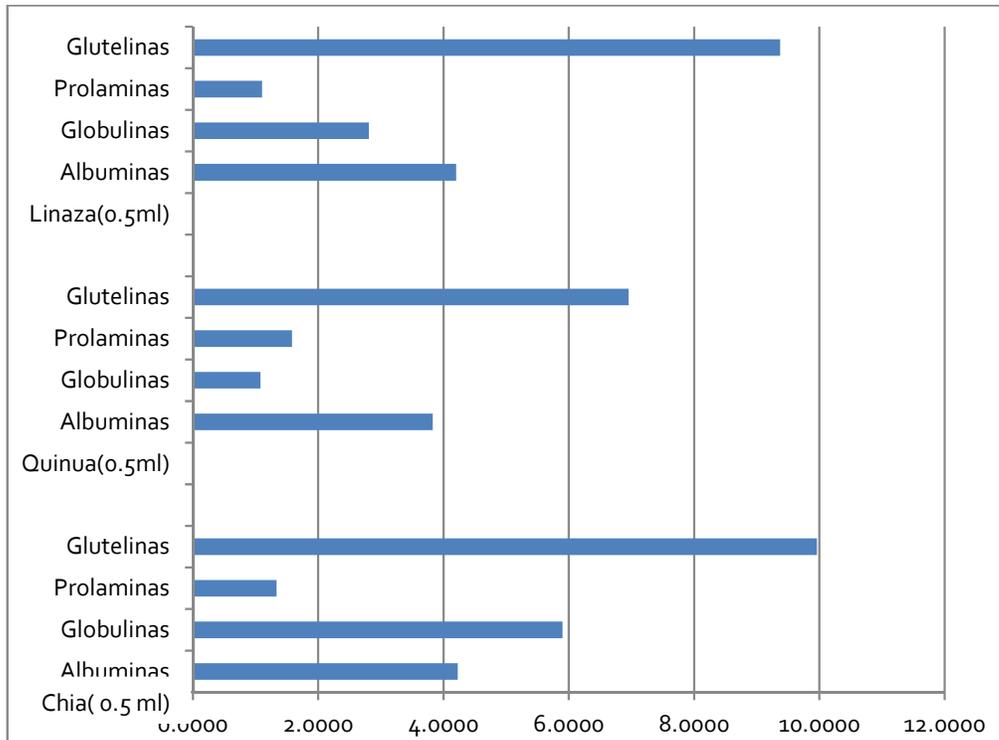
Quinua (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
Albúminas	7.6574 $\pm$ 0.30
Globulinas	2.1586 $\pm$ 0.16
Prolaminas	3.1617 $\pm$ 0.15
Glutelinas	13.9071 $\pm$ 0.61

**Tabla N° 5: Resultados de cuantificación de fracciones de proteínas de reserva en semillas de chía. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar**

<b>Linaza (0.5 mL)</b>	<b>Proteínas ( g./kg de semilla)</b>
<b>Albúminas</b>	8.4020 $\pm$ 0.30
<b>Globulinas</b>	5.6183 $\pm$ 0.44
<b>Prolaminas</b>	2.2089 $\pm$ 0.10
<b>Glutelinas</b>	18.7476 $\pm$ 0.84

En la figura N° 14 se encuentran los resultados del rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de proteínas de reserva de las semillas (chía, quinua y linaza).

Se puede ver claramente que las glutelinas representan la fracción más abundante, con un rendimiento de extracción por encima de las demás fracciones. Este patrón se observa generalmente en granos de pseudocereales los cuales se pueden utilizar en la industria de la panadería ya que las glutelinas le dan la elasticidad a los panes y su apariencia esponjosa.



**Figura N° 14: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chía, linaza y quinua usando el método Biuret.**

De acuerdo a los datos obtenidos se puede decir que el contenido de glutelinas tanto en harina de chía y harina de linaza es mayor (19.9245, 18.7476 respectivamente) y en menor cantidad en la harina de quinua (13.9071). Los datos obtenidos más la desviación estándar muestran resultados similares entre harina de chía y linaza esto se debe a que ambos son pseudocereales con similitudes como presencia de mucílago y alto contenido de aceite. Para demostrar esto se realizó un análisis de varianza.

Se realizó el análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula de que los promedios del contenido de proteínas de reserva en la harina de semillas usando el método de Biuret son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos uno de los valores obtenidos difiere de los demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales. Se obtuvo que en el caso de albúminas no hubo diferencia significativa por lo tanto no se realizó la prueba de Tukey, en globulinas si hubo

varianza por lo cual se procedió a realizar la prueba de Tukey encontrando que hay diferencia significativa entre el contenido de globulinas de quinua, chía y linaza, en prolaminas se encontró que si hubo varianza, por lo que se realizó la prueba de Tukey mostrando que hubo diferencia significativa entre el contenido de prolaminas en semillas de quinua y linaza, en glutelinas si hubo varianza, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey donde se puede evidenciar que hay diferencia significativa entre el contenido de glutelinas en semillas de quinua y linaza y entre chía y quinua. (Anexo N° 6).

#### 4.3.2. Método Bradford

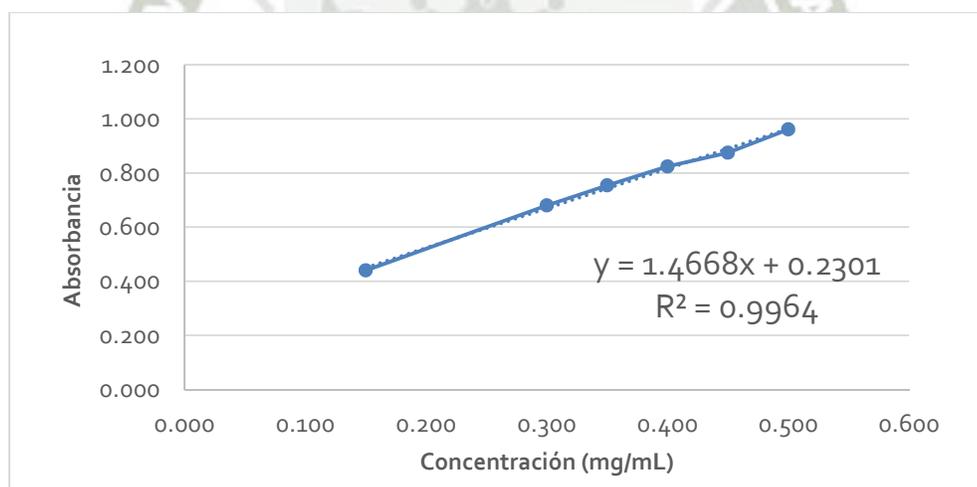
Método menos eficiente debido a que hubo interferencia con los detergentes (SDS al 1 %) usados en el fraccionamiento de proteínas (figura N° 15). El SDS es un detergente común

Cuando las concentraciones SDS están presentes en una solución con Bradford, el detergente tiende a ligar fuertemente con la proteína, inhibiendo los sitios de unión de la proteína para el reactivo del tinte (azul de Coomassie). Esto puede causar precipitados en las soluciones de proteínas.

Se cuantificaron las fracciones globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas mediante el método de Bradford utilizando una curva estándar de BSA Ultrapure Ambiom de 50 mg/mL (figura N° 16) considerando dos diluciones de 0.25 y 0.5 mL utilizando solamente la de mayor concentración (0.5 mL) ya que se mostró mayor presencia de proteínas. La concentración de la solución patrón que fue de albúmina de suero bovino fue 1 mg/mL.



**Figura N° 15: Interferencia presentada con SDS 1% en el método de Bradford utilizado en la extracción de glutelinas.**



**Figura N° 16: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína. Albúmina de Suero Bovino (BSA) a una concentración de 0; 0.150; 0.300; 0.350; 0.400; 0.450 y 0.500 mg/mL a una longitud de onda de 520 nm.**

**Tabla N° 6: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de chía usando el método Bradford.**

<b>Chía (0.5 mL)</b>	<b>Proteínas (g./kg de semilla)</b>
<b>Albúminas</b>	1.4139 ± 0.06
<b>Globulinas</b>	3.0258 ± 0.13
<b>Prolaminas</b>	0.6909 ± 0.69
<b>Glutelinas</b>	0

En la tabla N° 6 se muestran los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de chía. Se puede observar que no se efectuó la lectura glutelinas ya que por el uso de detergentes en el fraccionamiento originando precipitados e interferencia en el momento de la lectura con el espectrofotómetro, en el caso de las globulinas se encontraron en mayor proporción, seguidas de las albúminas y por últimos las prolaminas.

En la tabla N° 7 se muestran los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva extraídas de semillas de quinua. Se puede decir que no se encontró glutelinas ya que por el uso de detergentes en el fraccionamiento hubo interferencia en el momento de la lectura con el espectrofotómetro, en el caso de las globulinas se encontraron en mayor proporción, seguidas de las prolaminas y albúminas.

En la tabla N° 8 se muestran los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de linaza. Se puede observar que no se encontró glutelinas por el motivo mencionado anteriormente al momento de la lectura, en el caso de las globulinas se encontraron en mayor proporción, seguidas de las albúminas y por último las prolaminas.

**Tabla N° 7: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de quinua usando el método Bradford.**

Quinua (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
Albúminas	1.0817 ± 0.05
Globulinas	1.4139 ± 0.07
Prolaminas	1.0893 ± 0.04
Glutelinas	0

**Tabla N° 8: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de linaza usando el método Bradford.**

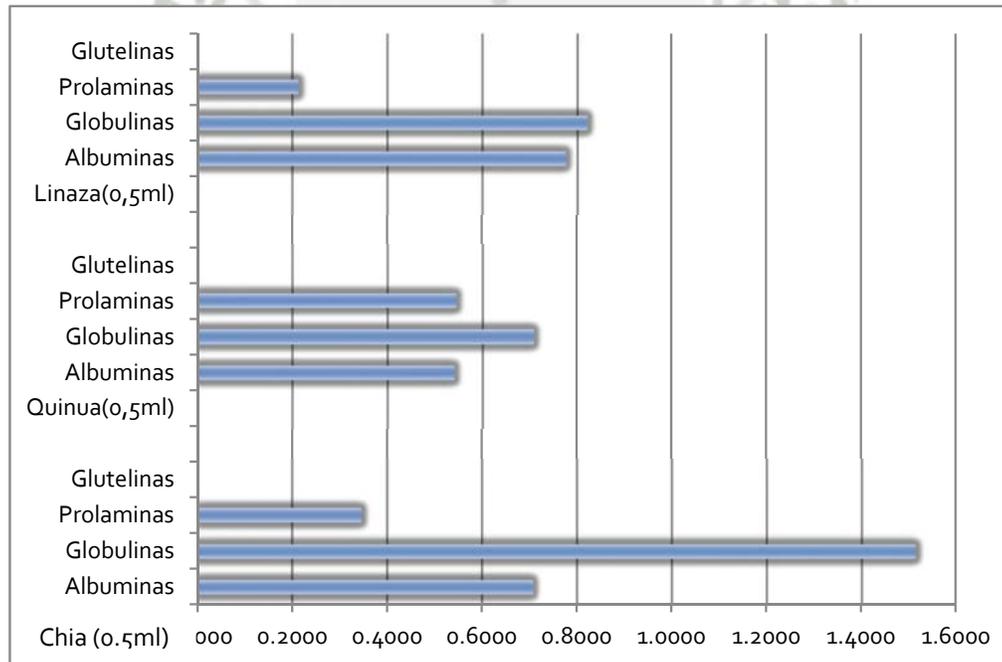
Linaza (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
Albúminas	1.5510 ± 0.05
Globulinas	1.6412 ± 0.07
Prolaminas	0.6227 ± 0.04
Glutelinas	0

En la figura N° 17 se encuentran los resultados de rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de proteínas de reserva de las semillas (chía, quinua y linaza). En la cual se puede observar claramente que no se obtuvo resultados de las glutelinas, la

cantidad de globulinas en las tres semillas es mayor en la chíá seguida por linaza y por último la quinua.

Si hablamos de los valores mostrados en la fracción de albúminas se puede decir que la mayor cantidad se mostró en linaza; en cambio las prolaminas se observaron en mayor cantidad en quinua. Los resultados de este método van en completo desacuerdo a los resultados del método de Biuret y el método de Lowry utilizados en el trabajo, mostrando valores completamente distintos.

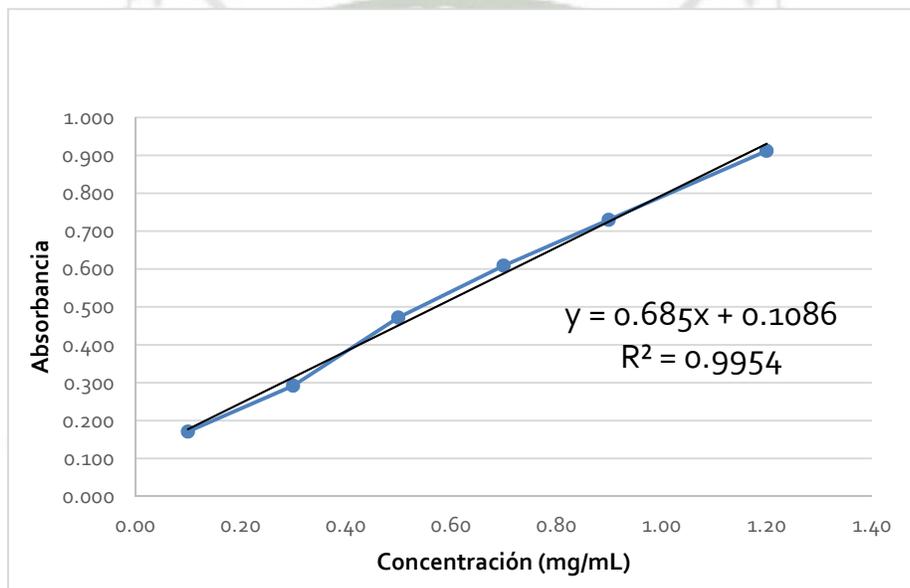
Se puede decir que el método de Bradford un método poco sensible y con muchas interferencias causando precipitados de color azul los cuales van a ocasionar errores de lectura al momento de realizar la medición de la absorbancia con el espectrofotómetro. Por estas razones no se tomó en cuenta los valores obtenidos de este método, cabe resaltar que las tres mediciones dieron los mismos errores.



**Figura N° 17: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chíá, linaza y quinua usando el método Bradford.**

### 4.3.3. Método Lowry

Este método fue el que obtuvo mejores resultados después de Biuret. Se cuantificó las fracciones de globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas mediante el método de Lowry utilizando una curva estándar de BSA Ultrapure Ambiom de 50 mg/mL (figura N° 18) considerando dos diluciones de 0.25 y 0.5 mL. utilizando solamente la de mayor concentración (0.5 mL) ya que se mostró mayor presencia de proteínas. Se usó albúmina de suero bovino con una concentración de 2 mg/mL. (Figura N° 19)



**Figura N° 18: Curva estándar BSA para determinar concentración de proteína por el método de Lowry. Albúmina de Suero Bovino (BSA) a una concentración de 0; 0.05; 0.150; 0.250; 0.350; 0.450 y 0.600 mg/mL a una longitud de onda de 520 nm.**



**Figura N° 19: BSA (2 mg/mL) a diferentes concentraciones, mostrando presencia de proteínas con el método colorimétrico de Lowry.**

Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado con el fin de obtener datos con mayor exactitud que ayudaran en la realización e interpretación del análisis estadístico.

En la tabla N° 9 se muestran los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de chíá .Se puede observar que las glutelinas se encuentran en mayor proporción seguidas de las globulinas, albúminas y por ultimo las prolaminas.

En la tabla N° 10 se exponen los resultados de cuantificación de las fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de quinua .Se puede observar que las glutelinas se encuentran en mayor proporción seguidas de las albúminas, prolaminas y por ultimo las globulinas.

**Tabla N° 9: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de chía usando el método Lowry.**

Chía (0.5 mL)	Proteínas (g./kg de semilla)
Albúminas	9.0755 ± 0.35
Globulinas	12.9080 ± 0.08
Prolaminas	2.7293 ± 0.15
Glutelinas	18.0730 ± 0.83

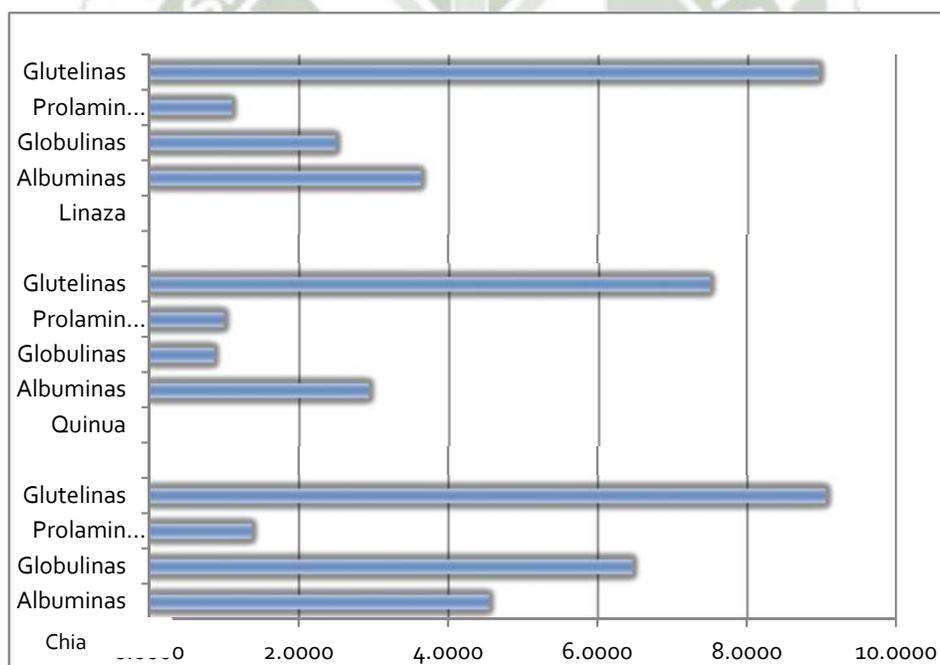
**Tabla N° 10: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de quinua usando el método Lowry.**

Quinua (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
Albúminas	5.8412 ± 0.19
Globulinas	1.7165 ± 0.08
Prolaminas	1.9760 ± 0.06
Glutelinas	14.9501 ± 0.64

En la tabla N° 11 se expresan los resultados de cuantificación de las diferentes fracciones de proteínas de reserva presentes en las semillas de linaza .Se observa que las glutelinas se encuentran en mayor proporción seguidas por las albúminas, globulinas y por ultimo de las prolaminas.

**Tabla N° 11: Resultados de cuantificación de fracciones proteínicas de reserva en semillas de linaza usando el método Lowry.**

Linaza (0.5 mL)	Proteínas ( g./kg de semilla)
<b>Albúminas</b>	7.2437 ± 0.33
<b>Globulinas</b>	4.9562 ± 0.17
<b>Prolaminas</b>	2.1904 ± 0.08
<b>Glutelinas</b>	17.8689 ± 0.65

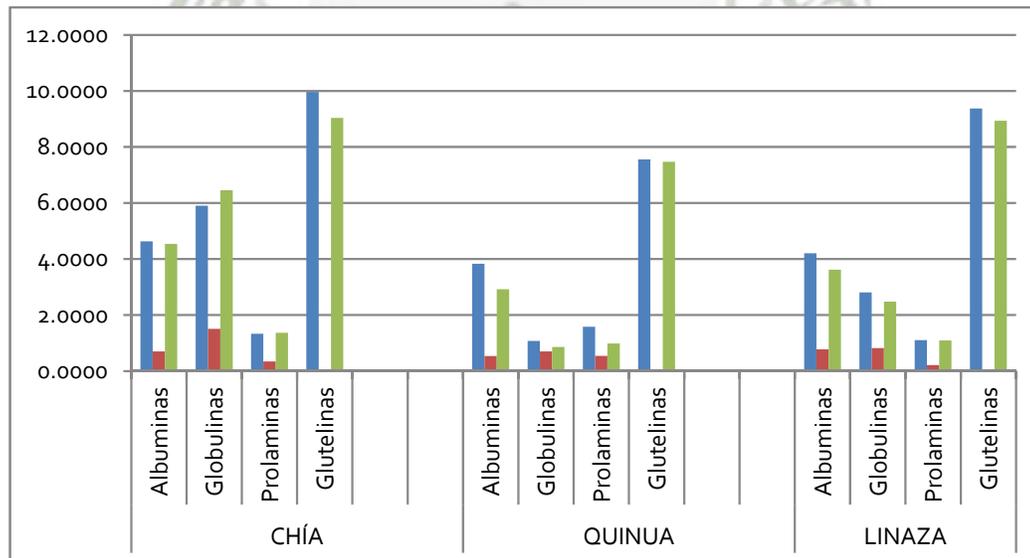


**Figura N° 20: Promedio del rendimiento de las fracciones de proteínas de reserva en semillas de chíá, linaza y quinua usando el método Lowry.**

En la figura N° 20 se encuentran los resultados de rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de proteínas de reserva de las semillas (chía, quinua y linaza). Se observa que las glutelinas representan la fracción más abundante, con un rendimiento de extracción por encima de las demás fracciones. De acuerdo a los datos obtenidos se puede decir que tanto en harina de chía y linaza el contenido de glutelinas es mayor (18.0730, 17.8689 respectivamente) y en menor cantidad en la harina de quinua (14.9501). Los datos obtenidos más la desviación estándar muestran resultados similares en harina de chía y linaza esto se debe a que ambos son pseudocereales con varias similitudes. Se observaron resultados parecidos en el método de Biuret. Para demostrar esto se realizó un análisis de varianza.

#### 4.3.4. Comparación de los métodos empleados para cuantificación

Se realizó un cuadro comparativo de los tres diferentes métodos utilizados para cuantificación: método de Biuret, método de Bradford, método de Lowry. (tabla N° 12).



**Figura N° 21: Cuadro comparativo de los métodos empleados para cuantificación de proteínas. Barras azules M. de Biuret; barras rojas M. de Bradford; barras verdes M. de Lowry.**

Donde se puede apreciar que el método más efectivo fue el de Biuret ya que se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados; el

método que también tuvo buenos resultados fue el método de Lowry pero no es confiable por el procedimiento que se utiliza ya que demanda más tiempo y mucho cuidado; el método de Bradford no dio buenos resultados ya que mostró interferencias con algunos diluyentes utilizados en el fraccionamiento de proteínas como el SDS. (Figura N° 21)

Los métodos de Biuret y Lowry dieron resultados cercanos lo cual comprueba que tanto chía y linaza tienen mayor cantidad de glutelinas y en menor cantidad la quinua, característica mostrada en los pseudocereales, esta proteína de reserva es utilizada en la industria de la panadería para proporcionar elasticidad a los panes y esponjosidad.

**Tabla N° 12: Comparación de los datos obtenidos en los tres métodos empleados para cuantificación.**

		BIURET	BRADFORD	LOWRY
		PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
<b>CHÍA</b>	Albúminas	4.6284	0.7070	4.5377
	Globulinas	5.9001	1.5129	6.4540
	Prolaminas	1.3358	0.3455	1.3646
	Glutelinas	9.9622	0.0000	9.0365
		PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
<b>QUINUA</b>	Albúminas	3.8287	0.5408	2.9206
	Globulinas	1.0793	0.7069	0.8583
	Prolaminas	1.5808	0.5447	0.9880
	Glutelinas	7.5535	0.0000	7.4750
		PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
<b>LINAZA</b>	Albúminas	4.2010	0.7755	3.6219
	Globulinas	2.8092	0.8206	2.4781
	Prolaminas	1.1044	0.2130	1.0952
	Glutelinas	9.3738	0.0000	8.9345

Entonces podemos decir que el método más conveniente para cuantificación de fracciones proteicas fue el método de Biuret con ventajas como su bajo costo y especificidad para proteínas sin interferencias mostradas con los diluyentes empleados para el fraccionamiento de proteínas de reserva.

#### **4.4. Caracterización bioquímica de las fracciones de Osborne**

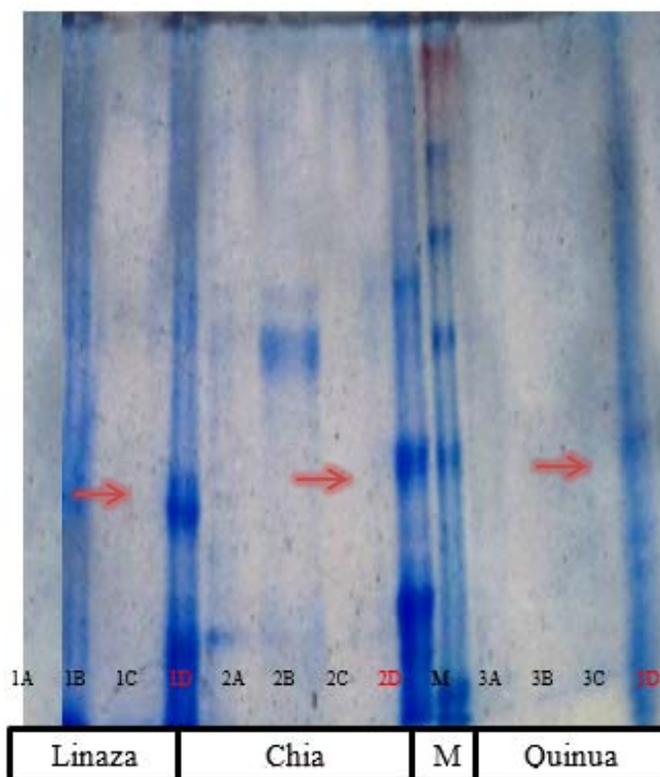
##### **4.4.1. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)**

Se realizó el perfil electroforético correspondiente a las cuatro fracciones de Osborne: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas; pertenecientes a las tres semillas. Se observó que las bandas de las glutelinas presentes en chía, linaza y quinua se mostraron con mayor intensidad en comparación con las albúminas y globulinas, por otro lado no se mostró intensidad en las bandas de prolaminas esto se debe a su baja concentración.

En la figura N° 22 se muestra el análisis SDS-PAGE de proteínas de reserva de semillas de chía, linaza y quinua. El gel de poliacrilamida al 12% fue teñido con azul de Coomassie el cual se cargó con 20 ul de proteína por carril y 10 ul de marcador de peso molecular conocido; carriles 1A, 2A, 3A pertenecientes a albúminas de linaza, chía y quinua respectivamente; carriles 1B, 2B, 3B pertenecientes a globulinas de linaza, chía y quinua respectivamente; carriles 1C, 2C, 3C pertenecientes a prolaminas de linaza, chía y quinua respectivamente; 1D, 2D, 3D pertenecientes a glutelinas de linaza, chía y quinua respectivamente; carril M perteneciente al marcador de peso molecular de 4 a 250 kDa. (See Blue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard).

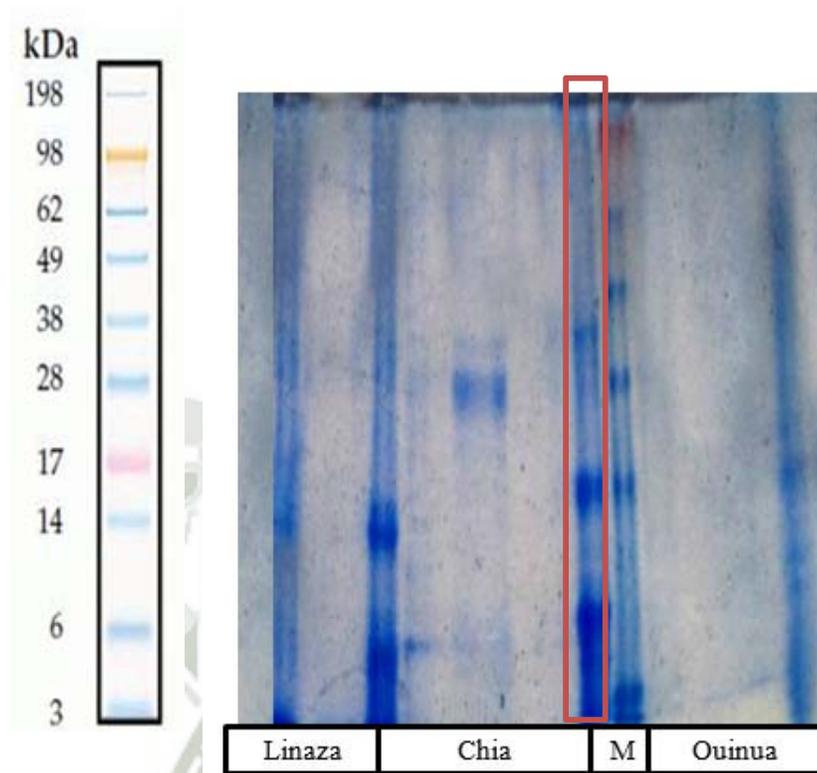
La fracción proteica de glutelinas mostró bandas entre 10 y 20 kDa. en relación con el marcador molecular utilizado. Este resultado se observó para los tres tipos de semillas con las cuales se trabajó (chía, linaza y quinua).

Se puede decir que los resultados obtenidos en el método de caracterización coinciden con los resultados de los métodos de cuantificación ya que se observan bandas de color intenso para esta proteína de reserva tanto en chía como en linaza.



**Figura N° 22: Perfil electroforético de Osborne. Análisis SDS-PAGE de proteínas de reserva de semillas de chíá, linaza y quinua.**

En la figura N° 23 se muestra el marcador de peso molecular conocido See Blue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard con bandas de 3 a 198 kDa, este marcador permite una fácil visualización de los rangos de pesos moleculares en proteínas durante la electroforesis con 8 bandas azules y 2 con colores de contraste las cuales se compararon con las bandas obtenidas en la electroforesis realizada en el presente trabajo.



**Figura N° 23: Marcador molecular See Blue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard, con un rango de 4 a 250 kDa.**

#### 4.5. Digestibilidad in vitro

Utilizando el método de Biuret (púrpura en presencia y amarillo si no hay presencia de proteínas) se pudo confirmar la presencia de proteínas en las soluciones. Se midió la caída de pH con el potenciómetro digital después de 10 minutos. La prueba se hizo por triplicado como se muestra en la tabla N°13, tabla N° 14 y tabla N° 15; para tener resultados más exactos lo que ayudara en la realización e interpretación del análisis estadístico; donde **pH 1**: pH al inicio de la prueba y **pH 2 (caída de pH)**: después de 10 minutos.

**Tabla N° 13: Primera medida de la caída del pH**

	pH 1	pH 2
<b>Chía</b>	8	7.28
<b>Quinoa</b>	8.04	7.65
<b>Linaza</b>	8.02	7.34

**Tabla N° 14: Segunda medida de la caída del pH**

	pH 1	pH 2
<b>Chía</b>	8.08	7.22
<b>Quinoa</b>	8.04	7.48
<b>Linaza</b>	8.03	7.26

**Tabla N° 15: Tercera medida de la caída del pH**

	pH 1	pH 2
<b>Chía</b>	8.06	7.32
<b>Quinoa</b>	8	7.59
<b>Linaza</b>	8	7.21

Para la obtención de los valores de digestibilidad *in vitro* se utilizó la siguiente fórmula:

$$y = 210.464 - 18.103x$$

Donde  $x = \text{pH}^2$

En la tabla N° 16 se muestran los resultados obtenidos a partir de la fórmula antes mencionada. Este análisis reveló que la harina de chía y linaza presentan un alto valor de digestibilidad con valores cercano (78.79; 78.85 respectivamente), en comparación con la quinua (73.36). Con estos valores se puede decir que tanto la chía, linaza y quinua no presenta inhibidores de proteasas las cuales pueden retardar la digestibilidad *in vitro*

**Tabla N° 16: Resultados de digestibilidad *in vitro* de harina de semilla de chía, quinua y linaza**

	<b>DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> (Y)</b>
<b>CHÍA</b>	78.7948 ± 0.91
<b>QUINUA</b>	73.3639 ± 1.56
<b>LINAZA</b>	78.8551 ± 1.18

Se realizó el análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula de que los promedios de pH obtenidos en la harina de semillas son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos uno de los porcentajes difiere de los demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales. Se encontro que hubo diferencia significativa entre los 3 grupos que

conforman las harinas de semillas de chía, quinua y linaza, esto luego de realizar la prueba de Tukey que nos ayuda a conocer entre que grupos existe diferencia (Anexo N° 6).



## CONCLUSIONES

PRIMERO: Se fraccionó, caracterizó y cuantificó proteínas de reserva en semillas de chíá (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*). Obteniendo como resultado la fracción proteica mayoritaria a las glutelinas presentes en los pseudocereales trabajados. Se puede decir que tanto la chíá como la linaza mostraron mayor cantidad de glutelinas y en menor cantidad la quinua.

SEGUNDO: Se desgrasó la harina de semillas de chíá (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*), utilizando el método de Soxhlet empleando al hexano como solvente; obteniendo mayor cantidad de grasa en harina de linaza (26,2833%) seguida por harina de chíá (24,5667) y harina de quinua (8,1167) con menor cantidad.

TERCERO: Se fraccionó proteínas de reserva: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas de chíá (*Salvia hispánica L.*), linaza (*Linum usitatissimum*) y quinua (*Chenopodium quinoa*); empleando el método modificado de Osborne.

CUARTO: Se cuantificó proteínas de reserva utilizando tres métodos colorimétricos: Método de Biuret, Método de Bradford, Método de Lowry. Mostrando mayor eficiencia el método de Biuret debido a que es específico para proteínas, muestra pocas interferencias y es económico; en comparación con el método de Bradford el cual muestra interferencias con el detergente empleado (SDS) y el método de Lowry que aunque tiene sensibilidad muestra errores debido a la técnica empleada la cual demandaba mayor cuidado.

QUINTO: Se caracterizó las proteínas de reserva empleando electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), en la cual se confirmó la presencia de las glutelinas como fracción proteica mayoritaria mostrando bandas con un peso molecular de 10 a 20 kDa.

SEXTO: Se evaluó la digestibilidad *in vitro* de la harina de semillas de los pseudocereales trabajados, mostrando que tanto la chíá (78,7948) como la linaza (78,8551) tienen una alta digestibilidad en comparación con la quinua (73,3639).

SÉPTIMO: Por último se puede decir que tanto chíá (*Salvia hispánica L.*) y linaza (*Linum usitatissimum*), por las características mostradas en la obtención de proteínas de reserva y con fracción mayoritaria a las glutelinas, tienen alta cantidad y calidad de estas en comparación a quinua (*Chenopodium quinoa*) con menores niveles.



## RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta temperatura, tiempo y pH para el buen rendimiento en los métodos empleados
- Se recomienda escoger el método colorimétrico más adecuado para la cuantificación de proteínas, teniendo en cuenta las ventajas e interferencias que presenta cada método.
- Para la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), tomar en cuenta el tiempo de gelificación del running gel y el stacking gel el cual deberá de ser menor a 15 minutos.



## REFERENCIAS

1. Hernández, L.; La flora endémica de la Sierra de Manantlan, Jalisco-Colima. Observaciones Preliminares; 1994; pág. 77.
2. Miranda, C.S.; Evolución de cultivares nativos de México. Ciencia y Desarrollo; 1978; pág 3:130-131
3. Dominguez-Vazquez, G., Berlín, B., Ramírez-Castro, A. y Estrada-Lugo, E.; Revisión de la diversidad y patrones de distribución de *Labiatae* en México.; 2002, Análisis del Instituto de Biología Vol. 73
4. Ayerza, R., y Coates, W., Ground chía seed and chía oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat.; 2005; pág. 995-1003
5. Beltrán-Orozco, M.C., Salgado-Cruz, M.P., y Cedillo-López, D.; Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chía y de la fibra dietética obtenida de la misma.; 2005; pág: 358-366
6. Ixtania, V.Y., Nolasco, S.M. y Tomas, M.C.; Psycical properties of chía sedes. Industrial Crops and protocols; 2008; pág: 286-293
7. Hernandez-Gomez, J.A., Miranda-Colin, S. y Peña-Lomeli, A.; Cruzamiento natural de chía. Revista Chapingo; 2008; pág: 331-337
8. Poudyal, H., Panchal, S., Waanders, J., Ward, L., Brown, L.; Lipid redistribution by acid linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet included obese rats; Journal of Nutritional Biochemistry.; 2012; pág: 153-162
9. Dubois, V., Brenton, S., Linder, M., Fanni, J., y Parmentier, M.; Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential; 2007; pág: 710-732
10. Brown, G., Coates. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease, Journal of Medicine; 2001; pág: 1584-1592
11. Muñoz, Cobos, Díaz; Chía seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. Journal of Food Engineering; ; 2012 pág: 108:224
12. Rodriguez, O.; Historia de la linaza; 2013; pág: 23.
13. Westcot ; Flax: Genus linum;2003
14. Chateaufneuf, R., Fuentes, A., Garrido F.; Política y económica del sector forestal; 2011; pág: 140-159
15. Erasmus, U.; Fats and oils.; Vanacouver; Alive Book; 1986; pág: 251

16. Budwing, J.; The oil Protein Doet CookBook; Apple Publishing Company; 1994; pág 153
17. Mujica; Flora fungosa de Chile; 2006; pág: 108
18. Herrera; Química de alimentos: manual de laboratorio; Editorial de la Universidad de costa rica; 2003; pág 37
19. Tatham, A.S. y Shewry, P.R.; The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and therman stabilities;Journal of Cereal Science; 1985; pág: 297-303
20. Vazquez-Ovando, A., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Ohysicochemical properties of a fibrous fraction from chia; Food Science and Technology; 2009; pág:168-173
21. Ferreira, R., Texeira, Rosa, MariaJ.; Storage Proteins from Lathyrus sativus sedes; 200; pág:5432-5439
22. Sambrook, J., Russell D.W; Molecular Cloning: A laboratory Manual; Volumen1; 2001
23. Hsu, H., Vavak, D., Satterle, L. y Miller, G.A., Multienzime technique for estimating protein digestinility; Journal of food Science; 1977; pág: 1269-1279
24. Di Sapio, O.; Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., y Severin, S.; Caracterización morfoanatómica de hoja tallo fruto y semilla de chíá; Boletín Latinoamericano de Plantas medicinales y aromáticas; 2012; pág: 249-268
25. Fukushima, D.; Structures of plants storage proteins and their function; Food Review International; 1991; pág: 353-381
26. Neil D. Westcott; Alister D. Muir; Flax: The genus Linum; 2003; pág: 23-25
27. Arboledas B. D.; Jerarquia estructural de las proteínas; Editorial Club Universitario; 2011; pág. 126.
28. Ayerza R; Chíá; Editorial del Nuevo Extremo; 2006; pág.67.
29. Bello José; Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos; Editorial Díaz de Santos; 2012; pág 250.
30. Beyer H.; Manual de química orgánica; Editorial Reverte; 1987;pág. 128.
31. Bolaños N.; Lutz G; Herrera C.; Química de Alimentos: Manual de Laboratorio; Editorial Universidad de Costa Rica; 2003; pág. 29.

32. Burgess R.; Deutscher M.; Guide to Protein Purification; Editorial Academic Press; 2009; pág. 507-509.
33. Canosa Rodriguez M; Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenes; Editorial Universidad de Santiago de Compostela; 2005; pág. 38.
34. Carrascosa J.; Modrego A; La Biotecnología y su aplicación industrial en España; Editorial CSIC Press; 1994; pág. 166.
35. Casado Sánchez E.; Operaciones básicas Laboratorio GM 12; Editorial Paraninfo; 2012; pág. 170.
36. Castagnino J.; Electroforesis: Aplicaciones biológicas y clínicas; 1978; pág. 145.
37. Cervantes Nemer B.; Loredo Enríquez J.; Manual pedagógico de prácticas de química general en microescala; Editorial Universidad Iberoamericana; 2006; pág. 150.
38. Denninson C.; A Guide to Protein Isolation; Editorial Kluwer; 2003; pág. 98-101.
39. Edward, Alton; Aceites y grasas industriales; Editorial Reverte; 1961; pág. 696-700.
40. Fernández M.; Avances en ingeniería genética; Editorial CSIC-Press, 1994; pág. 290.
41. García B. F.; Roselló J.; Santamarina S. P.; Introducción al funcionamiento de las plantas; Editorial Universitaria Valencia, 2006; pág. 174-176.
42. Gibaja S.; Pigmentos naturales quinónicos; Editorial Fondo; 2006; pág. 152.
43. Gil A.; Tratado de nutrición: Composición y calidad de los alimentos, Volumen 2; Editorial Panamericana; 2010; pág. 104 y 105.
44. Giraldo Giraldo, G.; Loango Chamorro N.; Mejía Doria C.; Laboratorio de Bioquímica: Una Visión Práctica; 2010; pág. 108,110.
45. Girón- Calle; Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial; 2005; pág. 63.
46. Grajales M. O.; Apuntes de Bioquímica Vegetal. Bases para su aplicación fisiológica; 2005; pág. 59- 62.
47. Harris D.; Análisis químico cuantitativo; Editorial Reverte; 2006; pág. 652.
48. Holmann F.; Lascano C.; Sistemas de alimentación con leguminosas; 2000; pág. 101.
49. Irwin N; Janssen K; Laboratory Manual, Molecular Cloning, Tercera edición, Volumen 1, Editorial Berg; 2001; pág. 201.
50. Lamarque A.; Maestri D.; Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica; Editorial Brujas; 2008; pág. 51

51. McNally E.; Hastedt; Protein Formulation and Delivery; Second Edition; Editorial CRC Press; 2007; pág. 84.
52. Mijan de la Torre A.; Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana; Editorial Glosa; 2002; pág. 190-195.
53. Muller, L; Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal; 2001; pág. 96-112.
54. Novella Costa E.; Botella Llusía J.; Los organismos unicelulares como fuente de proteínas; 1974; pág. 34.
55. Owusu-Apenten R.; Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing; Editorial CRC Press; 2002; pág. 43-45.
56. Quesada Mora S.; Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica; Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2007; pág. 32.
57. Raafat El-Gewely; Biotechnology Annual Review; Volumen 14; 2008; pág. 242.
58. Sanz Berzosa I; Raigén Jimenez M.; Llorens Molina J.; Llopis Castelló R.; Prácticas de química orgánica: Experimentación y desarrollo; Editorial Universidad Politécnica de Valencia; 2002; pág. 47-48.
59. Segal K. Claudia; Manual de Prácticas Biología Molecular de la Célula; 2005; pág 45-48.
60. Shewry P; Gutteridge S; Plant Protein Engineering; 1992; pág. 20-24
61. Smith B; Protein Sequencing Protocols; Editorial Springer Science & Business Media; 2002; pág 19-21.
62. Valcárcel Cases M; Gómez Hens A.; Técnicas analíticas de separación; Editorial Reverte; 1988; pág. 214.
63. Vásquez M. C.; De Cos B. A.; López N. C.; Alimentación y nutrición: Manual Teórico-Práctico; Editorial Díaz de Santos; 2005; pág 124-127.
64. Ministerio de agricultura y riego; El Perú es el principal productor y exportador de quinua en el mundo; 2015
65. Ministerio de agricultura y riego; Año internacional de la quinua; 2015
66. Luque; Estructura y propiedades de las proteínas; 2007

## ANEXOS

### ANEXO N° 1: DESGRASADO DE SEMILLAS - SISTEMA SOXHLET

#### 1. FOTOGRAFÍAS:

##### 1.1. Fotografía de las harinas de semillas de chía, linaza y quinua respectivamente



##### 1.2. Fotografía de hexano utilizado como solvente para el desgrasado de harina de semillas



### 1.3. Fotografía de la grasa obtenida en el sistema Soxhlet



### 2. CÁLCULOS:

$$\% \text{ grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

B<sub>1</sub>= masa del balón vacío

B<sub>2</sub>= masa del balón con grasa

m= masa de la harina

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
QUINUA	130.64	130.61	130.59
LINAZA	134.28	134.25	134.21
CHÍA	133.92	133.85	133.94

Tabla N° 17: Masas de los balones con grasa de las 3 repeticiones

### 2.1. Quinua

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{130.64-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 1} = 8.25$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{130.61-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 2} = 8.10$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{130.59-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 3} = 8.00$$

### 2.2. Linaza

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{134.28-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 1} = 26.45$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{134.25-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 2} = 26.30$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{134.21-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 3} = 26.10$$

### 2.3. Chía

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{133.92-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 1} = 24.65$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{133.85-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 2} = 24.30$$

$$\% \text{grasa} = \frac{B2-B1}{m} * 100$$

$$\% \text{grasa} = \frac{133.94-128.99}{20} * 100$$

$$\% \text{grasa 3} = 24.75$$

## ANEXO N° 2: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA:

### CUANTIFICACIÓN

#### 2.1. Reactivo de Biuret

Reactivo preparado del siguiente modo. Disolver 3,8 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 6,7 g NaEDTA en 700 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Mientras se agita añadir 200 mL de NaOH 5 N y luego 1g de KI como estabilizante. Guardar en frasco de plástico.

#### 2.2. Reactivo de Bradford

Reactivo preparado del siguiente modo: mezclar 10 mg de Coomassie Blue G-250 con 10 mL de fosfórico al 88 % y 4,7 mL de etanol absoluto.

Añadir  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 100 mL. Filtrar a través de papel de filtro y guardar en la oscuridad.

#### 2.3. Reactivo de Lowry

Se hicieron dos tipos de soluciones que llamaremos A y B, la B a su vez se divide en B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.

A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 %, NaOH 0.1 M

B<sub>1</sub>:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1 %

B<sub>2</sub>: Tartrato de sodio y potasio al 2 %

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Mezclar las soluciones B con la A y dejar reposar por 15 min en oscuridad.

Agregar Folin-Ciocalteu y mezclar bien, dejar reposar 30 min en oscuridad.

### ANEXO N° 3: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.1. FOTOGRAFÍAS:

3.1.1. Fotografía de la albúmina de suero bovino utilizado para realizar las curvas de calibración de los tres métodos colorimétricos . BSA Ultrapure Ambiom de 50mg/mL.



3.2. Fotografía de las fracciones proteicas en presencia del reactivo de Biuret.  
A) chíá, B) quinua, C) linaza.



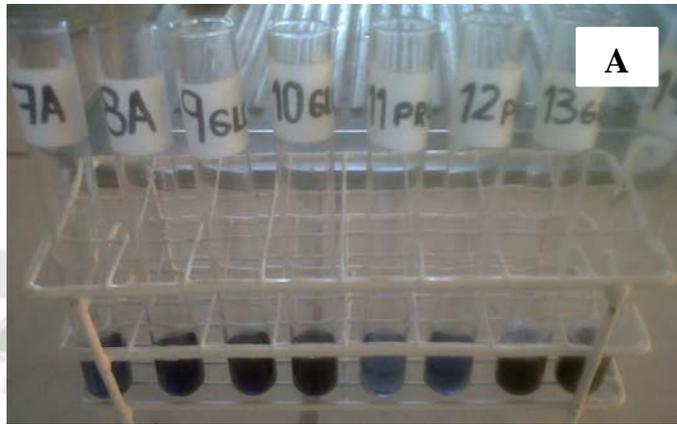


**3.3. Fotografía de BSA a diferentes concentraciones, mostrando presencia de proteínas con el método colorimétrico de Bradford.**



**3.4. Fotografía de las fracciones proteicas en presencia del reactivo de Lowry.**

**A) chía, B) quinua, C) linaza**



## ANEXO N° 4: PREPARACIÓN DEL GEL

Está constituido por gel Stacking y Running

### 4.1. GEL STACKING: Concentración estándar al 4 %

- H<sub>2</sub>O: 2.7 mL
- Poliacrilamida: 0.67 mL
- Tris pH 6.8 0.5 M: 0.5 mL
- SDS: 0.04 mL
- APS 10 %: 0.04 mL
- TEMED: 0.0004

### 4.2. GEL RUNNING: Concentración 12 %

- H<sub>2</sub>O: 4.9 mL
- Poliacrilamida: 6.0 mL
- Tris pH 8.8 1.5 M: 3.8 mL
- SDS: 0.15 mL
- APS 10 %: 0.15 mL
- TEMED: 0.006

### 4.3. BUFFER SAMPLE 2X

- $\beta$ - mercaptoetanol
- Glicerol
- SDS
- Azul de Bromofenol

#### 4.4. FOTOGRAFÍAS DE LA CORRIDA DEL GEL

4.4.1. Fotografía de los materiales empleados para la preparación del stacking gel y el running gel.



4.4.2. Fotografía del gel preparado en la placa.



**4.4.3. Fotografía del marcador de peso molecular de 4 a 250 kDa. (See Blue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard)**



**4.4.4. Fotografía de la cámara electroforética conectada a la fuente de poder**



**4.4.5. Fotografía del llenado de los pozos con las fracciones proteicas de la harina de semillas.**



**4.4.6. Fotografía del gel en la cámara de corrido con las fracciones proteicas en los pozos**



**4.4.7. Fotografía del gel teñido con azul brillante Coomassie G250 a una concentración sometido a decoloración con agua destilada.**



## ANEXO N° 5: DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

### 5.1. FOTOGRAFÍAS

#### 5.1.1. Fotografía de las enzimas para proteínas: tripsina y pepsina



#### 5.1.2. Fotografía de la harina de semillas con el reactivo de Biuret mostrando presencia de proteínas (color violeta)



### 5.1.3. Fotografía de la solución multienzimática en baño de hielo



## 5.2. CÁLCULOS

### 5.2.1. Chía

#### Caso 1

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.28$$

$$y = 78.6741$$

#### Caso 2

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.22$$

$$y = 79.7603$$

#### Caso 3

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.32$$

$$y = 77.9500$$

**Promedio:** 78.7948

**Desviación estándar:** 0.91

**Coefficiente de variación:** 1.1563

### 5.2.2. Quinua

#### Caso 1

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.65$$

$$y = 71.9760$$

#### Caso 2

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.48$$

$$y = 75.0535$$

#### Caso 3

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.59$$

$$y = 73.0622$$

**Promedio:** 73.3639

**Desviación estándar:** 1.56

**Coefficiente de variación:** 2.127

### 5.2.3. Linaza

#### Caso 1

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.34$$

$$y = 77.5879$$

**Caso 2**

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.26$$

$$y = 79.0362$$

**Caso 3**

$$y = 210.464 - 18.103 * x$$

$$y = 210.464 - 18.103 * 7.21$$

$$y = 79.9413$$

**Promedio:** 78.8551

**Desviación estándar:** 1.18

**Coefficiente de variación:** 1.5054



## ANEXO N° 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del software de Microsoft Office Excel 2013 para los datos obtenidos en la determinación del contenido de grasa encontrada en cada harina de semilla de chía, quinua y linaza, la cuantificación de proteínas de reserva de estas y digestibilidad *in vitro*.

Se realizó el análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula con 95% de confiabilidad con los promedios de las poblaciones frente a la hipótesis alternativa también de 95% de confiabilidad, de que por lo menos una de las poblaciones difiere de los demás en cuanto a su valor esperado.

Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales. Se obtuvo que si hubo diferencia significativa entre los grupos, esto luego de realizar la prueba de Tukey que nos ayuda a conocer entre que grupos existe diferencia.

### **Determinación del contenido de grasa encontrada en cada harina de semillas de quinua, chía y linaza.**

Se calculó los promedios y desviación estándar del porcentaje de grasa obtenida de cada harina de semillas (Tabla N° 18), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 19).

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia.

**Tabla N° 18:** Promedio y desviación estándar del % de grasa de cada semilla.

	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Quinoa</b>	8.1167	± 0.1258
<b>Chía</b>	26.2833	± 0.1756
<b>Linaza</b>	24.5667	± 0.2363

**Tabla N° 19:** Análisis de varianza a partir de los promedios de % de grasa.

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	603.5772222	2	301.7886	8832.8374	0.00000000004
<b>Dentro de los grupos</b>	0.205	6	0.0342		
<b>Total</b>	603.7822222	8			

Posteriormente se halló HSD (Diferencia Honestamente Significativa), utilizando el multiplicador que se obtuvo de las tablas de Tukey, MSe que es el cuadrado del error medio que se halló dividiendo la suma de cuadrados y los grados de libertad y "n" que es el número de componentes de cada grupo. (Tabla N° 20)

**Tabla N° 20:** Obtención del valor de HSD

<b>HSD</b>	<b>0.1096</b>
<b>Multiplicador</b>	3.93
<b>MSe</b>	0.0023
<b>n</b>	3

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el porcentaje de grasa de quinua, chía y linaza debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N° 21)

**Tabla N° 21: Diferencia significativa entre el contenido de grasa de cada harina de semilla.**

	<b>Quinua</b>	<b>Chía</b>	<b>Linaza</b>
<b>Quinua</b>	-	-18.1667	-16.4500
<b>Chía</b>	18.1667	-	1.7167
<b>Linaza</b>	16.450	1.7167	-

### **Cuantificación de proteínas de reserva**

#### **Albúminas**

Se calculó los promedios y desviación estándar del contenido de albúminas en cada ensayo realizado con harina de semillas de chía, quinua y linaza usando el método de Biuret (Tabla N° 22), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 23).

Debido a que el valor de probabilidad es mayor a 0.05 entonces se puede decir que no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que no es necesario realizar la prueba de Tukey.

**Tabla N° 22: Promedios y desviación estándar del contenido de albúminas.**

	Promedio	Desviación estándar
<b>Chía</b>	4.2284	0.2645
<b>Quinoa</b>	3.8287	0.3007
<b>Linaza</b>	4.2010	0.2995

**Tabla N° 23: Análisis de varianza del contenido de albúminas en cada semilla.**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.299132807	2	0.149566403	1.79426392	0.245017977
<b>Dentro de los grupos</b>	0.500148507	6	0.083358084		
<b>Total</b>	0.799281313	8			

### **Globulinas**

Se calculó los promedios y desviación estándar del contenido de globulinas en cada ensayo realizado con harina de semillas de chía, quinua y linaza usando el método de Biuret (Tabla N° 24), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 25).

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia.

**Tabla N° 24: Promedio y desviación estándar del contenido de globulinas**

	Promedio	Desviación estándar
<b>Chía</b>	5.9001	0.4706
<b>Quinua</b>	1.0793	0.1592
<b>Linaza</b>	2.8092	0.4429

**Tabla N° 25: Análisis de varianza del contenido de globulinas**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	35.78598349	2	17.89299174	121.1792766	1.40999E-05
<b>Dentro de los grupos</b>	0.885943153	6	0.147657192		
<b>Total</b>	36.67192664	8			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa).

**Tabla N° 26: Obtención del valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>0.9628</b>
<b>Multiplicador</b>	4.3400
<b>Mse</b>	0.1477
<b>n</b>	3.0000

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el contenido de globulinas de quinua, chía y linaza debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N° 27).

**Tabla N° 27: Diferencia significativa de los promedios del contenido de globulinas en harina de semillas de chía, quinua y linaza.**

	Chía	Quinua	Linaza
Chía		4.8208	3.0909
Quinua	-4.8208		-1.7298
Linaza	-3.0909	1.7298	

### Prolaminas

Se calculó los promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de prolaminas en harina de semillas de chía, quinua y linaza. (Tabla N° 28), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 29).

**Tabla N° 28: Promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de prolaminas.**

	Promedio	Desviación estándar
Chía	1.3358	0.0793
Quinua	1.5808	0.1481
Linaza	1.1044	0.0993

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia. (Tabla N° 30).

**Tabla N° 29: Análisis de varianza del contenido de prolaminas.**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.340528829	2	0.170264414	13.42015972	0.006098621
<b>Dentro de los grupos</b>	0.076123273	6	0.012687212		
<b>Total</b>	0.416652102	8			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa)

**Tabla N° 30: Valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>0.2822</b>
<b>Multiplicador</b>	4.34
<b>Mse</b>	0.0127
<b>n</b>	3

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el contenido de prolaminas en semillas de quinua y linaza debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N° 31).

**Tabla N° 31: Diferencia significativa del contenido de prolaminas en semillas de chí, quinua y linaza**

	<b>Chía</b>	<b>Quinua</b>	<b>Linaza</b>
<b>Chía</b>		-0.2450	0.2314
<b>Quinua</b>	0.2450		0.4764
<b>Linaza</b>	-0.2314	-0.4764	

## Glutelinas

Se calculó los promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de glutelinas en harina de semillas de chía, quinua y linaza. (Tabla N° 32), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos. (Figura N° 33).

**Tabla N° 32: Promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar el contenido de glutelinas**

	Promedio	Desviación estándar
<b>Chía</b>	9.9623	0.9743
<b>Quinua</b>	6.9535	0.6179
<b>Linaza</b>	9.3738	0.8379

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia. (Tabla N° 34)

**Tabla N° 33: Análisis de varianza**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	15.25646003	2	7.628230013	11.2564254	0.0093182
<b>Dentro de los grupos</b>	4.066067033	6	0.677677839		
<b>Total</b>	19.32252706	8			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa)

**Tabla N° 34: Obtención valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>2.0627</b>
<b>Multiplicador</b>	4.3400
<b>Mse</b>	0.6777
<b>n</b>	3.0000

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el contenido de glutelinas en semillas de quinua y linaza además de chía y quinua debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N°35)

**Tabla N° 35: Diferencia significativa entre el contenido de glutelinas**

	<b>Chía</b>	<b>Quinua</b>	<b>Linaza</b>
<b>Chía</b>		3.0087	0.5885
<b>Quinua</b>	-3.0087		-2.4203
<b>Linaza</b>	-0.5885	2.4203	

### **Digestibilidad *in vitro***

#### **Chía**

Se calculó los promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH al principio de la prueba y después de 10 minutos. (Tabla N° 36), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 37).

**Tabla N° 36: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH.**

	pH 1	pH 2
<b>Promedio</b>	8.0267	7.2733
<b>Desviación estándar</b>	0.0462	0.0503

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia. (Tabla N° 38).

**Tabla N° 37: Análisis de varianza.**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.851266667	1	0.851266667	364.828571	0.00004427
<b>Dentro de los grupos</b>	0.009333333	4	0.002333333		
<b>Total</b>	0.8606	5			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa)

**Tabla N° 38: Obtención valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>0.1096</b>
<b>Multiplicador</b>	3.9300
<b>Mse</b>	0.0023
<b>N</b>	3.0000

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el pH 1 y pH 2 debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N°39)

**Tabla N° 39: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH**

	<b>pH 1</b>	<b>pH 2</b>
<b>pH 1</b>		0.7533
<b>pH 2</b>	- 0.7533	

### Quinua

Se calculó los promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH al principio de la prueba y después de 10 minutos (Tabla N° 40), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 41).

**Tabla N° 40: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH**

	<b>pH 1</b>	<b>pH 2</b>
<b>Promedio</b>	8.0267	7.5733
<b>Desviación estándar</b>	0.0231	0.0862

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras, según su diferencia. (Tabla N°42)

**Tabla N° 41: Análisis de varianza**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.308266667	1	0.308266667	77.3891213	0.000921034
<b>Dentro de los grupos</b>	0.015933333	4	0.003983333		
<b>Total</b>	0.3242	5			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa)

**Tabla N° 42: Obtención del valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>0.1432</b>
<b>Multiplicador</b>	3.9300
<b>Mse</b>	0.0040
<b>n</b>	3.0000

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el pH 1 y pH 2 debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N° 43)

**Tabla N° 43: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH**

	pH 1	pH 2
pH 1		0.4533
pH 2	-0.4533	

**Linaza**

Se calculó los promedios y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH al principio de la prueba y después de 10 minutos (Tabla N° 44), además del análisis de varianza que permite contrastar la hipótesis nula y alternativa de los datos obtenidos (Tabla N° 45).

Debido a que el valor de probabilidad es menor a 0.05 entonces se puede decir que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey, para agrupar las muestras según su diferencia. (Tabla N° 46).

**Tabla N° 44: Promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado para hallar la caída de pH**

	pH 1	pH 2
Promedio	8.0367	7.2700
Desviación estándar	0.0208	0.0656

**Tabla N° 45: Análisis de varianza**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Entre grupos</b>	0.308266667	1	0.308266667	77.389121	0.000921034
<b>Dentro de los grupos</b>	0.015933333	4	0.003983333		
<b>Total</b>	0.3242	5			

Se procedió hallar el valor de HSD (Diferencia honestamente significativa)

**Tabla N° 46: Obtención del valor de HSD**

<b>HSD</b>	<b>0.1432</b>
<b>Multiplicador</b>	3.9300
<b>Mse</b>	0.0040
<b>n</b>	3.0000

Entonces a partir de la siguiente tabla podemos decir que existe diferencia significativa entre el pH 1 y pH 2 debido que el HSD es menor a la diferencia de promedios de estos grupos. (Tabla N ° 47)

**Tabla N° 47: Diferencia significativa entre los promedios de cada pH**

	<b>pH 1</b>	<b>pH 2</b>
<b>pH 1</b>		0.7667
<b>pH 2</b>	-0.7667	