

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**COMPARACIÓN DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN
DE CARBOHIDRATOS EN HARINA DE TARWI (LUPINUS MUTABILIS)**

TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS

POSTULANTE: GASTON LUIS NINA MOLLISACA

TUTOR: LILY SALCEDO ORTIZ MSc.

LA PAZ – BOLIVIA

2017

DEDICATORIA

*Este trabajo lo dedico a los seres que más quiero en este mundo y son muy valiosos para mí
“A mis padres” Gracias por todo su apoyo*

AGRADECIMIENTO

A mis padres por brindarme el apoyo incondicional a lo largo de la carrera, estando junto a mí en todo momento con su amor, y comprensión para seguir adelante

A mi tutora MSc. Lily Salcedo Ortiz por brindarme el incondicional asesoramiento en la dirección de la presente investigación.

A la Carrera de Ciencias Químicas por la formación académica ofrecida.

Al ingeniero Jaime Chincheros y al LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD en donde realice mis pasantías, por brindarme los ambientes y conocimientos en el desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	1
Agradecimientos.....	2
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	6

Capítulo I

Introducción

1.1 Introducción.....	7
-----------------------	---

Capítulo ii

Objetivos

2.1. Objetivo general.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13

Capítulo III.....14

Marco teórico

3.1. Carbohidratos.....	15
3.2. Clasificación de los carbohidratos.....	16
3.2. Monosacáridos.....	16
3.2.2. Disacáridos.....	17
3.2.3. Oligosacáridos.....	18
3.2.4. Polisacáridos.....	19
3.3. Polisacáridos en granos comestibles.....	21
3.3.1. Almidón.....	21
3.3.2. Amilosa.....	21
3.3.3. Amilopectina.....	22
3.3.4. Carbohidratos en el tarwi.....	23
3.4. Métodos para la determinación de carbohidratos.....	24
3.4.1. Método fenol sulfúrico.....	25
3.4.2. Método ácido dinitrosalicílico.....	26
3.4.3. Método óptico de polarimetría.....	26

3.4.4. Determinación de azúcares por HPLC.....	28
3.4.5. Determinación de azúcares por IR.....	29
3.5. Hidrolisis química de carbohidratos.....	30
3.6. Enzimas carbohidrasas.....	30
3.6.1. Alfa amilasa.....	31
3.6.3. Amiloglucosidasa.....	32
3.7 Hidrolisis enzimática.....	33
Capítulo IV	
4. Justificación.....	34
Capítulo V.....	37
5. Metodología.....	38
5.1. Materia prima.....	38
5.2. Análisis Proximal.....	38
5.3. Método fenol sulfúrico.....	40
5.3.1. Tratamiento de la muestra para determinar azúcares libres.....	40
5.3.2. Tratamiento de la muestra para determinar azúcares totales.....	41
5.4. Método DNS para la determinación de azúcares totales.....	41
5.5. Hidrolisis acida de harina de tarwi.....	42
5.5.1. Tratamiento de la muestra para la hidrolisis acida	42
5.6. Determinación de carbohidratos digeribles por alfa amilasa y amyloglucosidasa.....	43
5.6.1 Hidrolisis enzimática de harina de tarwi.....	43
Capítulo VII.....	45
6. resultados y discusión.....	46
6.1. Resultados obtenidos tras el análisis proximal de harina de tarwi.....	46
6.2. Determinación de azúcares libres en la muestra método Dubois.....	46
6.2.1 Curva Patrón de Glucosa (Método fenol sulfúrico).....	47
6.2.2 Determinación de azúcares libres (método Dubois).....	47
6.3. Determinación de la azúcares totales (método Dubois).....	48
6.4 Determinación de la concentración de azúcares totales por Hidrolisis acida (método DNS).....	49
6.4.1. Curva Patrón de Glucosa (Método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)).....	49
6.4.2 Porcentaje de azúcares reductores post hidrolisis acida en harina de tarwi HT (método DNS).....	51

6.5. Porcentaje de azúcares reductores equivalentes a dextrosa (ED) post hidrólisis enzimática(método Dubois).....	51
Capítulo VII.....	52
7. Conclusiones.....	54
Capítulo VIII.....	55
8. REFERENCIAS.....	56
Capítulo IX	
9. Anexos.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura1. Amilosa	22
Figura2. Amilopectina.....	23
Figura3. Representation de la hidrolisis de un disacárido	29
Figura4. Enzima α - <i>Amilasa</i>	30
Figura5. Enzima Amiloglucosidasa	32
Figura6. Flujograma de procedimiento de la hidrolisis enzimática	44
Figura7. Linealidad de la curva patrón de glucosa (20-100ppm) por el método Dubois	47
Figura8. Lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm correspondientes a soluciones patrón de glucosa p.a. (método DNS).....	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Normas empleadas para el análisis proximal	40
Tabla 2. Condiciones ópticas de la α -amilasa Thermamyl Sc .Y amyloglucosidasa	43
Tabla 3. Resultados de análisis proximal	46
Tabla 4. Concentración de azúcares libres eq a dextrosa en harina de tarwi	47
Tabla 5. % de carbohidratos ED en la harina de tarwi (HT) por el método Dubois	48
Tabla 6. Azúcares totales expresados en ED en % de tarwi (método DNS)	50
Tabla7. % de carbohidratos Ed post hidrolisis enzimática con α amilasa y amyloglucosidasa en harina de tarwi (HT) por el método Dubois	51

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

Los hidratos de carbono constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con un rango elevado de propiedades y diferencias entre ellos a nivel físico, químico, y de propiedades fisiológicas.

Los carbohidratos, también denominados glúcidos, son la fuente más barata e importante de energía y están presentes en un amplio grupo de alimentos, sobre todo de origen vegetal. Son la fuente energética primordial en la dieta humana, pudiendo suponer un porcentaje entre 40 y 80 % de la ingesta total de energía. En conjunto con las grasas y las proteínas constituyen uno de los tres principales grupos químicos que forman la materia orgánica. (1)

En los últimos años, ha habido grandes avances en la comprensión de cómo influyen los carbohidratos en la nutrición y la salud humana. Además de la función como fuente de energía para el metabolismo celular, los hidratos de carbono afectan a otros parámetros fisiológicos como la saciedad, el metabolismo glúcido y lipídico y sus hormonas reguladoras, así como la función del tracto gastrointestinal incluyendo la flora bacteriana y el sistema inmune, entre otros. Esto supone que los hidratos de carbono tienen un impacto importante en la salud en general contribuyendo a numerosos indicadores de la salud humana como son el control del peso corporal; enfermedades metabólicas; densidad ósea, entre otras. El proceso en la investigación en nutrición humana ha puesto de manifiesto las diversas funciones que tiene los carbohidratos así como su importancia en la salud humana. (2)

El estudio científico de los hidratos de carbono comenzó con el entendimiento moderno de la ciencia de la nutrición a finales del siglo XVIII con Lavoisier con quien hubo un gran avance en el conocimiento de los macronutrientes y el metabolismo energético.

Las ideas de Lavoisier abrieron los caminos sobre los procesos de la nutrición y, aunque e muchos detalles han sido modificadas, en esencia sus principios perduran aun en nuestros días. Además sus trabajos tienen el mérito de asentar las bases de una nueva técnica: la técnica de la fisiología de la nutrición.

En primer lugar, se elucidó el valor energético de la combustión de los alimentos, realizado por el mismo Lavoisier con una gran precisión, después se distinguieron sus principales componentes y finalmente su papel en el metabolismo.

Como resultado de todo ello se reconocen tres componentes principales en los alimentos: los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas todas ellas sustancias orgánicas diferentes unas de otras y que eran fáciles de distinguir de otros componentes inorgánicos como los minerales, mediante una simple manipulación química. (1)

En los comienzos del siglo XIX, químicos de la escuela francesa como Berthelot, Gay-lussac, Thenard entre otros junto con el sueco Berzelius y el escocés Thomson, seguían investigando sobre el contenido de nitrógeno, carbono, hidrogeno y agua de diferentes alimentos y bebidas, empezándose a determinar el contenido de carbohidratos en los alimentos. Mientras, en los Estados Unidos, Wilbur Olin Atwater y Graham Lusk siguieron profundizando en el estudio de la energía metabolizable de los componentes energéticos de los alimentos estableciendo a finales del siglo XIX el valor calórico de los hidratos de carbono, proteínas y grasas.(2)

El término hidrato de carbono o carbohidratos es poco apropiado, ya que estas moléculas no son átomos de carbono hidratados, es decir, enlazados a moléculas de agua, sino que constan de átomos de carbono unidos a otros grupos funcionales químicos. De ahí el término “carbo- hidratado “se haya mantenido, si bien posteriormente se vio que otras moléculas con las mismas características químicas no se corresponden a esa fórmula. (4)

A partir de los años 50 del siglo XX y con la profundización el estudio del papel de los hidratos de carbono en la salud humana, se crearon diferentes paneles y comités científicos, especialmente los procedentes de la FAO y la OMS que además de revisar sus funciones en el organismo han empezado a establecer las recomendaciones de consumo. En este sentido, en 1977 se celebra el primer “ Join FAO/WHO Expert Meeting on carbohydrates in human Nutrition “ en el que se trata las importantes funciones de estos nutrientes en la alimentación y nutrición humana: i) como fuente de energía y estado nutricional, ii) como factor determinante en la función intestinal; iii) como determinante de la propiedad de los alimentos, y iv) como nutriente implicado en algunas de la enfermedades crónicas metabólicas todavía emergentes(1).

A lo largo de los años 80 y 90 este panel de científicos siguió haciendo documentos científicos sobre la ampliación del papel de los carbohidratos en la salud y las técnicas para su determinación en alimentos, así como se ha introducido el concepto de índice glucémico y se han pautado las recomendaciones respecto al aporte energético que deben suponer los glúcidos en la alimentación humana (2,3).

Entre los años 2000 y 2004, y en el mismo marco de la FAO/OMS se han revisado la clasificación de los carbohidratos a nivel fisiológico, así como se ha revisado la evidencia científica con relación a las enfermedades crónicas metabólicas,

aportaciones que conllevaron a la redacción de los documentos Diet,nutrition and the prevention of choronic diseases en 2003 (9) y WHO global stratgy on diet, physical activity en 2004 (4).



CAPÍTULO II

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la concentración de carbohidratos en harina de tarwi a través de diferentes métodos espectrofotométricos en relación al método tradicional

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de carbohidratos por el método tradicional.
- Cuantificar la concentración de carbohidratos en harina de tarwi por el método Dubois.
- Determinar la concentración de carbohidratos en harina de tarwi por el método DNS por hidrolisis acida.
- Determinar la concentración de azucares libres por el método Dubois pos hidrolisis enzimática (amilasa y amyloglucosidasa).
- Comparar los resultados obtenidos en ambos métodos.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO



3. MARCO TEÓRICO

3.1. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son biomoléculas que tienen una gran importancia en el campo de la investigación de las ciencias de la vida y en la aplicación industrial derivada de ello. En la literatura se han reportado diferentes métodos analíticos para la determinación de carbohidratos, basados en la espectrofotometría, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la refractometría, entre otras [6].

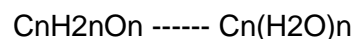
Existe una variedad de métodos colorimétricos los cuales utilizan reactivos distintos como antrona, fenol, orcinol o resorcinol [10]. Uno de los métodos colorimétricos para la determinación de la concentración de carbohidratos más ampliamente utilizado es el desarrollado por DuBois et al. Debido a la facilidad del procedimiento, sensibilidad, rapidez de los resultados y por ser apropiado para cuantificar diferentes azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. La mayoría de los métodos se basa en la determinación de azúcares reductores por lo que previa aplicación se deben convertir los polisacáridos y oligosacáridos en monosacáridos para lo cual se utilizan métodos químicos o enzimáticos. Entre los métodos más utilizados se encuentran: el de Fehling, el de Dinitro salicílico (DNS), el Somogy Nelson, entre otros. Entre los últimos métodos que se aplican se encuentra el método enzimático de la glucosa oxidasa.

El cuantificar e identificar el tipo de carbohidrato en un alimento es muy importante por la importancia que tienen en la salud.

La aplicación de los carbohidratos a nivel industrial para fabricar tejidos, películas fotográficas, plásticos y otros productos. La celulosa se puede convertir en rayón de viscosa y productos de papel. El nitrato de celulosa (nitrocelulosa) se utiliza en películas de cine, cemento, pólvora de algodón, celuloide y tipos similares de plásticos. El almidón y la pectina, un agente cuajante, se usan en la preparación de alimentos para el hombre y el ganado. La goma arábiga se usa en medicamentos demulcentes. El agar, un componente de algunos laxantes, se utiliza como agente espesante en los alimentos y como medio para el cultivo bacteriano; también en la preparación de materiales adhesivos, de encolado y emulsiones. La hemicelulosa se emplea para modificar el papel durante su fabricación. Los dextranos son polisacáridos utilizados en medicina como expansores de volumen del plasma sanguíneo para contrarrestar las conmociones agudas. Otro hidrato de carbono, el sulfato de heparina, es un anticoagulante de la sangre.

3.2. CLASIFICACION DE CARBOHIDRATOS

Los hidratos de carbono son una familia de sustancias ampliamente difundidas entre los alimentos compuestos por carbono, hidrogeno y oxígeno y que se caracterizan por obedecer a la formula empírica de donde procede su denominación de hidratos de carbono:



3.2.1.MONOSACARIDOS

Los monosacáridos son los azúcares más sencillos, pues no pueden descomponerse por hidrólisis para dar lugar a otros azúcares más simples. En la naturaleza se

encuentran en estado libre, desempeñando importantes funciones, pero también se encuentran formando parte de otros azúcares más complejos, los ósidos, de los cuales son sus sillares estructurales. La estructura básica de todos los monosacáridos es una cadena de átomos de carbono no ramificada en la que todos ellos están unidos por enlaces simples. Uno de estos átomos de carbono está unido a uno de oxígeno por un enlace doble formando un grupo carbonilo; todos los demás están unidos a grupos hidroxilo. Si el grupo carbonilo se encuentra en un extremo de la cadena carbonada el monosacárido es un aldehído y recibe el nombre de aldosa; si el grupo carbonilo se encuentra en cualquier otra posición el monosacárido es una cetona y recibe el nombre de cetosa. Los monosacáridos naturales tienen entre tres y ocho átomos de carbono, aunque los de siete y ocho son relativamente raros. Según tengan 3, 4, 5, 6... Carbonos se denominan respectivamente triosas, tetrasas, pentosas, hexosas.(7)

3.2.2.DISACÁRIDOS

Los monosacáridos capaces de formar anillos de piranosa o furanosa, en tanto que hemiacetales o hemiacetales intramoleculares, pueden reaccionar con los alcoholes para formar glucósidos liberándose en el proceso una molécula de agua. Un caso particular de este tipo de reacción se da cuando el grupo hidroxilo de la molécula de alcohol es aportado por un segundo monosacárido. El compuesto resultante, un disacárido, estará formado por dos monosacáridos unidos mediante enlace glucosídico. Así pues, el enlace glucosídico resulta de la formación de un acetal (o cetal) entre el carbono carbonílico de un monosacárido y un grupo hidroxilo de otro monosacárido. Este segundo monosacárido posee otro carbono carbonílico libre que a su vez puede reaccionar con un grupo hidroxilo de un tercer monosacárido para formar otro enlace

glucosídico, y así sucesivamente. De este modo, mediante sucesivos enlaces glucosídicos, se puede unir un número ilimitado de monosacáridos para formar largas cadenas que pueden ser lineales o ramificadas. En todos los ósidos, azúcares formados por un número variable de monosacáridos unidos entre sí, la unión entre los mismos se realiza mediante este tipo de enlace. El enlace glucosídico puede ser de dos tipos, α o β , según sea α o β la configuración del monosacárido que aporta al enlace el átomo de carbono carbonílico. Por otra parte, se distinguen enlaces glucosídicos monocarbonílicos, en los que sólo está implicado el carbono carbonílico de un monosacárido, y enlaces glucosídicos dicarbonílicos, en los que están implicados los carbonos carbonílicos de los dos monosacáridos enlazados. La estructura de un enlace glucosídico se suele especificar escribiendo el tipo de enlace, α o β , seguido entre paréntesis por los números de los átomos de carbono implicados en él; el número que se escribe en primer lugar corresponde al átomo de carbono carbonílico. Algunos ejemplos son $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow4)$, $\beta(1\rightarrow2)$, etc. Puesto que los monosacáridos tienen muchos grupos hidroxilo, la variedad de enlaces glucosídicos posibles es enorme; no obstante, los más abundantes en la naturaleza son los $\alpha(1\rightarrow4)$ y los $\beta(1\rightarrow4)$.(7)

3.2.3. OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos (del griego oligos = poco) son holósidos compuestos por un número reducido de unidades monosacarídicas unidas mediante enlaces glucosídicos. El número de unidades monosacarídicas que forman parte de un oligosacárido puede oscilar entre 2 y 10. Si están formados por sólo dos monosacáridos se denominan

disacáridos, si lo están por tres trisacáridos; a los que están formados por más de tres monosacáridos no se le suele asignar ninguna denominación específica y se suelen nombrar sencillamente como oligosacáridos. Sus propiedades físicas son muy similares a las de los monosacáridos: también son sólidos cristalinos, de color blanco, sabor dulce y soluble en agua. La mayoría de ellos conserva el poder reductor característico de los monosacáridos. Este poder reductor reside en los 12 átomos de carbono carbonílicos y se pierde cuando éstos participan en un enlace glucosídico. Por ello, cuando dos monosacáridos se unen mediante un enlace glucosídico monocarbonílico el di sacárido resultante tendrá poder reductor, ya que conserva un carbono carbonílico libre. Por el contrario, si el enlace es dicarbonílico el disacárido resultante, al tener sus dos carbonos carbonílicos implicados en el enlace, habrá perdido el poder reductor. En general, los oligosacáridos, independientemente de su longitud, tendrán poder reductor siempre que conserven algún carbono carbonílico libre en uno de sus extremos, que se denomina extremo reductor. Los oligosacáridos más abundantes y de mayor importancia biológica son los disacáridos.(7,8)

3.2.4.POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos son glúcidos formados por un número elevado de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. En el proceso de unión de n monosacáridos para formar un polisacárido se liberan (n-1) moléculas de agua, una por cada enlace glucosídico. Aunque el límite entre oligosacáridos y polisacáridos se suele fijar arbitrariamente en 10 unidades monosacarídicas constituyentes, lo cierto es que la

mayoría de los polisacáridos naturales están formados por centenares o miles de estas unidades monoméricas. Los polisacáridos son macromoléculas de elevado peso molecular y estructura compleja. Así como otras macromoléculas tienen tamaños y pesos moleculares definidos, en los polisacáridos éstos pueden variar en función del estado metabólico de la célula. Se puede considerar que los monosacáridos son los sillares estructurales de los polisacáridos, al igual que los aminoácidos lo son de las proteínas o los nucleótidos de los ácidos nucleicos. Las propiedades físicas y químicas de los polisacáridos son en cierto modo contrarias a las que exhiben monosacáridos y oligosacáridos: no cristalizan, no tienen sabor dulce, carecen de poder reductor, y, aunque son sustancias hidrofílicas, son poco soluble en agua debido a su elevado peso molecular. Los distintos tipos de polisacáridos difieren entre sí en el tipo de unidades monosacáridicas que los forman, en el tipo de enlace glucosídico (α o β) que las une, y en el mayor o menor grado de ramificación que presentan sus cadenas. Se distinguen dos tipos principales de polisacáridos, los homopolisacáridos, formados por un sólo tipo de monosacárido, y heteropolisacáridos, formados por dos o más tipos de monosacáridos. Los homopolisacáridos de la D-glucosa, denominados glucanos, son los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y los que tienen una mayor importancia biológica. Algunos de ellos desempeñan una función energética, como el almidón y el glucógeno, mientras que otros, como la celulosa, realizan una función de tipo estructural. Hay que destacar que aquéllos que presentan 14 enlaces glucosídicos tipo α tienen función energética, mientras que los que los presentan tipo β tienen función estructural.(7)

3.3. POLISACÁRIDOS EN GRANOS COMESTIBLES

3.3.1. ALMIDÓN

Los almidones son los más abundantes en los granos comestibles, como el arroz, trigo, maíz y similares. El almidón está constituido por dos polímeros distintos, ambos compuestos de unidades de glucosa: la amilosa (lineal, helicoidal) y la amilopectina (ramificada), ambas partes están conectadas por uniones glicosídicas. (Benavides, I. y Pozo, M., 2008). Dependiendo de la planta, el almidón contiene generalmente de 20 a 25% de amilosa y 75 a 80% de amilopectina en peso.(8)

3.3.2. AMILOSA

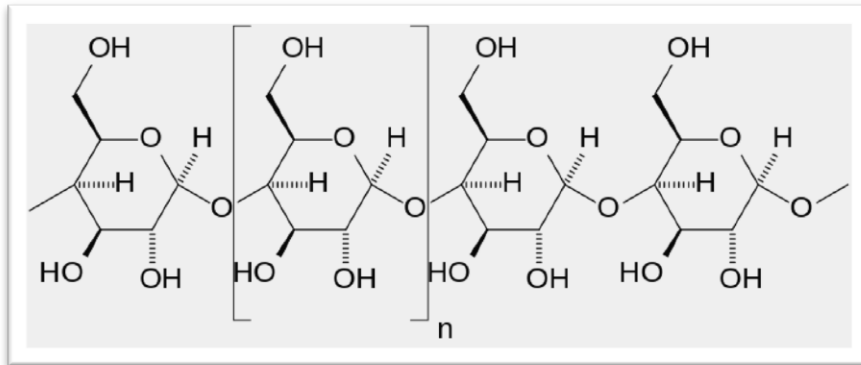
Polímero compuesto por unión de unidades de D- glucosa (OH del carbono anomérico en posición axial), enlazadas entre el carbono 1 y carbono 4 por enlaces glicosídicas D – 1,4 por lo que su estructura es lineal (esto no significa que las cadenas sean rectas, sino que se enrollan formando una hélice). Aparece en una proporción en torno al 20-25% del almidón total, por ejemplo en los granos de cereal: 26 – 28 %, raíces y tubérculos: 17 – 23 %, aunque con abundantes excepciones como son en el guisante, que presenta una proporción del 60% y en el otro lado los cereales céreos, que no presentan nada de amilosa.(11).

La amilosa está constituida por 250 a 30 unidades de D- glucosa, forma una red tridimensional cuando se asocian las moléculas al enfriarse y es la responsable de la gelificación de las pastas cocidas frías de almidón. Los almidones ricos en amilosa

mantienen su forma cuando se moldean; gelifican, mientras los almidones sin amilosa espesan pero no gelifican(11).

a)

Figura 1. Amilosa



Fuente. <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/macromoleculas/azucar.htm>

3.3.3.AMILOPECTINA

Polímero compuesto por 1000 a 3000 unidades de D- glucosa unidas mediante enlaces D- 1 – 4, pero ramificado con uniones D 1 – 6 cada 20 a 25 unidades de glucosa de la cadena.

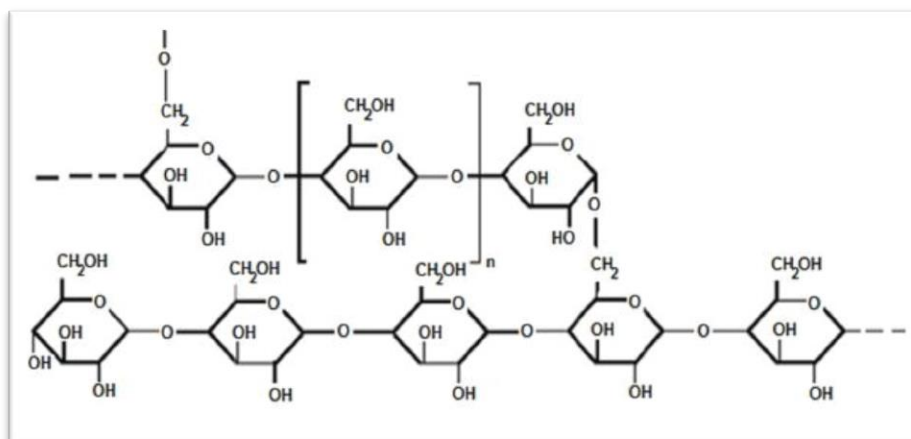
Los almidones con un porcentaje alto de amilopectina espesarán una mezcla pero no formarán un gel, porque a diferencia de la amilosa, las moléculas de amilopectina no se asocian y forman enlaces químicos.

La amilopectina es responsable de la estructura cristalina que en su conjunto presenta el almidón, debido a que en ella se forman puentes de hidrógeno entre las

ramificaciones dando lugar a una estructura muy estable que se puede considerar como cristalina. Se puede decir que la amilopectina es la parte insoluble mientras que la amilosa es la parte soluble. (11).

Figura 3. Amilopectina

a)



Fuente. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos1.html>

3.3.4. CARBOHIDRATOS EN EL TARWI (*LUPINUS MUTABILIS*).

En un reporte reciente en base a análisis bromatológico de *lupinus mutabilis* se reporta un promedio de 35.5% de proteína, 16.9% de aceites, 7.65% de fibra cruda, 4.145% de cenizas y 35.77% de carbohidratos, encontrando correlación positiva entre proteína y alcaloides, mientras que es negativa entre proteína y aceite(15), en tanto que Groos et al. (1988) reporta presencia de oligosacáridos, son moléculas de carbohidratos formados por unidades de monosacáridos, ligados por uniones estableciendo secuencias de bajo grado de polimerización (18).

Las semillas de lupinos contienen x-galactosidos, formados por residuos x-D-galactopiranosil unidos por la glucosa: entre los más presentes tenemos: la rafinosa y estaquiosa, según el grado de polimerización que posea (15).

3.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

En la naturaleza se encuentran carbohidratos de diferente número de carbonos y distintos grupos funcionales o sustituyentes. Esto da origen a distintos tipos de azúcares, tales como las aldosas, cetosas, azúcares acetilados, benzoesterificados y metilados, azúcares ácidos y anhidro azúcares. De la misma forma, las moléculas de carbohidrato pueden incluir desde un solo monosacárido hasta varios miles de estos. Debido a lo expuesto anteriormente, la diversidad de sus orígenes y la gran variabilidad en su composición química, han surgido una variedad enorme de métodos de análisis de carbohidratos; ya sean dichos métodos: físicos, químicos o bioquímicos (9).

Entre los métodos cualitativos basados en las propiedades físicas de los carbohidratos están las cromatografías en papel y capa fina, la cromatografía gas-líquido, la de intercambio iónico, la electroforesis, la refractometría, la hidrometría, la polarimetría y la espectroscopia de rayos infrarrojos. Por otro lado, entre los métodos químicos están los basados en reacciones que dan origen a compuestos coloreados, tales como las que se dan después de tratar los monosacáridos con ácido mineral fuerte y hacer reaccionar el furfural o hidroxifurfural formado, con compuestos orgánicos tales como fenoles, aminas aromáticas, urea y antrona. De la misma forma, también se hace uso de su capacidad reductora, haciéndolos reaccionar con sales de metales como el cobre, hierro, yodo, plata y cerio, son los más utilizados, particularmente destacan el método de Fehling, Somogy Nelson, Tollens y DNS.

Por último, también es posible su análisis basándose en la capacidad de formar complejos coloreados con el yodo, tal como sucede con el almidón. En relación con los

métodos bioquímicos de análisis de carbohidratos, estos pueden ser microbiológicos o enzimáticos (9).

3.4.1.MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO

Los carbohidratos serán destruidos por calor y por ácido, son particularmente sensible a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simples, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos oscuros o compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que estos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiometria y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón.(5).

3.4.2.MÉTODO ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS)

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto mono amino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina. El original procedimiento de Dahlquist ha sido modificado en un proceso automatizado para análisis de azúcares

totales producidos por la hidrólisis de polisacáridos que no contengan almidón. Para este se requiere tener estándares similares a la muestra. (9).

3.4.3.MÉTODO ÓPTICO DE POLARIMETRÍA

La polarimetría es una técnica que se basa en la medición de la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa. La actividad óptica rotatoria de una sustancia tiene su origen en la asimetría estructural de los átomos de carbono, nitrógeno, fósforo o azufre en la molécula, lo cual es conocido como quiralidad. La quiralidad generalmente es descrita como una imagen de espejo de una molécula, la cual no puede superponerse con ella misma (Figura 1). Al polarizar la luz y dejar que tan solo vibre en un plano, si hacemos pasar la luz por una disolución de una sustancia quiral, ésta girará el plano de la luz polarizada (14).

3.4.4.DETERMINACIÓN DE AZUCARES POR HPLC

La HPLC o cromatografía líquida de alta resolución es una técnica usada para separar componentes de una muestra que se fraccionan entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida compuesta por partículas muy finas contenidas en una columna, y donde se utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente a través de ella, consiguiendo así separaciones de gran resolución, permitiendo su identificación cuantificación. La cromatografía líquida de alta resolución tiene ventajas en el análisis de los azúcares a su gran solubilidad en agua y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (15)

La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil bombeada con alta presión a una columna rellena de fase estacionaria y allí el analito se retarda preparándose por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito.

Para la separación como sacarosa, glucosa y fructosa se utiliza una columna de separación rellena de una resina de intercambio catiónico con base cálcica, que exhiben propiedades como intercambio de ligando y exclusión por tamaños.(15)

La muestra diluida es previamente filtrada para la inyección en la columna, dependiendo de la geometría de los hidroxilos de los diferentes azúcares, estos interactúan con los cationes de la resina por afinidad, variando gradualmente los resultados de los tiempos de elución de las diferentes especies. El método se aplica a moléculas de bajo peso molecular relativo, que puedan entrar en los poros de la resina y establecer enlaces temporales con los iones contrarios. Las moléculas largas no entran fácilmente en los poros y ellas eluyen con mayor rapidez. La estimación exacta de la altura de pico para un azúcar se obtiene por un sistema de integración electrónico que luego lo relaciona al obtenido por un estándar (15).

3.4.5.DETERMINACIÓN DE AZUCARES POR ESPECTROSCOPIA POR INFRARROJO CERCANO

La espectroscopia IR se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición

vibracional de las moléculas. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. (15)

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexiones. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En principio, cada molécula (excepto las especies diatómicas homonucleares como O₂ y Br₂) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. (15)

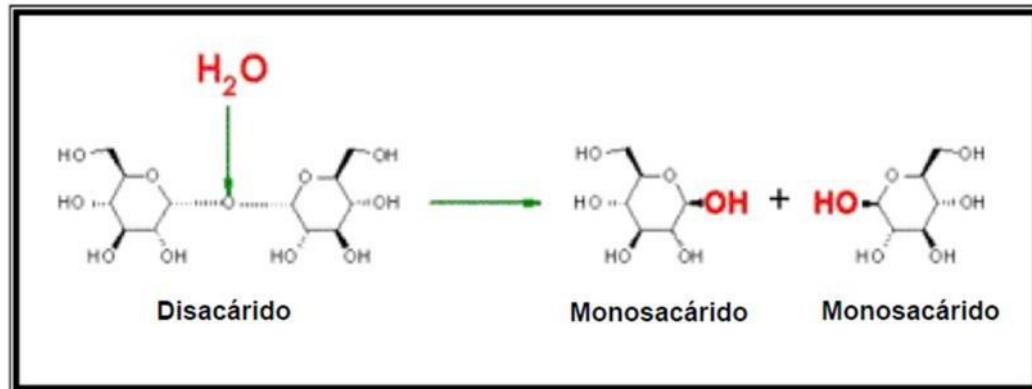
En la zona del espectro electromagnético IR con longitud de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm⁻¹) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados (15)

3.5 HIDRÓLISIS QUÍMICA DE CARBOHIDRATOS

La hidrólisis es la reacción química del agua con alguna sustancia, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. En el caso de un polisacárido, la hidrólisis del enlace glicosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio, donde el hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas del azúcar y el -OH se une al carbono libre del otro residuo del azúcar. El resultado de esta reacción, es la

liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser monosacárido si se trata de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trata de un polisacárido más complejo (20).

Figura 5. Representación de la hidrólisis de un disacárido



Fuente: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacardos.html>

La destrucción controlada de las cadenas poliméricas o hidrólisis del almidón, a través de soluciones ácidas o catalizadas por enzimas dan lugar a la formación progresiva de moléculas de maltosa, glucosa, dextrinas y otros azúcares (21).

3.6. ENZIMAS CARBOHIDRASAS

3.6.1. AMILASAS

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son enzimas responsables de la degradación del almidón, hidrolizan los enlaces glucosídicos α 1-4. Las amilasa pueden dividirse en tres grupos: α amilasa, β amilasa y glucoamilasa. (23).

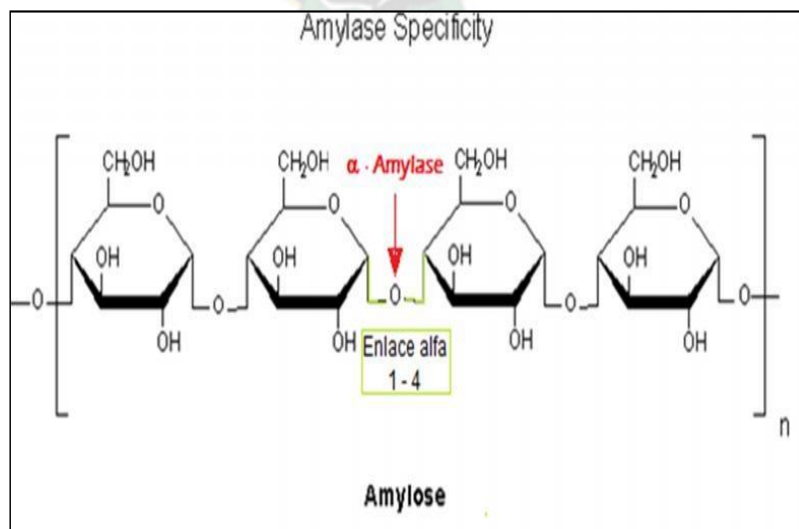
De los tres grupos nos enfocaremos en la alfa amilasa y glucoamilasa, debido a que las enzimas empleadas en el presente trabajo son de este tipo.

3.6.2.ALFA AMILASA

Puede ser de origen: Fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*), de cereales y del páncreas. Es la endoamilasa más conocida, cataliza la reacción de hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (amilopectina) del almidón, rompiendo enlaces 1,4 interiores (endoamilasa) para formar una mezcla de dextrinas lineales y ramificadas (oligosacáridos) como productos.

La enzima alfa-amilasa requiere de un activador como por ejemplo el cloruro de calcio. Es sensible a una acidez elevada y se vuelve inactiva a pH 3,3. El pH óptimo de acción está dentro del rango 5-7, la enzima es resistente al calor, pues a 70°C conserva un 70% de su actividad. Actúa sobre almidones crudos y gelatinizados. (23).

Figura 4. Enzima α - Amilasa

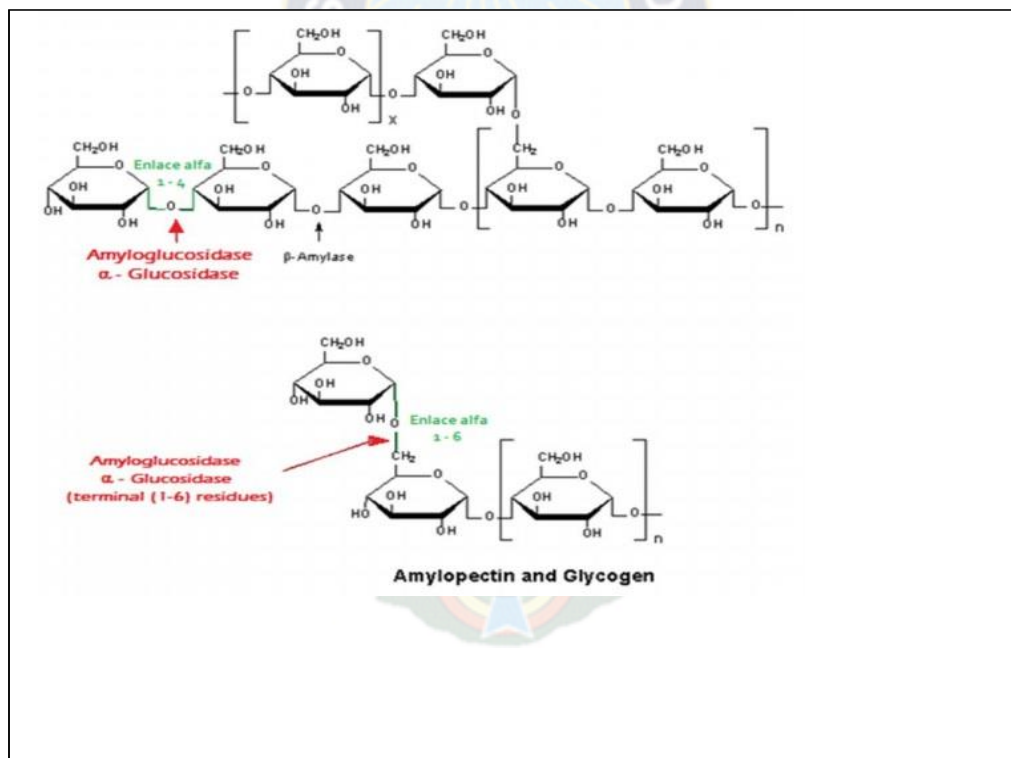


Fuente. Enzyme Nomenclature (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/2.html/)

3.6.3. GLUCOAMILASA O AMILOGLUCOSIDASA

La enzima hidroliza los enlaces alfa 1-4 y 1-6 del almidón dando como producto final glucosa, lo que la diferencia claramente de la α y el β amilasas. (Vásquez, G. y Vásquez, G., 2009). La enzima también produce pequeñas cantidades de oligosacáridos la sacarificación del almidón puede alcanzar hasta un 96% de dextrosa. Su actividad es máxima entre pH 4 – 5, temperatura alrededor de 50 – 60°C, es más eficaz cuando actúa sobre almidones previamente sometidos a licuefacción. (23).

Figura 5. Enzima Amiloglucosidasa



Fuente. Enzyme Nomenclature (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/2.html)

3.7. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática puede ser considerada como una de las técnicas para modificar el almidón por reducción de su peso molecular promedio, de esta manera se llega a obtener productos que van desde glucosa hasta dextrinas de alto peso molecular (24).

El proceso de hidrólisis enzimática comprende dos etapas: licuefacción y sacarificación, en este proceso se usan enzimas para la descomposición hidrolítica de las moléculas de almidón. Las enzimas formadas de largas cadenas de aminoácidos, son proteínas que actúan como catalizadores acelerando la reacción de hidrólisis en procesos tanto biológicos como industriales (21).



CAPÍTULO IV

JUSTIFICACION



4. JUSTIFICACION

La calidad de un producto alimentario se realiza mediante análisis, establecidos por normas internacionales, a través de estos análisis se determinara si el producto está en buenas condiciones o en condiciones deficiente, si cumple con los parámetros estándar o no. El análisis proximal, llamado también análisis físico químico de alimentos, que comprende la determinación de proteína cruda, grasa (aceite), fibra, cenizas, humedad y carbohidratos. Este análisis tiene un impacto en el producto comercial. Expresa la primera fase de calidad de un producto procesado o almacenado.

Los métodos utilizados para el análisis proximal han sido estandarizados y establecidos por la **Association of Official Analytical Chemists** AOAC, cada país de acuerdo a las posibilidades de infraestructura, equipamiento y capacidades profesionales aplica las metodologías a través de normas nacionales.

Existen diferentes formas de expresar la composición de carbohidratos en alimentos que causan diferentes interpretaciones, así tenemos la sigla CHOCDP que implica: carbohidrato total (por diferencia); calculado como 100 g menos la suma de gramos de agua, proteína, grasa y cenizas; CHOAVLM que implica: carbohidrato, disponible, expresado como el equivalente en monosacárido; incluye a los azúcares libres más dextrinas, almidón y/o glucógeno; CHOAVLDF, que implica: Carbohidrato, disponible (por diferencia); calculado como 100g menos la suma de gramos de agua, proteína, grasa, fibra y cenizas; CHOAVL Carbohidrato, disponible (por suma de

valores analíticos); incluye a los azúcares libres más dextrinas, almidón y glucógeno. Estas formas de reporte son las más utilizadas, se debe denotar que para CHOAVLM y CHOAVL son reportados con analizadores altamente analíticos que indican valores específicos de monosacáridos, disacáridos, dextrinas. Existen también reportes que expresan CHO que implica: carbohidrato por método desconocido.

En nuestro país generalmente se utiliza el reporte de carbohidratos por diferencia de 100g menos la suma de proteínas, grasas, agua, cenizas y fibra cruda (CHOAVLDF).

Dada la importancia biológica funcional de los carbohidratos es importante el realizar un análisis que exprese con mayor precisión el contenido de carbohidratos y el tipo de los mismos. Existe un interés pronunciado en la solicitud de análisis de carbohidratos independiente del realizado por diferencia por parte de las empresas de alimentos, como IRUPANA S.A., por otro lado laboratorios especializados en análisis químicos de alimentos o que están en trayectoria de incorporar los mismos al tener la solicitud de que se realice la determinación de carbohidratos, tienen interés en incorporar métodos confiables y de alta precisión. Uno de estos laboratorios es el Laboratorio de Calidad Ambiental LCA, que tiene interés en mejorar sus servicios con una oferta mayor.

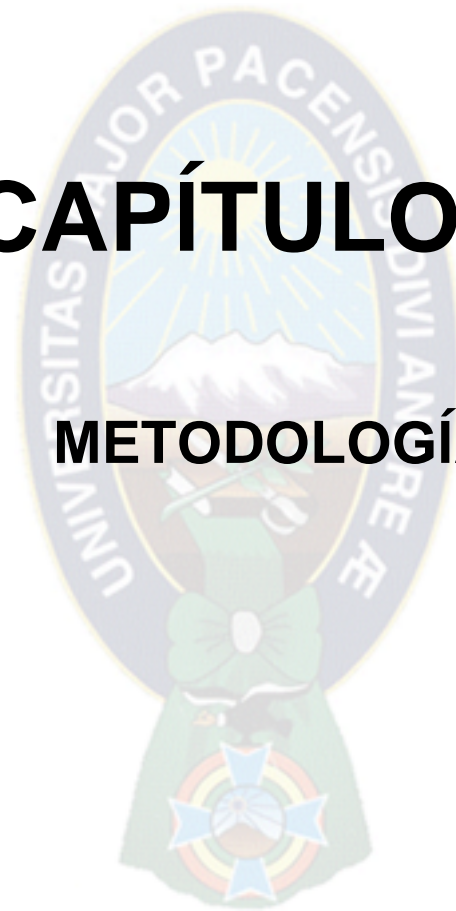
Los alimentos presentan carbohidratos de diferente grado de digestibilidad por el ser humano, un alimento de alta digestibilidad aporta rápidamente suministro de monosacáridos al torrente sanguíneo y un carbohidrato de baja digestibilidad o lenta absorción aporta los monosacáridos lentamente, esta diferencia hace que los usuarios prefieran carbohidratos de baja digestibilidad por ser más saludables por lo que las empresas alimenticias requieren un estudio más específico del tipo de carbohidrato que

contienen los alimentos. Actualmente en países europeos como Australia, está permitido en las etiquetas indicar el IG, que corresponde al Índice glucémico. Correspondiente al efecto de carbohidratos de cada alimento en la absorción de los mismos en el ser humano. Por lo que es importante realizar una propuesta de análisis de carbohidratos más adecuado que refleje más el tipo de estos, particularmente en *Lupinus mutabilis* (Tarwi) que cuenta con escasos reportes de carbohidratos.



CAPÍTULO VI

METODOLOGÍA



5. METODOLOGÍA

Para realizar la determinación de la concentración de carbohidratos totales primeramente se realiza la hidrólisis enzimática y/o hidrólisis ácida, dependiendo del tipo de carbohidrato contenido en el alimento.

Para el tarwi, se planificó utilizar dos métodos fotocolorímetros para la cuantificación de carbohidratos: método fenol sulfúrico que se aplica para todo tipo de carbohidratos y el método DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico) post hidrólisis ácida, mediante los cuales se determinó la concentración de azúcares libres y totales.

Según método estándar los carbohidratos totales se cuantifican por diferencia, una vez valorado el análisis proximal: grasa, humedad, ceniza, fibra y proteínas, en base a métodos AOAC.

Para cada método se debe tomar en cuenta la linealidad y sensibilidad para preparar las muestras.

5.1. MATERIA PRIMA

Harina de tarwi desamargada fue otorgada por la empresa IRUPANA en condiciones óptimas con una granulometría de malla 60.

5.2. ANÁLISIS PROXIMAL

Estos análisis proximal se realizaron por métodos AOAC aplicados por la norma boliviana (NB), según tabla 2, todos los parámetros se realizaron en el laboratorio de

Bioorganica II, a excepción de la determinación de proteína cruda (nitrógeno total) que se realizará en el Laboratorio Calidad Ambiental (LCA).

Tabla 1. Normas empleadas para el análisis proximal

Determinación	Observación	Método
Humedad	Se determina la humedad existente en la harina de tarwi.	NB 074: Determinación de contenido de humedad.
Grasa	Se determina el porcentaje de materia grasa que contiene la harina de tarwi, utilizando éter de petróleo como solvente.	NB 312027 Cereales – Quinoa en grano – Determinación del contenido de materia grasa.
Proteínas	Consiste en la conversión de nitrógeno presente por digestión con ácido sulfúrico, para luego someter a destilación y titulación con hidróxido de sodio.	NB 076 Cereales - Determinación de proteínas totales – método Kjeldahal.
Carbohidratos	Se determina la cantidad de carbohidratos presentes.	NB 312031 Cereales – Quinoa en grano – determinación de hidratos de carbono.
Cenizas	Se determina el contenido de minerales en la harina de tarwi.	NB 075: Determinación de cenizas.
Fibra	Se determina el contenido de fibra en la harina de tarwi	NB 312028 Cereales – Quinoa en grano – Determinación de fibra cruda

5.3. MÉTODO FENOL SULFÚRICO

Para la determinación de azúcares reductores se aplicó el método de dubois (fenol sulfurico) usando el espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMBDA-25. El método se

basa en la deshidratación a furfural y en las hexosas a 5-hidroxifurfural. La presencia del fenol y su interacción con el 5- hidroxifurfural facilita la formación de complejos que permiten la coloración de la solución y en consecuencia facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de la espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm (14), la curva patrón se realizó 10 veces con la finalidad de ver la confiabilidad del método, se utilizaron patrones de glucosa de 20 a 100 mg/L

5.3.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINAR AZUCARES LIBRES EN HARINA DE TARWI (MÉTODO DUBOIS)

Se pesó 1 g de harina de tarwi desengrasada con 10mL de agua, se agito vigorosamente y se lo llevo a la centrifugadora y se realizó una dilución 1:10 proceder a la lectura en el espectrofotómetro.

5.3.2. TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA DETERMINAR AZUCARES TOTALES EN HARINA DE TARWI (MÉTODO DUBOIS)

Se pesó 1 g de harina de tarwi desengrasado, se llevó a ebullición (carbohidratos homogéneos y solubilizados), se aforo a 100 mL. Se realizó una dilución 1:10, para proceder con el procedimiento del método Dubois.

5.4. MÉTODO DNS PARA LA DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES

Para la determinación de azucares reductores se aplicó el método de colorimetría DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) usando el espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMBDA 25.

El método se basa en la oxidación del grupo aldehído o cetona presente en el azúcar y la respectiva reducción del DNS a ácido 3-amino- 5-nitrosalisílico. Esta reacción produce un complejo coloreado que presenta la mayor actividad óptica en una longitud de onda de 540 nm, lo cual permite realizar una gráfica a diferentes concentraciones de una solución patrón de glucosa, para luego identificar la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra.(14). La curva patrón se realizó 10 veces con la finalidad de ver la confiabilidad del método, se utilizaron patrones de glucosa de 200 a 1000 mg/L.

5.5. HIDROLISIS ÁCIDA DE CARBOHIDRATOS EN HARINA DE TARWI

La hidrólisis ácida de los carbohidratos se fundamenta en la destrucción de los enlaces glucosídicos de los carbohidratos sólidos por acción del ácido (ácido clorhídrico) que permite la liberación de azúcares simples en forma de glucosa, la cual puede determinarse por métodos espectroscópicos.(14)

5.5.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA HIDROLISIS ACIDA

Se pesa 5g de harina de tarwi desengrasada, se coloca la muestra en el balón de tres bocas a con 220 mL de HCl 4N, a la temperatura de 80°C por dos horas y media. Se Neutraliza la solución con NaOH hasta un pH aproximadamente 7. Se afora a 500mL con agua destilada para proceder por el método DNS.

5.6. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS DIGERIBLES POR α AMILASA Y AMYLOGLUCOSIDASA

5.6.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HARINA DE TARWI

La figura 6 muestra el flujograma del proceso de hidrólisis de harina de tarwi, este proceso consta de dos etapas: la primera etapa se empleó la enzima α -amilasa y en la segunda etapa se utilizó la enzima amyloglucosidasa. Ambas enzimas se emplearon manteniendo sus condiciones óptimas de sus fichas técnicas (Tabla 2). Al final de la reacción enzimática se procedió por el método Dubois.

Tabla 2. Condiciones óptimas de la α -amilasa Thermamyl Sc.Y amyloglucosidasa

Condiciones	α -amilasa	Amyloglucosidase de <i>aspergillus niger</i>
Temperatura	84°C	55
pH	5	4.6-4.8
Tiempo de reacción	60 min	60 min

Fuente: [.http://www.ncbe.reading.ac.uk/materials/enzymes/termamyl.html](http://www.ncbe.reading.ac.uk/materials/enzymes/termamyl.html)

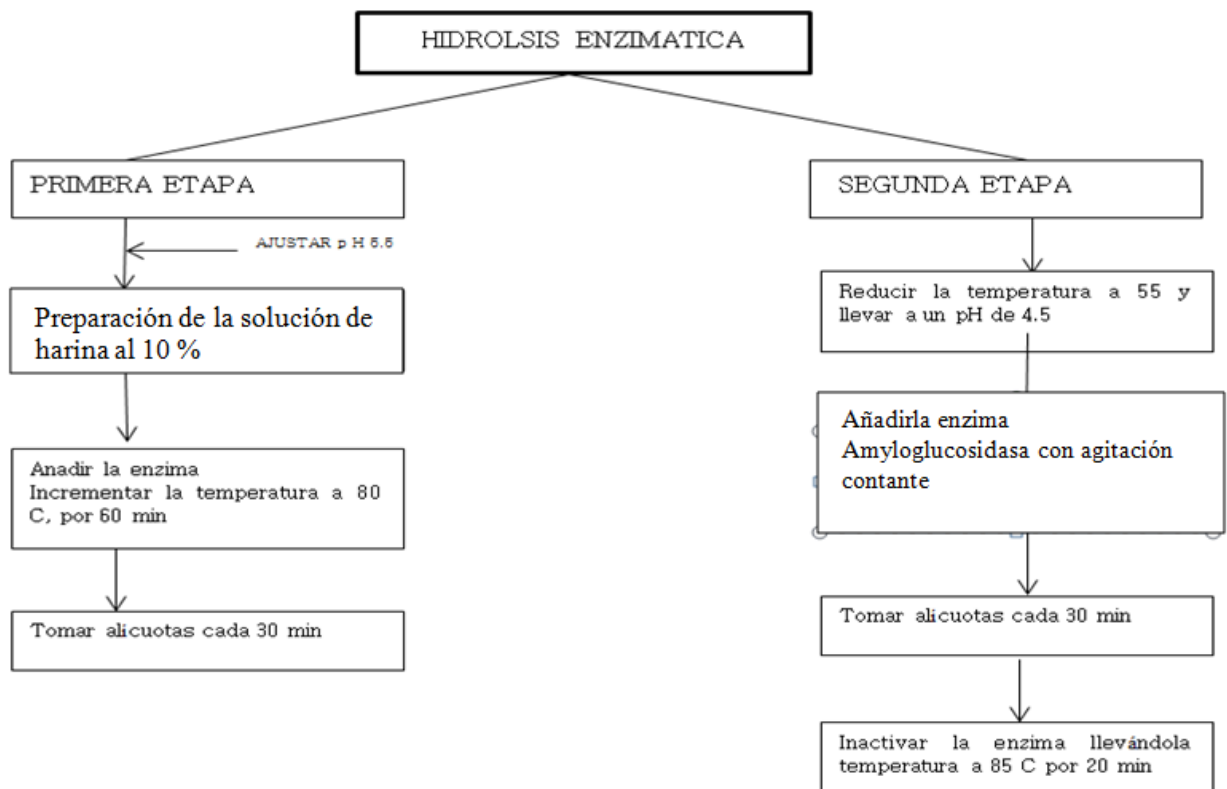


Figura 6. Flujo grama de procedimiento de la Hidrólisis Enzimática

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. RESULTADOS OBTENIDOS TRAS EL ANÁLISIS PROXIMAL DE HARINA DE TARWI

Para la determinación de carbohidratos por el método de análisis proximal se realiza todos los análisis humedad, ceniza, materia grasa, proteínas y fibra cruda, la suma de todos estos valores y posterior diferencia entre el 100% nos da el contenido de carbohidratos en la muestra.

Tabla 3. Resultados de análisis proximal

Parámetro	Valor calculado en %
Humedad	7.52± 0.94
Cenizas	2.00±0.02
Materia grasa	19.52±0.89
Proteínas	48
Fibra	4.6±0.3
Carbohidratos	18.36

6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZUCARES LIBRES EN LA HARINA DE TARWI (MÉTODO DUBOIS)

6.2.1 CURVA PATRÓN DE GLUCOSA (DUBOIS)

La curva de calibración obtenida por el método fenol sulfúrico se realizaron con las siguientes concentraciones 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, que presenta una tendencia

lineal, con un coeficiente de correlación igual a 0.992 (anexo 1), que varía en forma lineal con respecto a la concentración. (figura.7).

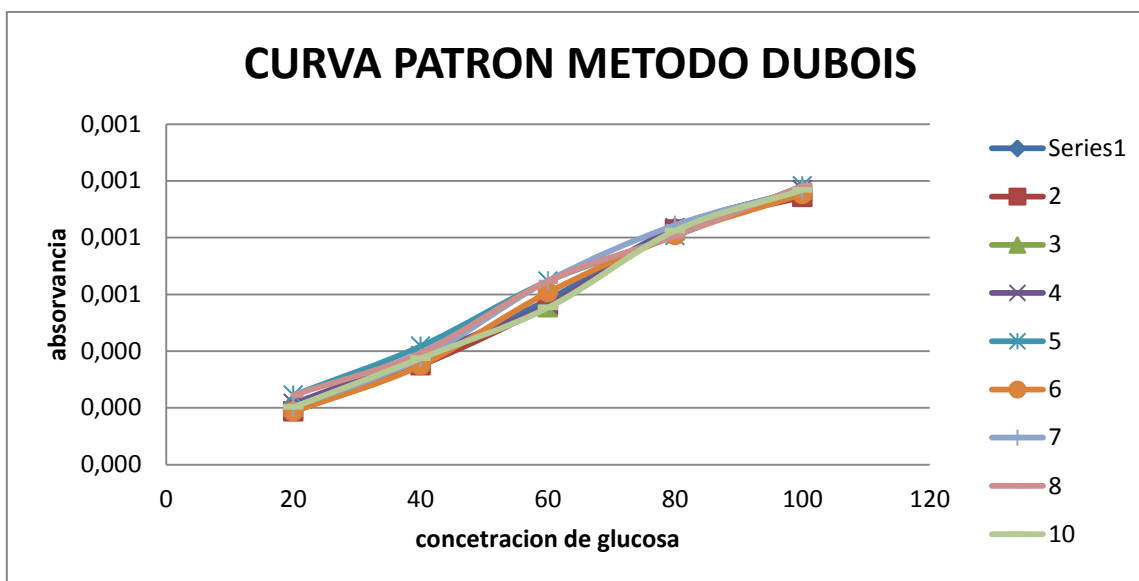


Figura 7. Linealidad de la curva patrón de glucosa (20-100ppm) por el método Dubois

Para aplicar un método es importante verificar su confiabilidad por lo que se debe realizar varias veces en las mismas condiciones cuando el R es más cercano a 1 e método refiere mayor confiabilidad.

6.2.2 DETERMINACIÓN DE AZUCARES LIBRES (MÉTODO DUBOIS)

Tabla 4. Concentración de azúcares libres equivalentes a dextrosa en harina de tarwi

Muestra	Azúcares libres %
Harina de tarwi (HT)	0,27±0.06

La cuantificación de azúcares libres tiene un valor insignificante dado que el proceso de desamargado ocasiona un bajo contenido, este resultado coincide con datos bibliográficos que no reportan azúcares libres en *Lupinus mutabilis* (gross).

6.3. DETERMINACIÓN DE LA AZUCARES TOTALES (METODO DUBOIS)

Tabla.5. % de Carbohidratos ED en harina de tarwi (HT) por el metodo Dubois

muestra	% de carbohidratos ED en HT
Harina de Tarwi	3.21±0.80

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que estos bajo hidrolisis acida producen monosacáridos la forma en que procede la reacción no es estequiometria y depende de la estructura del azúcar. En un estudio reciente con carbohidratos tipo monosacáridos y polisacáridos puros se ha encontrado una alta reproducibilidad (23). En las pruebas realizadas en nuestro estudio, considerando que se trabajó con harina desengrasada que contiene los carbohidratos, que se encuentra en medio de complejo con todos los componentes del tarwi, el resultado obtenido por el método Dubois es deficiente, mostrando una baja concentración de carbohidrato que no correlaciona a lo esperado, teniendo ya los datos del análisis proximal.

Por lo que se asume que la composición del Tarwi contiene algún componente que interfiere con este método.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZUCARES TOTALES POST HIDROLISIS ACIDA (MÉTODO DNS)

6.4.1.CURVA PATRÓN DE GLUCOSA (MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICILICO (DNS))

El coeficiente de correlación obtenido a través del presente método para la curva patrón de glucosa con concentraciones de 200, 400, 600,800 y 1000 ppm, fue de 0.999(anexo.2) valor elevado que indica que los datos se ajustan a una línea recta (figura 8).

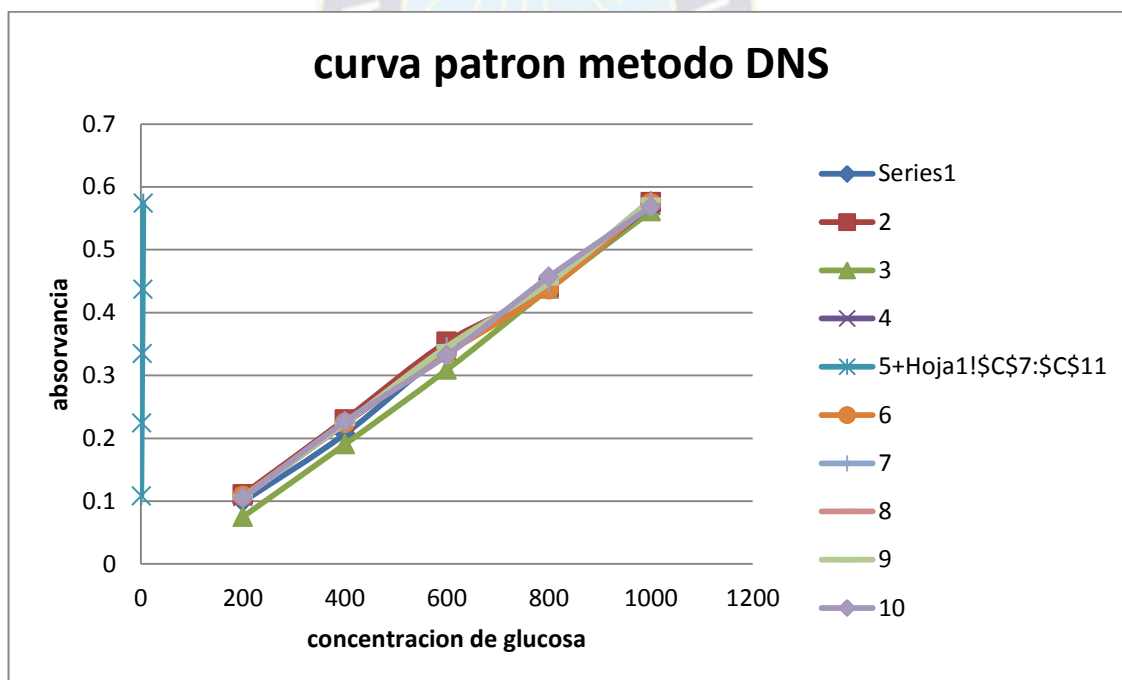


Figura 8. Lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm correspondientes a soluciones patrón de glucosa p.a. (método DNS).

Para un análisis confiable de la aplicación de 2 métodos en la determinación de carbohidratos, el método DNS post hidrolisis ácida y Fenol sulfúrico se realizaron 10 pruebas de curvas patrón en ambos caso. Los cuales mostraron una tendencia lineal, en el caso del fenol sulfúrico el coeficiente de correlación tiene un valor de 0.992 ± 0.003 y en el caso de DNS 0.9996 . Estos resultados se obtuvieron en 10 tratamientos procesados de la misma forma que indican una mayor confiabilidad del método DNS.

6.4.2 PORCENTAJE DE AZUCARES REDUCTORES POST HIDROLISIS ACIDA EN HARINA DE TARWI HT (MÉTODO DNS)

Tabla.6 Azucares totales expresados en ED en % en harina de tarwi (método DNS)

Muestra	Concentración (ppm)	% de carbohidratos
HT	889.17	16.02 ± 0.94

Con respecto a los resultados obtenidos en la hidrolisis acida se obtuvo un 16.02 % de carbohidratos totales, este resultado incluye carbohidratos liberados por hidrolisis tanto de oligosacáridos como de otro tipo de compuestos glucosilados que contenga el Tarwi. Considerando que por el análisis proximal se obtuvo 18.36% de carbohidratos, el resultado obtenido de 16.02 es coherente y de mayor exactitud.

6.5. PORCENTAJE DE AZUCARES REDUCTORES EQUIVALENTES A DEXTROSA (ED) POST HIDROLISIS ENZIMÁTICA (MÉTODO DUBOIS)

Tabla.7. % de Carbohidratos ED post Hidrolisis enzimática con alfa-amilasa y amyloglucosidasa en harina de tarwi (HT) por el método Dubois

Muestra	/% de ED en HT	% en CHT
HT hidrolizada con alfa-amilasa	0.37	2.3±0.6
HT Hidrolizada con alfa-amilasa y amyloglucosidasa	0.45	2.8±0.9

En esta primera etapa del proceso de hidrólisis la enzima alfa -amilasa se produjo un 4.1 % de producto expresado en equivalentes de dextrosa, esto indica que existe presencia de enlaces a (1-4) que evidencia presencia de oligomaltosa.

El proceso de hidrolisis enzimática de los carbohidratos contenidos en harina de tarwi concluye cerca de los 60 minutos, los oligosacáridos contenidos en harina de tarwi sometidos de forma secuenciada Termamyl Sc/amyloglucosidasa dan una producción de azúcares reductores baja por lo que resulta despreciable el someter el sustrato a estas enzimas, este resultado respalda un alto contenido de oligosacáridos tipo estaquiosa, rafinosa y verbascosa (25), oligosacáridos no digeribles, sin embargo evidencia la presencia de oligosacáridos que contienen enlaces α (1-4) entre glucosas que da lugar al resultado encontrado.

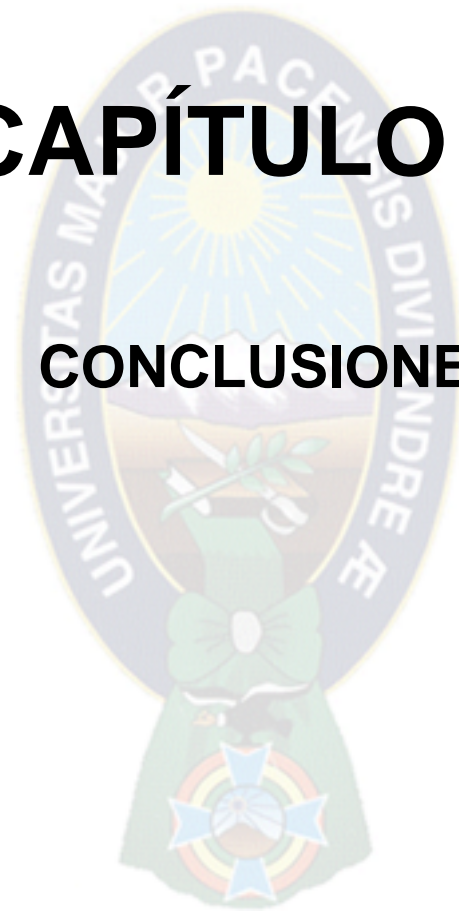
Los alimentos contienen carbohidratos de rápida digestibilidad, de lenta digestibilidad y resistentes a la digestibilidad (26), según nuestros resultados el Tarwi contiene

carbohidratos de baja digestibilidad a resistentes por lo que es un alimento adecuado para personas que tienen diabetes y personas que quieren cuidar su salud.



CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

Entre los dos métodos aplicados el de DNS mostro mayor confiabilidad por el coeficiente de correlación, ambos muestran su factibilidad para ser utilizados en analítica de carbohidratos puros.

Se logró obtener el contenido de carbohidratos por el método de análisis proximal dando como resultado un 18.36 % de carbohidratos.

El método de fenol sulfúrico para determinar carbohidratos totales en harina de Tarwi es deficiente, en tanto que el método DNS post hidrolisis acida a dado un resultado coherente.

Se ha evidenciado un contenido de azúcares libres no considerable y un contenido de carbohidratos no digeribles in vitro en *lupinus mutabilis*.

El Tarwi es un alimento potencial para personas que no quieren consumir carbohidratos por su salud, especialmente personas con riesgo de diabetes y obesidad.



CAPÍTULO IX

REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

1. Mathews K.C., van Holde E.K., Aher G.K. Bioquímica. 3th edición. Pearson Addison Wesley, España 2004.
2. Voet D., Voet G.J. Biochemistry. 2th Edición. John Wilwy & Sons, INC. E.U. 1995.
3. Fermena, O. (2000). Química de los alimentos. 2da ed. Editorial ACRIBTA, Zaragoza, España 2000. pp. 228-240.
4. García, M. Quintero, Rodolfo, R. López, Agustín M. Biotecnología Alimentaria. Primera edición. Editorial Limusa, México 1993, pp. 525- 534
5. Dubois, M.; Gilles, k.a.; Hamilton, J.k.; Robers, p.a.; smith, f. (1956). colorimetric method forthe determination of sugars and related substances. anal.biochem. 28: 350-356.
6. Socaciu,C."Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis". Spectroscopy.2011, 26, 93–104. DOI10.3233/SPE-2011-0529.
7. sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/jaislocr/BIOQUIMICA.../CARBOHIDRATOS.pdf
8. Los Hidratos de carbono. Revista Vive sano. Suplemento II. Fecha de acceso 09 de marzo de 2014. URL disponible en: http://www.institutotomas Pascual.es/vivesano/escuela/vivesano_15abril10.pdf
9. James C.s., Analytical Chemistry of foods. Second Edition, ASPEN Publisher.New York 1999.

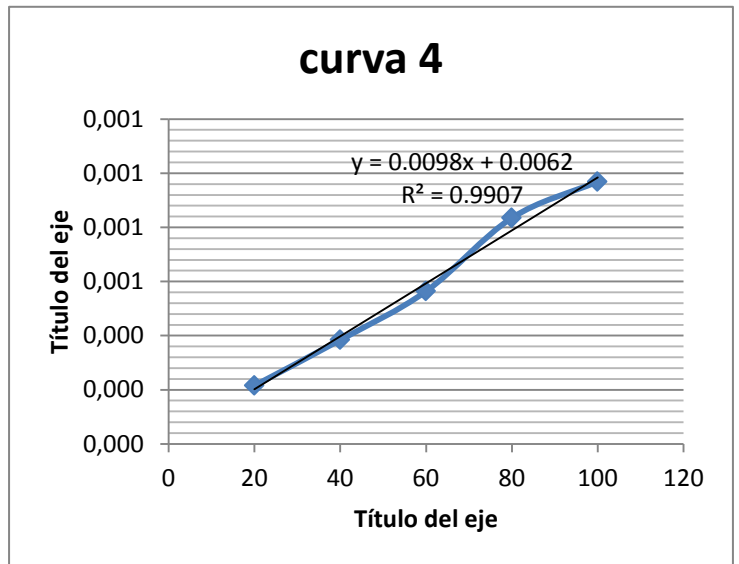
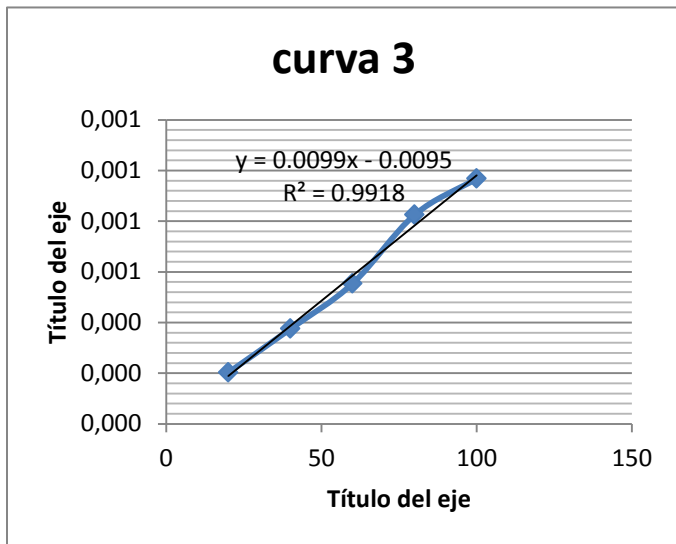
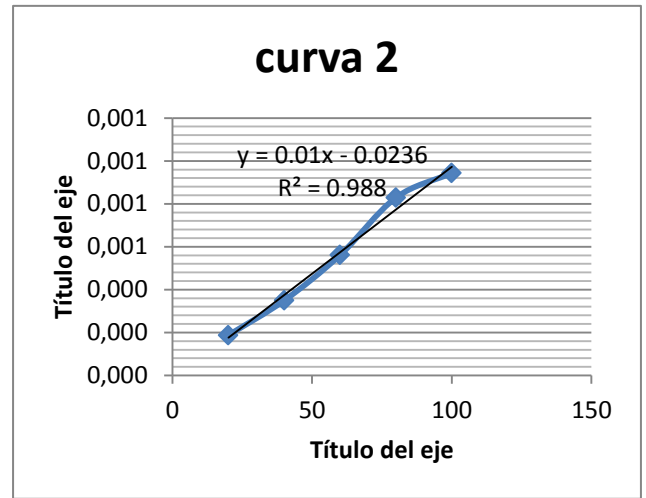
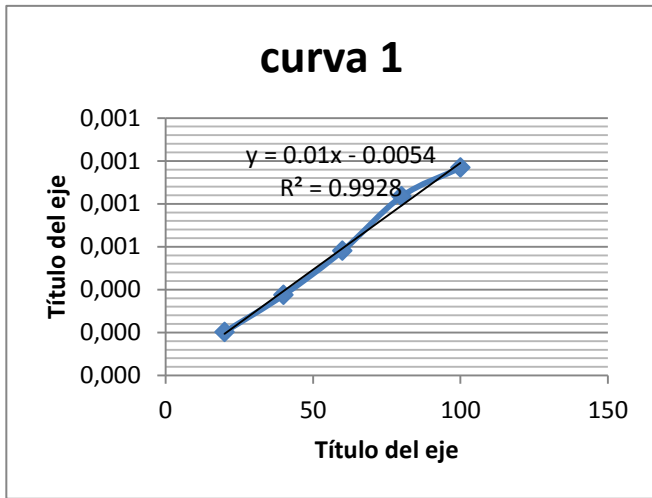
10. Monsigny, M.;Pett, C.; Roche, A C. "Colorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod". Anal Biochem. 1988,175, 525–530. DOI10.1016/0003-2697(88)90578-7.
11. Fernández Sevilla, J. M. (2005). Hidratos de carbono y su aprovechamiento, pp. 17 – 19.
12. Nielsens. Suzanne(Ed);Food Analysis laboratory Manual; Kluwer Academic/ Pleaanun Publishers,New York,2003
13. Southgate,D.a.t.; Determination of Food Carbohydrates Second Edition; Elsevier Applied Science, London and New York 1991.
14. Wade JR, L.G., Química Orgánica, Segunda edición. Editorial Pearson. 1993, pp. 256-257.
15. Sven-E. Jacobsen& Angel Mujica- El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Real de Agricultura y Veterinaria, Taastrup, Dinamarca,email: seja@kvl.dk.Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.email: amhmujica@yahoo.com
16. Chirino, Wilmary (2005). Determinación de azúcares presentes en el mosto del Agave cocuimediante cromato-grafía de alta resolución. Trabajo especial de grado para optar al Título de Ingeniero Químico. Universidad NacionalExperimental Francisco de Miranda.
17. Villacrés, E. Chaves, N.Peñalosa, C. 1998. Caracterización Física, Nutricional y funcional de las leguminosas. Mundi –prensa. (2a, Ed.) Madrid – España. Pág. 498

18. Gross, R. 1982. El cultivo y la utilización del tarwi. Estudio Protección Vegetal, FAO.Roma -Italia-36, Pág. 36-48.
19. DAVILA, J., Carbohidratos de la semilla de lupines ., Evento de informacion y difucion de resultados de investigacion sobre chocho y capacitacion en nuevas tecnicas de laboratorio., Ed. CONACYT/EPN/IIT., Ambato 1987., pp. 1-5.
20. Carmona Camargo, J. Paternina Urzola, S. (2007). Evaluación de la modificación vía enzimática del almidón Ñame (Dioscorea trifida) utilizando alfa-amilasa para sus posibles aplicaciones industriales. Tesis, Universidad de Sucre, p. 39
21. Vázquez Contreras, E. (2003). Bioquímica y Biología Molecular [en línea]
<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html>
22. Morales Suárez, Y. Sánchez Pacheco, I. (2004). Diseño conceptual y comparación técnica de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática para la producción de glucosa a partir de almidón de yuca. Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, pp. 3-13.
23. Carrera Eliécer, J. Producción y aplicación de enzimas industriales. Vol. 1, No 1, 2003. Universidad del Cauca, Popayán, pp. 10-11.
24. Peña Piza, A. (2009). Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (Aspergillus Níger). Tesis, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, pp. 30-32, 38-39.
25. Comparason of methods using sulfuric acid for determination of total sugars
Msc. Xiomara Lopez-Legarda, Andony Taramuel-Gallardo, PhD.
26. Carolina Arboleda Echavarría, PhD. Freimar Segura Sanchez, Esp. Luis Fernando Restrepo-Betancur
xiamara.lopezl@udea.edu.com

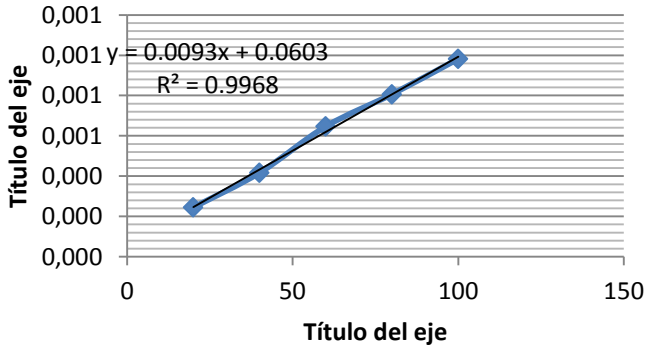
27. Gross, R., Von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L., Wink, M. 1988, Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content, *J. of food composition and analysis*, 1, 353-361.
28. Champ, M., et al, In vivo techniques to quantify resistant starch, in *Complex carbohydrates in foods* ed. Cho, S., Prosky, L., Dreher, Eds, Marcel Dekker, NYC, 1999; 157.



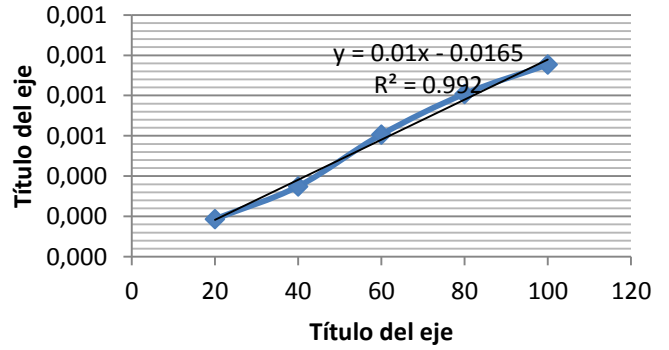
ANEXOS 1. CURVA PATRON DEL METODO FENOL SULFURICO



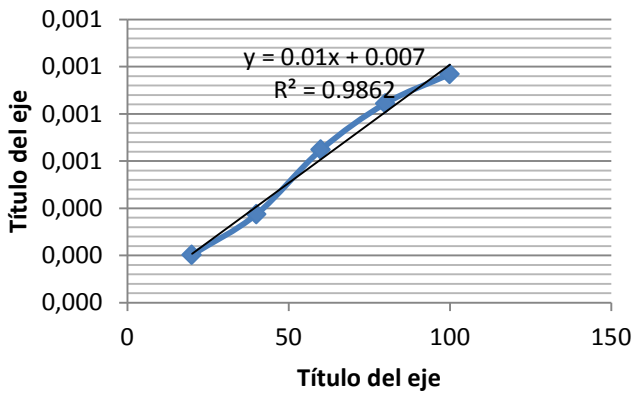
curva 5



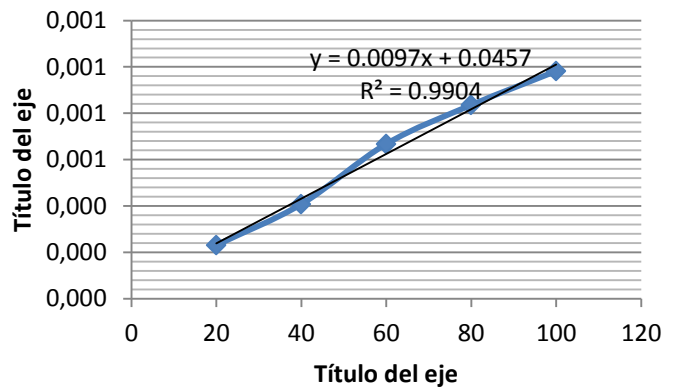
curva 6



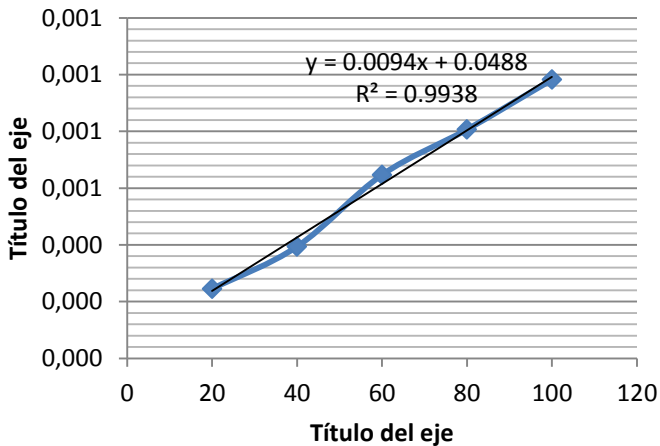
curva 7



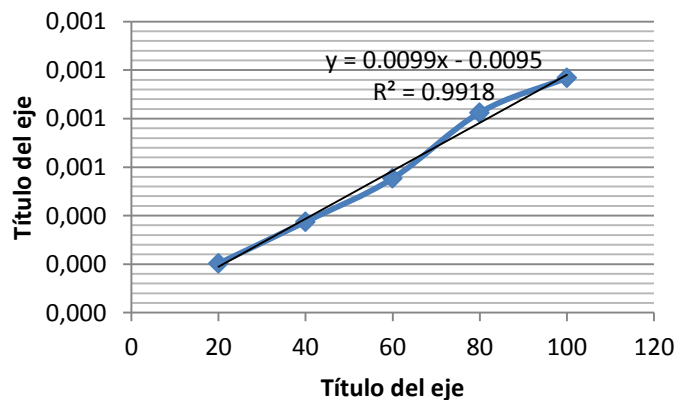
curva 8



curva 9



curva 10



ANEXOS 2 . CURVA PATRON DEL METODO DNS

