



Evaluación del efecto de la fermentación sólida, con *Rhizopus oligosporus* en tres genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) para mejorar su potencial nutricional

García Panjón, Heidy Nicole

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

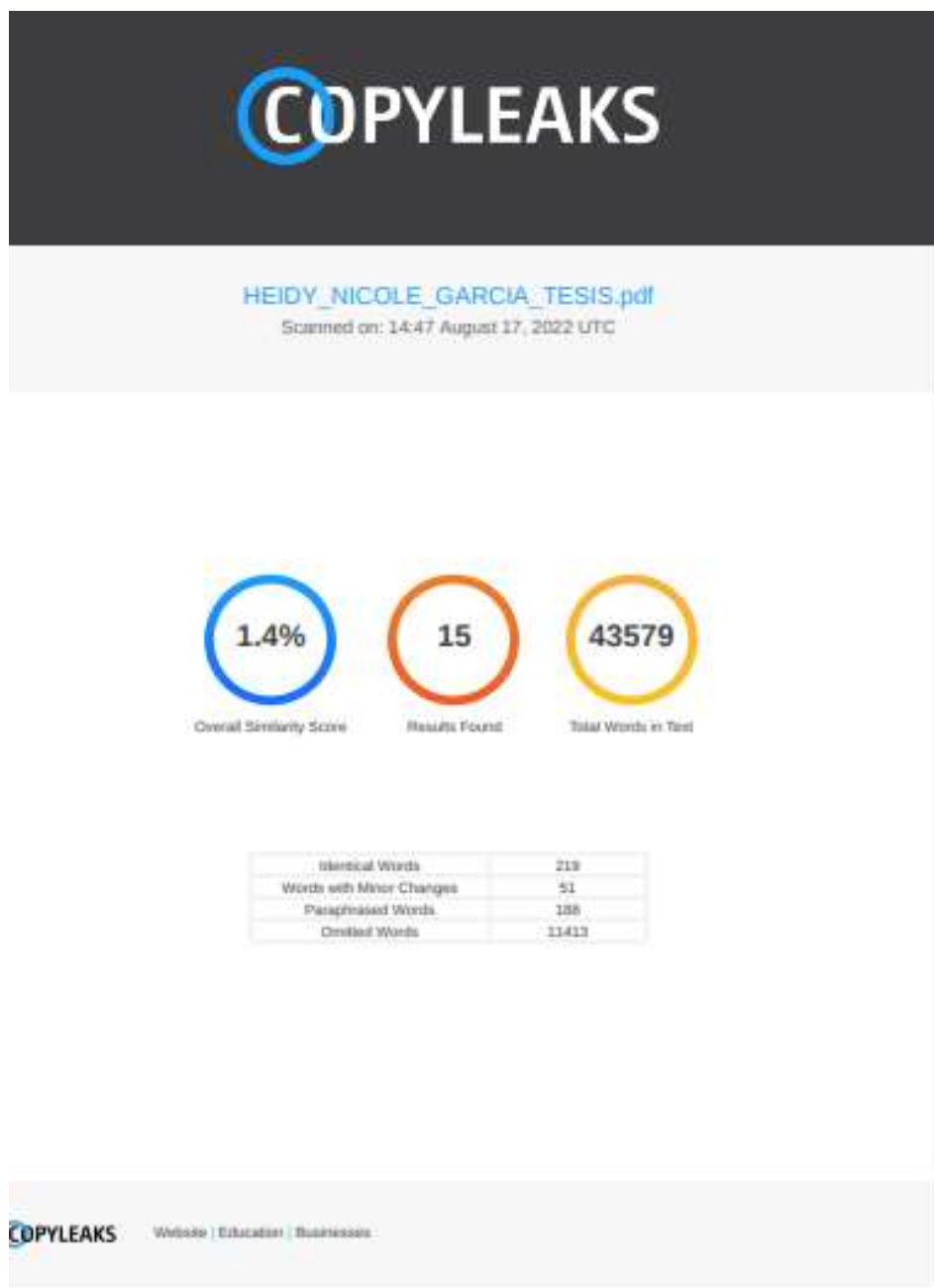
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

Naranjo Gaybor, Sandra Judith, PhD.

22 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Firma:

.....

Naranjo Gaybor, Sandra Judith PhD

C. C 1709384422

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “Evaluación del efecto de la fermentación sólida, con *Rhizopus oligosporus* en tres genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) para mejorar su potencial nutricional” fue realizado por la señorita **García Panjón, Heidi Nicole**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 22 de agosto de 2022

Firma:

.....

Naranjo Gaybor, Sandra Judith PhD

C. C 1709384422



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **García Panjón, Heidi Nicole**, con cédula de ciudadanía n° 1718676461, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "Evaluación del efecto de la fermentación sólida, con *Rhizopus oligosporus* en tres genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) para mejorar su potencial nutricional" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 22 de agosto del 2022

Firma

García Panjón, Heidi Nicole

C.C.: 1718676461



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **García Panjón, Heidy Nicole**, con cédula de ciudadanía n° 1718676461, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Evaluación del efecto de la fermentación sólida, con *Rhizopus oligosporus* en tres genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) para mejorar su potencial nutricional" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 22 de agosto del 2022

Firma

García Panjón, Heidy Nicole

C.C.: 1718676461

Dedicatoria

A mi madre, la persona más importante de mi vida, una mujer fuerte y trabajadora, y a su amor incondicional, el cual fue el pilar que me mantuvo en todos estos años, gracias por el cariño, esfuerzo y sacrificio.

A Gonzalo, un gran hombre y la primera persona que confió en mí, quien me educó con sus tan acertados consejos, muchas gracias por el amor paternal.

A Clara quien a pesar de lo mucho que crezca siempre será mi pequeña hermana y Michelle una guerrera e increíble madre, gracias hermanas por alegrar mis días.

Con amor a mi padre Nelio Garcia, y a mis dos ángeles Ismael y Margarita.

Agradecimientos

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por mi formación, al Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIAP, por permitirme realizar este trabajo de titulación.

A **Elena Villacrés Ph.D** y **MSc. Mabel Torres**, grandes profesionales, y excelentes personas, quienes participaron activamente durante la ejecución de este trabajo, siendo cotutoras del mismo.

A la Dra. Sandra Naranjo, una de las mejores docentes y tutoras, gracias por la paciencia, preocupación y empeño y al Ing. Milton Uday por su excelente labor como director de carrera.

A la Lda. Nataly Ortega, una gran empresaria y excelente ser humano, a quien estimo, admiro y quien me ha formado profesional y personalmente, así como a su cadena de laboratorios.

De manera especial, a Mvz. Euclides De la Torre, por su gran predisposición y apertura. A la Mvz. Viviana Santafé y Lic. Margoth Barrionuevo muchas gracias doctoras por su enseñanza y sobre todo su carisma, al Ing. Alexander Maldonado, un excelente biotecnólogo, y al Dr. Jorge Espinoza, una persona admirable quien me enseñó tanto en tan poco tiempo.

A Sebastián Recalde y Javier Montalvo, por las enseñanzas, historias, consejos, y una de las mejores experiencias en su empresa.

A Dori Lahuatte y Ana dos genetistas brillantes, gracias por su predisposición y ayuda.

A mis amigos que hicieron de esta etapa una etapa más amena, Katherine Giler gracias amiga, me enseñaste a ser mejor persona, Ítalo, Boris y a los que me faltan por nombrar saben que los llevo en mi corazón.

Al futuro Ingeniero, Andrés Agila, por acompañarme desde el comienzo en este proceso, por hacer de los días malos, buenos y de los buenos, mejores, muchas gracias.

A Dios, por la fuerza y amor.

Índice de contenidos

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Lista de Figuras	13
Lista de Tablas.....	15
Lista de abreviaturas	17
Resumen.....	18
Abstract.....	19
Capítulo I: Introducción.....	20
Introducción.....	20
Justificación del Problema	22
Objetivos de la investigación	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos.....	23
Capitulo II: Revisión de la literatura.....	25
Antecedentes	25
Fundamentos Teóricos	26
Quinoa	26

Genotipo Chimborazo	27
Genotipo INIAP-Tunkahuan	27
Línea LPQE-4	28
Composición Nutricional.....	31
Humedad.....	31
Cenizas	32
Fibra	34
Proteína.....	37
Saponinas	38
Inhibidores de Tripsina	40
Actividad de la Ureasa.....	41
Taninos	42
Ácido Fítico	45
Compuestos Funcionales.....	47
Fenoles	47
Flavonoides.....	48
Actividad Antioxidante	50
Carotenoides.....	51
Capitulo III: Materiales y métodos	54
Materiales.....	54
Muestras	54

	10
Diseño Experimental	54
Diseño experimental y análisis de datos.....	54
Análisis estadístico	55
Factores de estudio	55
Tratamientos.....	56
Metodología.....	56
Desaponificación de quinua	56
Fermentación quinua.....	56
Determinación de componentes nutricionales.....	58
Humedad.....	58
Cenizas	60
Grasa.....	61
Fibra	61
Proteína.....	62
Determinación de Antinutrientes	64
Saponinas	64
Actividad de la Ureasa.....	65
Inhibidores de Tripsina	66
Taninos	69
Ácido Fítico	71
Componentes Funcionales.....	75

	11
Fenoles	75
Flavonoides.....	78
Actividad Antioxidante	80
Carotenoides.....	82
Minerales.....	84
Capitulo IV: Resultados y discusión	85
Fermentación de Quinoa	85
Humedad.....	88
Ceniza	92
Grasa.....	95
Fibra	98
Proteína.....	102
Antinutrientes.....	112
Saponinas	113
Actividad de la Ureasa.....	117
Inhibidores de Tripsina	120
Taninos	122
Ácido Fítico	126
Componentes Funcionales.....	128
Fenoles	129
Flavonoides.....	130

Actividad Antioxidante	132
Carotenoides.....	139
Capitulo V: Conclusiones.....	142
Capítulo vi: Recomendaciones.....	144
Capitulo VII: Bibliografía	145

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Fases dentro de un sistema de fermentación en estado sólido</i>	30
Figura 2 <i>Estructura de los compuestos flavonoides</i>	49
Figura 3 <i>Proceso de fermentación de la quinua</i>	57
Figura 4 <i>Curva de calibración de Saponina</i>	65
Figura 5 <i>Curva de calibración de taninos</i>	71
Figura 6 <i>Curva de calibración de ácido fítico</i>	75
Figura 7 <i>Curva estándar para CFT</i>	77
Figura 8 <i>Curva determinación de Flavonoides</i>	79
Figura 9 <i>Curva de calibración, capacidad antioxidante</i>	81
Figura 10 <i>Apariencia de la quinua fermentada con R. oligosporus</i>	86
Figura 11 <i>Diagrama de composición proximal de tres genotipos de quinua</i>	88
Figura 12 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de humedad de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	89
Figura 13 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de ceniza de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	93
Figura 14 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de grasa de la quinua (Factor B)</i> ...	96
Figura 15 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de fibra de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	100
Figura 16 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de proteína de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	103
Figura 17 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de hierro y zinc de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	109
Figura 18 <i>Diagrama del contenido de antinutrientes en la quinua</i>	113

Figura 19 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de saponina de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	115
Figura 20 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de ureasa de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	118
Figura 21 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de inhibidores de tripsina de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	121
Figura 22 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de taninos de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	124
Figura 23 <i>Diagrama del contenido de compuestos funcionales en la quinua</i>	128
Figura 24 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de fenoles de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	130
Figura 25 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de flavonoides de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	132
Figura 26 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de actividad antioxidante de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	133
Figura 27 <i>Diagrama de correlación de nutrientes, antinutrientes y compuestos funcionales de la quinua</i>	134
Figura 28 <i>Efecto de la fermentación en la cantidad de carotenoides de la quinua (Factor A y Factor B)</i>	140

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Esquema del análisis de varianza</i>	55
Tabla 2 <i>Factores en estudio para la elaboración de quinua</i>	55
Tabla 3 <i>Tratamientos para la fermentación en estado sólido de la quinua</i>	56
Tabla 4 <i>Tabla de procedimiento inhibidores de tripsina</i>	68
Tabla 5 <i>Tabla de procedimiento inhibidores de tripsina</i>	68
Tabla 6 <i>Determinación de ácido fítico</i>	72
Tabla 7 <i>Determinación de ácido fítico</i>	73
Tabla 8 <i>Determinación de ácido fítico</i>	74
Tabla 9 <i>Composición proximal de tres genotipos de quinua en sus diferentes estados</i> .87	
Tabla 10 <i>Análisis de la varianza para la humedad de la quinua</i>	89
Tabla 11 <i>Análisis de la varianza para la ceniza de la quinua</i>	92
Tabla 12 <i>Análisis de la varianza de grasa de quinua</i>	95
Tabla 13 <i>Análisis de la varianza para la fibra</i>	99
Tabla 14 <i>Análisis de la varianza de proteína</i>	103
Tabla 15 <i>Cantidad de hierro y zinc presente en la quinua amarga, desaponificada y fermentada</i>	107
Tabla 16 <i>Análisis de la varianza de Hierro</i>	108
Tabla 17 <i>Análisis de la varianza de zinc</i>	108
Tabla 18 <i>Factores antinutricionales de tres genotipos de quinua en sus diferentes estados</i>	112
Tabla 19 <i>Análisis de la varianza para las saponinas</i>	114
Tabla 20 <i>Análisis de la varianza para la actividad de la ureasa</i>	117
Tabla 21 <i>Análisis de la varianza para Inhibidores de Tripsina</i>	120
Tabla 22 <i>Análisis de la varianza para taninos</i>	123

Tabla 23 <i>Análisis de la varianza para ácido fólico</i>	126
Tabla 24 <i>Factores funcionales de los genotipos de quinua en sus diferentes estados</i>	129
Tabla 25 <i>Análisis de la varianza para los compuestos fenólicos</i>	130
Tabla 26 <i>Análisis de la varianza para los flavonoides</i>	131
Tabla 27 <i>Análisis de la varianza para la actividad antioxidante</i>	133
Tabla 28 <i>Análisis de la varianza para los carotenoides</i>	139

Lista de abreviaturas

FES	Fermentación en estado sólido
SSF	Solid State Fermentation
SOD	Superóxido dismutasa
LPS	Lipopolisacáridos
<i>R. oligosporus</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
INIAP-EESC	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Santa Catalina
GABA	Ácido gamma amino butírico
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
Aw	Actividad de agua
NFC	Polisacáridos no fibrosos
NSP	Polisacáridos sin almidón
NDF	Fibra detergente neutra
ADF	Fibra detergente ácida
nm	Nanómetros
rpm	Revolución por minuto
TIA	Actividad Inhibitoria de Trpsina
CF	Contenido total de fenoles
GAE	Equivalente de ácido gálico
QE	Equivalente de quercetina

Resumen

La quinua es un grano andino de alto valor nutricional, contiene proteínas, minerales y antioxidantes de alta calidad, sin embargo, la presencia de compuestos bioactivos como la saponina interfieren en la bioadsorción de los nutrientes. En este estudio se evaluó el efecto de la desaponificación y fermentación en estado sólido con *Rhizopus oligosporus*, de tres genotipos de quinua (Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4), con el objetivo de disminuir el contenido de antinutrientes y mejorar el potencial nutricional de la quinua. La cantidad de saponina, inhibidores de tripsina y taninos disminuyeron durante el proceso de desaponificación, mientras el ácido fítico y la actividad ureasa no presentaron cambios significativos, a pesar de la relativa efectividad del proceso de eliminación de saponinas, la cantidad de nutrientes y compuestos funcionales, en algunos genotipos también fue afectada. Durante la fermentación el contenido de fibra, ceniza, proteína, taninos, fenoles, flavonoides y actividad antioxidante mejoró, mientras el contenido de humedad, saponinas e inhibidores de tripsina disminuyó, lo que mejoró el contenido de los nutrientes y minerales pues por efecto del proceso de fermentación aumentó la cantidad de hierro y zinc, los fitatos no presentaron cambios significativos y los carotenoides presentaron resultados variables entre genotipos, además se encontró que la actividad antioxidante esta correlacionada con una mayor cantidad de compuestos fenólicos y taninos. En consecuencia, la quinua resulto ser un alimento de alto valor nutricional y la FES un proceso efectivo para mejorar la composición nutricional y funcional del grano.

Palabras clave: *Rhizopus oligosporus*, quinua (*Chenopodium quinoa*), fermentación sólida (FES), composición nutricional, antinutrientes,

Abstract

Quinoa is an andean grain of high nutritional value, it contains high quality proteins, minerals and antioxidants. However, the presence of bioactive compounds such as saponin interfere with the bio-adsorption of nutrients. In this study, the effect of deponification and solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus* of three genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa*) was evaluated. The nutritional, antinutritional and functional components were analyzed with the objective of reducing the antinutrients content and improve the nutritional potential of the quinoa. The amount of saponin, trypsin inhibitors and tannins decreased during the deponification process., while phytic acid and urease activity did not show significant changes. Despite the relative effectiveness of the saponin removal process, the amount of nutrients and functional compounds in some genotypes was also affected. During fermentation, the total content of fiber, ash, protein, tannins, phenols, flavonoids and antioxidant activity improved, while moisture content, saponins and trypsin inhibitors decreased, as a consequence, the content and bioavailability of nutrients and minerals was improved, since a greater amount of iron and zinc was also found. Phytates did not present significant changes and carotenoids presented variable results between genotypes. In addition, it was also found that antioxidant activity is correlated with a greater amount of phenolic compounds and tannins, due to their electron donation capacity. In conclusion, quinoa is a food with high nutritional value and SSF is an effective treatment process, which led to a superior nutritional and functional composition of the grain.

Keywords: *Rhizopus oligosporus*, quinoa (*Chenopodium quinoa*), Solid state fermentation (SSF), nutritional composition, antinutrients.

Capítulo I: Introducción

Introducción

La fermentación en estado sólido (SSF) de la quinua es un proceso mediante el cual la quinua sufre una transformación por medio de la fermentación con hongos como *Rhizopus oligosporus*, *R. arrhizus*, *Rhizopus oryzae* u otros microorganismos benéficos (Chang *et al.*, 2009; Shurtleff & Aoyagi, 1979). Este proceso forma un producto similar al tempe el cual es un alimento tradicional de indonesia utilizado como sustituto de productos cárnicos (Bates *et al.*, 1997)

La fermentación (FES) mejora las características organolépticas favoreciendo el sabor y textura de la quinua, aumenta el contenido de hierro y α -tocoferol siendo un material prometedor para el desarrollo de productos alimenticios como galletas (Matsuo, 2006). Los compuestos funcionales (l -carnitina, GABA, ácido vanílico y ácido gálico) que incrementan durante la fermentación y el contenido total de fenoles (hasta de 74 mg GAE/kg y 16 mg QE/kg respectivamente), hacen de la quinua fermentada un alimento valioso y saludable (J. Hur *et al.*, 2018).

Matsuo (2005) mediante investigación *in vitro* e *in vivo* de ratas encontró que el extracto de metanol al 80% de Q-tempeh (quinua fermentada con *R. oligosporus*) era un reductor de peróxido y eliminador de SOD (superóxido dismutasa) y Hur *et al.* (2018) mediante la utilización de macrófagos RAW 264.7 con estimulación LPS observó inhibición de óxido nítrico (56,4 %) lo que mejoró en 192,6 % la actividad antiinflamatoria. Esto demuestra la importancia de la quinua y su fermentación (FES) como potencial antioxidante en la alimentación.

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) es un grano de alto valor nutricional, posee proteínas de alta calidad y todos los aminoácidos esenciales (Marcus, 2013). Con niveles de lisina mayores a los del trigo y contenido de minerales (hierro, calcio, magnesio, potasio y

fósforo) en su mayoría superiores al de los cereales (Fletcher, 2015). También es una buena fuente de lípidos, minerales, fibra y vitamina, así como de polifenoles (Vega-Gálvez *et al.*, 2010).

Sin embargo y pese al elevado valor nutricional se ha identificado en la quinua factores antinutricionales, la semilla de la quinua se encuentra cubierta de alto contenido de saponina que ocasiona amargura si no se enjuga adecuadamente, inhibidores de proteasa, ácido fítico y taninos los cuales pueden tener un efecto perjudicial en la supervivencia y rendimiento de los organismos monogástricos (Filho *et al.*, 2017; Perdon & Holopainen-Mantila, 2020).

La fermentación junto con la exposición al calor y la germinación constituyen elementos claves que pueden reducir hasta en un 95% los factores antinutricionales al aumentar la biodisponibilidad mineral, la digestibilidad de carbohidratos y proteínas (Reddy & Pierson, 1994). Por ejemplo, el tempe de soja fermentada es un alimento altamente nutritivo, el cual, además, posee funciones benéficas cognitivas, propiedades anticancerígenas y funcionales (Handajani *et al.*, 2020; Kiriakidis *et al.*, 2005).

Además la fermentación (FES) puede ayudar a producir alimentos de forma simple, de bajo costo energético y económicos, los cuales pueden llegar a tener un elevado potencial como alimentos industriales pese a ello las implicaciones industriales son mínimas y limitadas, no solo se puede mejorar el sabor, aroma y degradar los factores antinutricionales con la fermentación sino que también se puede obtener productos, entre los principales se encuentran enzimas y ácidos orgánicos (Couto & Sanromán, 2006; Shekib, 1994; R. Wang & Guo, 2021).

Debido a todos estos parámetros se puede entonces inferir la gran utilidad e importancia que tiene la fermentación (FES) de la quinua, Además, la producción de alimentos de bajo costo y de elevado potencial nutricional son de gran interés a nivel industrial, económico y nutricional.

Esta investigación busca analizar el efecto de la fermentación en los componentes nutricionales, no nutricionales y funcionales de tres genotipos de quinua, dos de los cuales son material vegetativo mejorado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Justificación del Problema

El mundo enfrenta niveles cada vez más crecientes de inseguridad alimentaria las condiciones socioeconómicas, los conflictos, desastres naturales, cambio climático y plagas han influido negativamente en el hambre crónica y aguda. La nutrición deficiente y disminución en la ingesta de calorías amenazan la seguridad alimentaria reduciendo los avances obtenidos en materia de salud, problemáticas que ya eran preocupantes incluso antes de la pandemia y que tras la reciente crisis económica influenciada mayoritariamente por el COVID-19 se han visto aún más acentuadas (Banco Mundial, 2022; FAO & WFP, 2020).

El 18 de mayo del 2022 el banco mundial dio a conocer medidas que tienen por objeto obtener una respuesta integral y global ante la crisis alimentaria. Destinando esfuerzos para financiar la producción de productos alimenticios de alto valor nutritivo, fertilizantes, sistemas alimentarios entre otros (Banco Mundial, 2022)

En Ecuador la malnutrición (incluye la desnutrición y sobrepeso) es uno de los más grandes problemas y retos que ha enfrentado el estado, las dietas son bajas en calidad nutricional y poco diversas además la población tiene bajo acceso a dietas saludables debido a factores económicos y bajo nivel de conocimientos en prácticas nutritivas (Knight *et al.*, 2020).

En este contexto la quinua se considera como un cultivo estratégico para promover la soberanía y seguridad alimentaria debido a su económico costo de producción, alto potencial nutritivo, amplia variedad genética y gran aceptación del consumidor (Rojas *et al.*, 2011). Por esta razón es de interés estudiar a este grano como un alimento funcional que cubra las necesidades y deficiencias alimentarias que sufre la población ecuatoriana y de mayor manera

las poblaciones rurales las cuales según cifras del INEC son las más afectadas y representan un grupo vulnerable (Programa Mundial de Alimentos, 2021).

Esta investigación surge de la necesidad de estudiar alimentos promisorios de alto valor nutricional, los cuales servirían para combatir la malnutrición que enfrenta el país y el mundo, la quinua es uno de los vegetales más prometedores sin embargo y debido al contenido de antinutrientes entre otros factores se ha visto relegada, por esta razón se busca eliminar o disminuir estos factores y a la vez mediante la fermentación mejorar no solo el sabor y textura sino también el valor nutritivo.

Del mismo modo, el estudio de la quinua como sustrato en la fermentación (FES) permite rescatar un cultivo ancestral, el cual fue ampliamente utilizado en el pasado pero que tras la colonización fue relegado por los cereales por razones sobre todo sociales (Risi, 1997; Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Anteriormente se ha estudiado la quinua y su fermentación para analizar las propiedades funcionales, antioxidantes y antiinflamatorias, sin embargo, existe poca información acerca de las modificaciones antinutricionales y nutricionales que se obtienen tras la desaponificación y fermentación, factores que serán analizados en esta investigación.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Evaluar el efecto de la fermentación en estado sólido con *Rhizopus oligosporus*, sobre los componentes nutricionales, antinutricionales y funcionales, de tres genotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) para mejorar su potencial nutricional.

Objetivos específicos

- Determinar la composición proximal y mineral de tres genotipos de quinua (Chimborazo, Tunkahuan y LPQE4) en estado amargo, desaponificado y fermentado

- Examinar los principales antinutrientes, a fin de evaluar su modificación por efecto de la desaponificación y fermentación de tres genotipos de quinua (Chimborazo, Tunkahuan y LPQE4).
- Determinar los compuestos antioxidantes (polifenoles, flavonoides, carotenoides) y la actividad antioxidante de la quinua amarga, desaponificada y fermentada

Capítulo II: Revisión de la literatura

Antecedentes

La fermentación en semillas y harinas ha demostrado ser un método eficiente en la manipulación de la quinua (Adebo & Medina-Meza, 2020). El creciente interés del uso de fuentes vegetales como sustituto de productos animales no es nuevo, del total de los alimentos 92% tiene origen vegetal y el 8% restante deriva de fuentes animales y unicelulares (Borlaug, 1992). Las fuentes vegetales son más accesibles y económicas, pero en ocasiones de menor valor nutritivo, la fermentación en estado sólido ofrece una alternativa prometedora para elevar dicho valor (Hachmeister & Fung, 1993).

Los alimentos fermentados (FES) constituyen un grupo de alimentos antiguos que se producían a pequeñas escalas en hogares y aldeas y que con el tiempo fueron industrializándose. Tradicionalmente las fermentaciones con *R. oligosporus*, pudieron tener inicio en Indonesia con la formación de una biomasa fúngica la cual consistía en productos principalmente de soja recubiertos y unidos por un micelio no esporulado de hongo que servían como alimento (Hachmeister & Fung, 1993; Nout & Rombouts, 1990).

Hachmeister & Fung (1993) reportaron que la fermentación con cultivo puro se desarrolló en la década de 1950 para la fermentación industrial de tempe, Hesseltine *et al.*, (1963) utilizó una suspensión de esporas de *R. oligosporus* cultivadas en PDA para la fermentación mientras que Steinkraus *et al.* (1965) utilizó un inóculo liofilizado. Para la década de los 70, Shurtleff & Aoyagi, (1979) reportaron la presencia de 53 fábricas de tempe en los EE. UU con producción de más de 700 lbs/día.

En 1983 Steinkraus señaló que el tempe se puede elaborar con granos distintos a la soja, siendo los principales los de granos de cereal, torta prensada, leguminosa y otras

gramíneas (Shurtleff & Aoyagi, 1979). Para 1984 Wilson *et al.* Informaron los posibles problemas toxicológicos que pueden generarse durante la fermentación.

En la quinua fermentada con *R. oligosporus* Matsuo (2005, 2006) obtuvieron mejoras en el sabor y la textura, sin embargo, estos estudios no informan los cambios en los componentes antinutricionales. Finalmente, Hur *et al.*, (2018) reveló un 36% de aumento de la actividad antioxidante por efecto de la fermentación tras la eliminación de DPPH. A lo largo del tiempo se puede evidenciar como la fermentación (FES) y el uso de la quinua como sustrato ha ido evolucionando, en la actualidad la quinua representa un alimento promisorio para el futuro y la fermentación uno de los métodos promisorios para aumentar su valor nutritivo y características organolépticas.

Fundamentos Teóricos

Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es una planta dicotiledónea amilácea perteneciente a la familia Chenopodiaceae originaria de América y domesticada en los Andes, considerada un pseudocereal por las características propias de su grano (Jacobsen, 2003; Vega-Gálvez *et al.*, 2010). La inflorescencia es de tipo panoja, de hoja ancha y con semillas de forma ovalada con colores variados que van desde el rosa al negro (Abugoch James, 2009; Karyotis *et al.*, 2003).

Es una especie cultivada principalmente en América del Sur, siendo Bolivia, Perú y Ecuador sus principales productores. También se cultiva en Europa, EE. UU, China, India y Canadá (Abugoch James, 2009). Considerada como “grano de oro” o “grano madre” fue un alimento importante para las culturas precolombinas, los Incas la consideran un alimento sagrado, sin embargo, tras la colonización su cultivo y consumo fue sustituido y casi eliminado quedando solo en la tradición del campo, en la actualidad es aún importante para los pueblos Aymara y Quechua (Farro, 2008; Jacobsen, 2003; H. Wilson, 1981, 1988). Esta planta destaca

por su resistencia a condiciones adversas entre ellas, la sequía, las condiciones del suelo y el clima, puede sobrevivir con alturas desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm (Karyotis *et al.*, 2003). No contiene gluten a diferencia de muchos de los cereales por ende es óptima para las personas celiacas (Gallagher *et al.*, 2004).

Las partes comestibles no están limitadas al grano incluyen también hojas e inflorescencias, contiene minerales, vitaminas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, así como flavonoides y fitoesteroles, se le atribuyen también propiedades funcionales tecnológicas como gelificación, solubilidad, emulsión, capacidad de retención de agua y posibles propiedades nutraceuticas (Abugoch James, 2009; Farro, 2008; Spehar, 2006)

Genotipo Chimborazo

Chimborazo es la segunda variedad de quinua más cultivada en Ecuador, posee colores de panoja rojos, verdes y púrpuras, con altura superior a los 2m, de aspecto en forma de piramide con hojas dentadas y ovuladas e inflorescencia sin pedicelo, compacta, pequeña y glomerulada. Cultivada principalmente entre las provincias de Carchi, Cañar, Tungurahua y Pichincha de bajo contenido de saponina y de habito de crecimiento tardío (Gandarillas *et al.*, 1989).

Genotipo INIAP-Tunkahuan

INIAP Tunkahuan es una variedad, obtenida por el Programa de Cultivos Andinos INIAP, recolectada en el año 1985 en Ecuador (Carchi) mediante selección de germoplasma. En 1986 fue seleccionada como línea promisoría y evaluada en los años siguientes (1992-1996) e introducida en el Banco de Germoplasma del INIAP, para finalmente ser liberada como variedad mejorada (Nieto *et al.*, 1992 Peralta, 2010)

Posee características típicas de la variedad Imbabura, con hojas grandes, dentadas y triangulares, presenta además color de planta púrpura y panoja anaranjada, ligeramente

susceptible al mildiú (*Peronospora farinosa*) y de bajo contenido de saponina por lo que es considerada como un genotipo dulce (Nieto *et al.*, 1992). En el 2010 Iniap Tunkahuan representó el 70% del total de hectáreas sembradas con quinua en el Ecuador (INIAP, 2012).

Línea LPQE-4

En Ecuador en 1983 se inició el rescate de la quinua y el amaranto (ataco), después de años e investigaciones y mejoramiento se liberó dos variedades amargas (alto contenido de saponina), y en 1992 dos variedades dulces de las cuales INIAP Tunkahuan continua vigente. La investigación se paralizó en 1997 se retomó en el 2001 con el Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos PRONALEG-GA (Peralta, 2010).

En 2008 este programa inicio el mejoramiento genético utilizando las variedades INIAP Tunkahuán e INIAP Pata de Venado que fueron cruzadas por hibridación, desde F1 hasta F4 se seleccionó individualmente el material vegetal, las líneas F5 y F6 fueron evaluadas en INIAP-EESC y desde F7 las líneas codificadas como LQE-4 se evaluaron en distintas provincias. De estas LQEP4 ha sido una de las líneas de interés, ha presentado buenas características agronómicas, severidad al mildiu, además de buen rendimiento (Mazón *et al.*, 2017; Mina, 2014; Murillo *et al.*, 2015; Paredes, 2019).

Fermentación

Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso de fermentación en donde se cultivan microorganismos en partículas húmedas y sustrato sólido, sin presencia de fase acuosa libre, sobre material orgánico el cual actúa como soporte (Manan & Webb, 2017; Mitchell *et al.*, 2011; A. Pandey *et al.*, 2000). La cantidad de humedad presente en el sustraído generalmente es de entre 80% y 30% (Lekha & Lonsane, 1997). Es un proceso heterogéneo

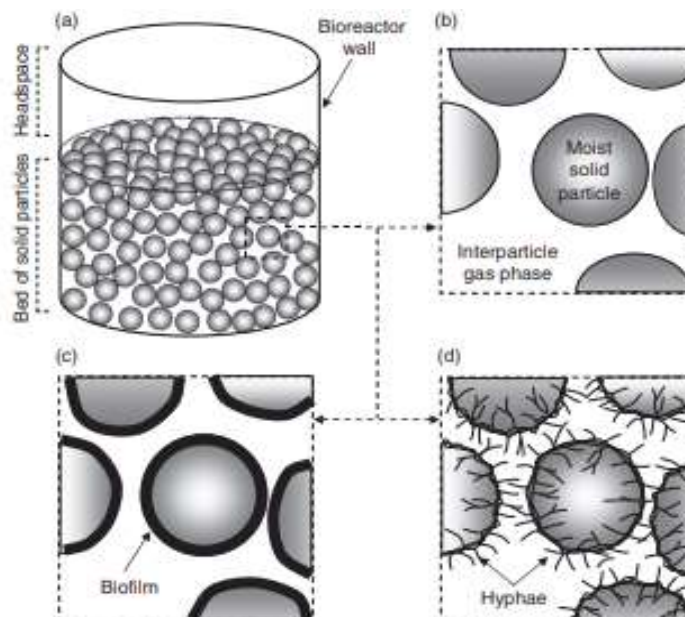
debido a que la biomasa, sustrato y productos se encuentran en cantidades diferentes en un mismo fermento (Rodríguez-León *et al.*, 2018).

Durante la FES ocurre un mecanismo de biorreacción compuesto por tres fases: sólido, líquido y gaseoso, el crecimiento microbiano (hongos, levaduras, bacterias) en la matriz sólida forma una red fungica causando entrelazamiento entre los componentes macromoleculares, la degradación de la matriz debido a la porosidad, transferencia de masa y calor permiten que el micelio se expanda entre las partículas del sustrato llenándose de una fase gaseosa continua (Mitchell *et al.*, 2011; L. Wang *et al.*, 2018)

La FES produce concentraciones elevadas de productos, a bajos costos y con un mínimo requerimiento de agua, es utilizada industrialmente para la producción de metabolitos secundarios, enzimas, ácidos orgánicos, proteínas unicelulares, bioetanol, antibióticos y más recientemente biosurfactantes y biopesticidas además representa un método biotecnológico útil para la biorremediación (Torres *et al.*, 2019; Yafetto, 2022). En la industria agroindustrial se ha utilizado residuos de maíz, salvado de arroz, palma entre otros, para la fabricación de alimentos animales y humanos, mayoritariamente para llevar a cabo la fermentación se utiliza hongos filamentosos sin embargo también se ha reportado el uso de levaduras (*Saccharomyces*) y bacterias (*Streptomyces* spp). (El-Naggar *et al.*, 2011; Manan & Webb, 2017; Oboh, 2006; A. Pandey *et al.*, 2000).

Figura 1

Fases dentro de un sistema de fermentación en estado sólido



Nota. (a) Macroescala del sistema de fermentación: Se puede distinguir los espacios entre el sustrato y el biorreactor. (b) Sustrato no inoculado: Es apreciable los espacios entre las partículas y el gas intermedio. (c) Formación de Biofilm: Capa gruesa formada por organismos unicelulares (hongo o bacterias). (d) Formación de una red fúngica: Las hifas se extienden dentro del sustrato, así como entre las partículas. Tomada de "Bioreactors for Solid-State Fermentation" por DA Mitchell, LF de Lima Luz, and N Krieger, en M.-Y. M., (Ed), *Comprehensive Biotechnology* (2da Ed, p. 347-360), 2011, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00107-0>.

Metabolismo de la Fermentación

La fermentación FES depende de factores como pH, humedad, temperatura y aireación, la acidificación microbiana durante el remojo genera disminución del pH, que suprime el crecimiento bacteriano de microorganismos indeseables (Steinkraus *et al.*, 1960). Durante la fase de crecimiento somático ocurre la acumulación de metabolitos y un progresivo aumento del pH. En la superficie de las partículas se genera la biopelícula y las de redes de hifas fúngicas penetran el sustrato debido a la porosidad, la cual incide directamente con la

producción de enzimas (Mitchell *et al.*, 2011; Rahardjo, 2005). El hongo llega a penetrar hasta un 25% la matriz sólida (Jurus & Sundberg, 1976).

En la fase de crecimiento micelial (0-32) la materia seca se reduce 10% p/p y el sustrato sufre hinchamiento lo que aumenta la accesibilidad de los nutrientes que son digeridos por exoenzimas. Durante la fase de senescencia (60-180 h) se digieren lípidos y se oxidan e hidrolizan proteínas, en la soja la conglicina es la glicoproteína más sensible a las proteasas (de Ruiter *et al.*, 1992; Ruiz-Terán & Owens, 1996) Debido al efecto proteolico puede generarse amoniaco, el cual es indeseable debido su toxicidad, el pH cambia continuamente durante la fermentación, pero sus valores óptimos son 3.0 y 5.5 donde se dan altos índices de actividad (Miszkievicz *et al.*, 2003; Nout & Rombouts, 1990). La reducción de antinutrientes se da por los procesos de biocatálisis sin embargo el hongo para su desarrollo requiere vitaminas por lo cual estas pueden disminuir (Reddy & Pierson, 1994).

Composición Nutricional

Humedad

Los alimentos están compuestos por agua en mayor o menor medida, el contenido de agua influye en las propiedades reológicas, coligativas y de textura de un alimento al interferir en las reacciones enzimáticas, químicas, microbiológicas y físicas. El agua puede encontrarse en los alimentos de dos maneras de forma libre o ligada, el agua ligada no se encuentra disponible ya que está unida a la superficie, forma enlaces con proteínas y compuestos afines permaneciendo dentro del producto de forma inmóvil. El agua libre o absorbida utilizada en los procesos de transformación es la que se encuentra disponible y se libera con facilidad (Arevalo, 2017; Badui *et al.*, 1999)

El contenido de agua no representa por sí solo la estabilidad de un producto para ello se utiliza la a_w (actividad del agua) o humedad en equilibrio esta varia de entre 0 y 1 y es diferente para cada alimento según su humedad y temperatura (Puerta, 2013). La humedad que se

representa en porcentaje entonces, es un parámetro utilizado para el control, procesamiento y conservación de los alimentos. Frecuentemente es un índice de estabilidad y para los procesos industriales representa un factor decisivo en el mezclado, almacenamiento y elaboración de los productos. En la molienda de los cereales, por ejemplo, se utiliza humedades específicas ya que estas interfieren en el rendimiento y la calidad de la harina pudiendo ser pastosa o gelatinosa (Chiluiza & Saquina, 2017; Hernández *et al.*, 2016)

La humedad esta normada para muchos alimentos y su determinación es importante para evaluar y corregir excedentes de agua, en los granos y cereales cantidades de agua elevadas pueden incidir en la germinación, en cantidades altas se tiene mayor tendencia a la aglomeración de materiales pulverulentos, y predisposición al desarrollo microbiano, siendo más probable que bacterias, levaduras y mohos crezcan en alimentos con elevada humedad.(Mallmann *et al.*, 2007) encontraron que el desarrollo fúngico y la proliferación de micotoxinas se ven favorecidos por las condiciones de temperatura y humedad.

Cenizas

Las cenizas se definen como el residuo inorgánico de un alimento, son el resultado de la calcinación de los compuestos orgánicos y se determinan por la pérdida de peso producida durante la oxidación a temperaturas elevadas 500-600 °C (Park, 2016). Aunque se definen como sustancias inorgánicas generalmente no representan la cantidad exacta de material inorgánico, debido a pérdidas por volatilización o interacción química (Márquez, 2014; Park, 2016). Las cenizas pueden determinarse por incineración húmeda o seca, la incineración seca es la más utilizada debido a que con ella se obtiene las cenizas insolubles en agua, insolubles en ácido y solubles en agua (Park, 2016).

En la Industria alimentaria las cenizas son un índice de calidad, representan el contenido de minerales y el nivel de pureza en ingredientes como gelatinas, peptinas, azúcar y almidones, son parte del análisis proximal para la determinación nutricional y en jaleas y

mermeladas representan el índice de adulteración, en estos productos las cenizas están directamente relacionadas con el contenido de frutos por ende se considera también como un indicativo del nivel de fraude o contaminación, en cereales las cenizas indican el tipo de molienda y refinamiento, harinas integrales de grano entero contienen mayor porcentaje de cenizas 2% que harinas procedentes del endospermo 0,3%, es útil también en la determinación colioactiva de los oligoelementos y en vegetales es una herramienta para determinar la distribución de los minerales (Márquez, 2014; Westernbrink *et al.*, 2009). Una cifra elevada de ceniza sugiere la existencia de contaminantes inorgánicos o adulteraciones metálicas para su descarte es recomendable analizar la ceniza insoluble en ácido (Márquez, 2014; Westernbrink *et al.*, 2009)

El agua y los minerales son los únicos componentes que el organismo no puede oxidar a diferencia de los compuestos orgánicos formados principalmente por oligoelementos los cuales son oxidados para formar energía. Cuando los alimentos son calcinados a temperaturas superiores a los 500°C los compuestos orgánicos por medio del oxígeno atmosférico son quemados y transformados a CO_2 y NO_2 y se desprenden por medio de la evaporación mientras que la mayoría de los minerales como el fósforo y el azufre son convertidos en cloruros, silicatos, sulfatos, óxidos y fosfatos según sea la conformación del alimento. El hierro, mercurio, selenio y plomo pueden volatilizarse y perderse parcialmente por lo que, si se requiere un análisis elemental preciso, la determinación de cenizas no se considera el método más adecuado (Márquez, 2014; Sawyer & Kirk, 1999).

Grasa y extracto etéreo

En los alimentos los aceites y las grasas son los principales lípidos que se encuentran, las semillas oleaginosas (20%-40%). Los tejidos animales contienen los porcentajes más elevados de lípidos mientras que hortalizas y frutas presentan bajas concentraciones con algunas excepciones como las aceitunas, el aguacate y las nueces. Existen lípidos sólidos

(grasa) y lípidos líquidos (aceite), los lípidos sólidos y semisólidos se denominan grasas (Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química, 2001; N. Reyes & Mendieta, 2000).

El contenido graso en los alimentos o grasa cruda son los lípidos libres y combinados que pueden ser extraídos con solventes polares y quedan como residuo tras la evaporación, fundamentalmente están constituidos por grasas neutras (triglicéridos) y ácidos grasos libres (Navarro, 2007; N. Reyes & Mendieta, 2000) La grasa cruda es también denominada extracto etéreo (EE) debido a su composición, está conformada por no nutrientes (ceras, pigmentos, resinas, xantofilas) y nutrientes (ácidos grasos libres, vitaminas liposolubles, glicéridos y colesterol) (N. Reyes & Mendieta, 2000). El método de extracción en ocasiones interfiere con el porcentaje de EE, normalmente se determinan por métodos de extracción por solventes orgánicos (Goldfish y Soxhlet) pero también pueden determinarse por métodos de extracción sin disolventes y métodos instrumentales como el infrarrojo (Westernbrink *et al.*, 2009).

La determinación de los lípidos en los alimentos es importante debido a que representa un parámetro de calidad (textura, color, sabor y lubricación), de nutrición (fuente de energía, vehículo y absorción de vitaminas, síntesis de micelas y de bilis) y de valor biológico (son fuente de vitaminas A, D, E Y K, ayudan a la agregación de las plaquetas, son precursores de vitaminas eicosanoides y lipoxinas y favorecen la trasmisión de señales) (Malavé *et al.*, 2009).

Fibra

Los carbohidratos se pueden separar según su digestibilidad en el tracto intestinal en dos grupos, el primer grupo: carbohidratos no estructurales, polisacáridos no fibrosos NFC (por sus siglas en inglés) o carbohidratos simples (almidón, fructanos y azúcares simples) que se hidrolizan fácilmente por las reacciones enzimáticas y se absorben en el intestino delgado y el segundo grupo: carbohidratos estructurales, polisacáridos sin almidón (NSP por sus siglas en inglés) o carbohidratos complejos (hemicelulosa, beta-glucanos, pectina, celulosa y lignina) que

requieren fermentación bacteriana en el intestino grueso debido a que son resistentes a la digestión en el intestino delgado (Lattimer & Haub, 2010).

Los NSP también conocidos como fibra son aprovechados por el metabolismo de los organismos monogástricos y a su vez se subdividen en fibra soluble e insoluble, la fibra soluble involucrada en la estructura y el metabolismo de las células vegetales (fructanos tipo inulina, algunas hemicelulosas, gomas, mucilagos y pectinas) evita la digestión en el intestino delgado se disuelve en agua formando geles viscosos y es fácilmente fermentada por la microflora del intestino grueso, mientras que la fibra insoluble utilizada como material de construcción estructural en la pared celular de las plantas (celulosa y algunas hemicelulosas y lignina) debido a su insolubilidad no es capaz de formar geles y es difícilmente fermentada (Lattimer & Haub, 2010; Schaller, 1978). Aproximadamente la mayoría de los alimentos con fibra contienen dos tercios de fibra insoluble y un tercio de fibra soluble (Lattimer & Haub, 2010; Wong & Jenkins, 2007).

La determinación de la Fibra Cruda o Fibra bruta (FB) es el método analítico común para estimar el material no digerible de la dieta, sin embargo, el análisis de FB no es un método altamente preciso, durante la digestión ácida se disuelve un porcentaje de lignina y hemicelulosa y durante la digestión alcalina se disuelve celulosa e igual porcentajes de lignina, de tal manera que el producto final no contiene la totalidad de fibra siendo los porcentajes obtenidos por este análisis menores que los reales, sin embargo es útil para determinar celulosa, entre un 50-90% de celulosa se recupera, un 20% de hemicelulosas insolubles y 10-40% de ligninas (N. Reyes & Mendieta, 2000; Schaller, 1978).

La fibra dietética se define como un polisacárido con diez o más unidades monoméricas que no puede ser hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto intestinal humano, a diferencia de la FB, la fibra dietética incluye la fracción de polisacáridos que se pierden durante la digestión ácida y básica, pese a que el contenido de fibra dietética puede determinarse con

otros métodos bioquímicos, químicos o enzimáticos estos son más complejos, laboriosos y requieren mayor cantidad de tiempo y dinero, además de presentar también interferencias como lo es: la no estimación de proteínas, grasas y otros materiales no digeribles asociados con la pared celular de las plantas (Badui, 2006; Lattimer & Haub, 2010; Schaller, 1978). Por ende, el análisis de FB es aún un método de interés que proporciona las bases para comenzar a definir y comprender la fibra dietética (Lattimer & Haub, 2010).

Estudios epidemiológicos y clínicos respaldan que la ingesta de granos y fibra dietética esta inversamente relacionada con las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, cáncer (laringe, colorrectal, oral, intestino delgado y de mama) y la obesidad, los mecanismos responsables planteados son: la resistencia a la digestión en el intestino delgado y la fermentación en el intestino grueso donde se produce ácidos grasos de cadena corta con propiedades anticancerígenas; la producción de antioxidantes; menos tiempo de contacto entre los carcinógenos potenciales y las células de la mucosa por el aumento del volumen fecal y la viscosidad; la unión mayor entre los ácidos biliares y los carcinógenos e inhibición en absorción de estrógeno en los intestinos; aumento de la tasa de excreción de bilis, lo que reduce el colesterol; entre muchos otros (Adlercreutz *et al.*, 1987; Lattimer & Haub, 2010; Story *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2005).

La FDA ha aprobado dos declaraciones afirmando las propiedades saludables de la fibra dietética, se cree que el efecto sinérgico con fitoquímicos (carotenoides, beta-glucano, lignanos, fenólicos, e inulina) aumenta las propiedades digestivas y el contenido de nutrientes (FDA, 2008; Lattimer & Haub, 2010; Liu, 2003; Tucker & Thomas, 2009; Weickert & Pfeiffer, 2008). Además, (Keenan, 2006) encontró que la fibra soluble puede llegar a producir saciedad cuando se fermenta en el intestino grueso produciendo dos hormonas (GLP-1) similar al glucagón y (PYY), afirmando las importantes propiedades de la fibra en la digestión.

Proteína

Las proteínas son macromoléculas conformadas por aminoácidos con diversas funciones biológicas, se desempeñan como transportadores, mensajeros, reparadores de tejidos, constituyentes de hormonas, componentes estructurales, enzimas, componentes del sistema inmune siendo necesarias para el crecimiento y desarrollo corporal, entre otros (Campos *et al.*, 2013; Quesada & Gómez, 2019; Trudy & James, 2020).

El organismo posee la capacidad de sintetizar proteínas pero este se ve afectado por la disponibilidad de los aminoácidos esenciales, el valor nutricional de una proteína depende de la cantidad, la calidad (requerimiento del aminoácido más limitante) y digestibilidad (relación entre el nitrógeno consumido y el absorbido), tanto las proteínas vegetales y animales son ricas en péptidos funcionales, sin embargo las últimas se consideran como fuentes incompletas debido a las bajas proporciones de aminoácidos esenciales, la menor digestión debido al almacenamiento en gránulos, y la presencia de factores antinutricionales (Quesada & Gómez, 2019).

Proteínas en la industria alimentaria

En la industria alimentaria las proteínas son de gran interés, además de sus propiedades nutricionales las proteínas otorgan sabor a los alimentos, influyen en su textura, tienen propiedades espumantes gelificantes y emulsificantes (Lupano, 2013). Ejercen control sobre la textura de los alimentos, el contenido proteico de la harina de trigo es uno de los mejores índices de calidad, principalmente las proteínas que integran el gluten le confieren a la masa panificable las propiedades viscoelásticas, cohesivas y capacidad de gas (Villanueva, 2014).

Las proteínas pueden encontrarse en combinaciones químicas o físicas con lípidos o carbohidratos, las glucoproteínas y lipoproteínas interfieren en las características fisiológicas

(rigidez, viscosidad, espaciamento y elasticidad) y confieren propiedades emulsificantes o espumantes debido a su naturaleza anfifílica, su tendencia a desnaturalizarse y agregarse en la interfase, además, el envejecimiento de la carne se encuentra relacionado con los cambios químicos de las proteínas (Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química, 2001; Brumovsky, 2014; Nielsen, 1994; Yeshajahu & Meloan, 1987).

Las proteínas también están relacionadas con las características sensoriales, durante el proceso de calentamiento las cadenas laterales de los aminoácidos se degradan e interactúan con otros compuestos alimenticios, por ejemplo, los azúcares reductores interactúan con la lisina confiriéndole sabores agradables, sin embargo, debe tenerse cuidado con el sobrecalentamiento ya que reduce el valor nutritivo (Nielsen, 1994; Yeshajahu & Meloan, 1987). (Vandewater & Vickers, 1996) encontraron que existen diferencias significativas en el gusto cuando se consumen los alimentos con diferente cantidad de proteínas siendo los alimentos con elevado valor proteico los más apetecibles, además estos demostraron reducir la sensación de hambre en un porcentaje mayor al de los alimentos bajos en proteínas.

Saponinas

Las saponinas son moléculas anfipáticas termoestables, formadas por glucósidos triterpénicos policíclicos cuyo catión glicosilado, varía pudiendo incluir galactosa, glucosa, ramnosa, xilosa o ácido glucurónico, contienen una aglicona esteroideal o triterpenoide y una o más cadenas de azúcar, pueden degradarse por glucosidasas bacterianas, así como por hidrólisis ácida y alcalina (Gestetner *et al.*, 1968).

Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, estando presentes en más de 100 familias de plantas especialmente en leguminosas como el lupino, la arveja y la soja en rangos de entre 1-5 g/Kg, también se encuentran en el ginseng y las espinacas, en fuentes marinas como el pepino y la estrella de mar y en bebidas como el té (Krogdahl & Bakke, 2015). Constituyen un grupo diverso de compuestos con distintas propiedades fisicoquímicas y

biológicas, en la industria alimentaria se consideran “factores antinutricionales” cuyo uso es limitado debido su característico sabor amargo siendo objeto de eliminación (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007)

Las saponinas facilitan la absorción de sustancias que normalmente no se absorben, como los alérgenos, estas pueden intercalarse en las membranas que contienen colesterol y formar agujeros y micelas, en los mamíferos esto parece aumentar la permeabilidad de las células epiteliales intestinales, el intestino no puede absorberlas por sí mismas y en las ocasiones que se logran incorporar se pierden eventualmente en el proceso de renovación celular. (Gee *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1986). También se han reportado propiedades de lisis Baumann *et al.*, (2000) informaron que las saponinas interactúan con los esteroides presentes en las membranas de los eritrocitos y producen reacciones hemolíticas, esto conduce a la ruptura de la membrana de los eritrocitos, lo que aumenta la permeabilidad celular y la pérdida de hemoglobina.

Forman complejos insolubles con el colesterol, probablemente el colesterol se solubiliza dentro de las micelas de saponina Mitra & Dungan (2000) encontraron que los complejos saponina-colesterol provocan un aumento de tamaño, viscosidad y número de agregación lo que mejora la solubilidad del colesterol. Southon *et al.*, (1988) informaron la formación de complejos con el hierro y zinc, por lo tanto, las saponinas, pueden tener un efecto adverso en la absorción y digestión de minerales en el organismo. Debido a sus propiedades tensoactivas también pueden conferir características humectantes, detergentes, espumantes y propiedades emulsionantes (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007).

Las saponinas presentes en los alimentos normalmente no son perjudiciales para la salud debido a que se encuentran en reducidos porcentajes, a diferencia de los peces para quienes, si representan compuestos tóxicos, en los últimos años se ha reportado actividades biológicas y efectos beneficiosos como propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias

,antivirales (VIH), hipoglicémica, antitrombótica, diurética, antifúngica entre, muchos otros, lo que ha puesto de manifiesto la reconsideración de las saponinas como agentes “antinutricionales” (Elizalde *et al.*, 2009).

Inhibidores de Tripsina

Los inhibidores de tripsina son sustancias proteicas que en presencia de un sustrato y una proteasa producen una notoria disminución en la velocidad de la reacción enzimática, juegan un papel importante en la digestión de los aminoácidos y las proteínas (Quicazán & Caicedo, 2012), y se encuentran ampliamente distribuidas en una gama de alimentos, están presentes en la mayoría de las legumbres las cuales son la principal fuente de proteína de muchas dietas humanas y animales, aproximadamente representan hasta el 10% de proteínas totales (Sathe & Deshpande, 2003; Savage & Morrison, 2003). Entre las especies vegetales que las contienen se encuentran: soja, garbanzos frijoles (rojos, mungo, adzuki,) otros representantes de las familias Gramíneas, Solanaceae y Leguminoseae (Tibe & Amarteifio, 2007)

El sistema digestivo requiere la acción de enzimas para su correcta digestión, estas enzimas son de carácter proteolico, las enzimas hidrolizan cadenas peptídicas en puntos específicos, se producen y almacenan en el páncreas como zimógenos, durante la digestión estos zimogenos son activados simultáneamente probablemente por la tripsina la cual es un activador común capaz de regular la actividad proteolica. Debido a que la tripsina activa las enzimas proteolíticas, se produce una disminución general de la actividad proteolítica a partir de la acción de los inhibidores de la tripsina (Savage & Morrison, 2003) .El principal efecto toxicológico de los Inhibidores de tripsina, es la hipertrofia pancreática ocasionada por la secreción excesiva de aminoácidos y tripsina, la cual es estimulada por la liberación de colecistoquinina y desencadenada por los TIA, que extraen los aminoácidos esenciales de

otras funciones corporales; en algunos casos esto resulta en la muerte del animal (Popova & Mihaylova, 2019; Savage & Morrison, 2003)

Los efectos de los inhibidores de tripsina varían entre especies, en conejos y ratas se observó una notoria reducción del crecimiento debido a la pérdida de la actividad proteolítica mientras que, en monos, perros y cerdos aparentemente hubo crecimiento normal. Posiblemente la diferencia entre los efectos encontrados, podría deberse a los jugos gástricos los cuales en organismos como los humanos eliminan casi por completo la actividad inhibitoria de la tripsina (Savage & Morrison, 2003).

Actividad de la Ureasa

La ureasa es una enzima proteica que cataliza la hidrolisis de la urea a NH_3 y CO_2 , dicha enzima tiene implicaciones en la agricultura así como en la salud y calidad de los organismos vivos, en la agricultura los microorganismos con actividad de ureasa producen una reducción notable de la eficiencia de la urea que se usa como fertilizante nitrogenado ocasionando más de un 50% de pérdidas por volatilización del nitrógeno, mientras que en la salud la persistencia de la actividad de la ureasa se ha correlacionado con la causa de algunas infecciones y enfermedades ocasionadas por patógenos (Modolo *et al.*, 2015). El aumento de pH ocasionado por la acumulación de NH_3 permite la supervivencia de microorganismos patógenos como *H. pylori* aumentando el riesgo de padecer infecciones urinarias y/o gastrointestinales (Sachs *et al.*, 2005; Stingl *et al.*, 2002)- La ureasa degrada las bases púricas ricas en ácido nucleico hasta formar ácido úrico sin embargo el organismo humano carece de ureasas por lo que solo puede degradarlas hasta ácido úrico, siendo la presencia de ureasa en el citoplasma un factor de virulencia (Berdonces, 1996).

En la industria alimentaria la ureasa se utiliza como indicador en el control de la calidad y factor eficacia del tratamiento térmico al cual son sometidas las harinas, su disminución está relacionada con la eliminación de factores antinutricionales los cuales pueden ser

termoestables (fitato, saponinas, cianógenos, estrógenos) y termolábiles (lectinas, anti-vitaminas e inhibidores de proteasas como tripsina y quimotripsina), la ureasa es afectada al igual que los antinutrientes termolábiles por los tratamientos térmicos de ahí la correlación (Elizalde *et al.*, 2009; Dudley-Cash, 2003; Yubero, 2013) Un grado de inhibición bajo o negativo puede sugerir que el proceso térmico no se realizó adecuadamente mientras que un grado alto está relacionado con la eliminación de los antinutrientes junto con una disminución de la calidad proteica (Martinez & Suárez, 2010)

La ureasa puede llegar a ser toxica para algunos rumiantes, sin embargo, por sí misma, no representa un antinutriente, principalmente se la asociaba con la disminución de los inhibidores de tripsina, pero Moreno & Suárez (2010) informaron que no existe una buena correlación, sin embargo, aun en la actualidad es utilizada como indicador de calidad en muchos alimentos como la soja.

Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, pertenecientes al grupo de los polifenoles, formados por grupos hidroxilo o similares (carboxilo), se encuentran en alimentos y bebidas, las uvas y el té son fuentes ricas en este polifenol (Arts *et al.*, 2000; Griffith, 1991; Smeriglio *et al.*, 2017). Principalmente están presentes en plantas dicotiledóneas y leguminosas, se pueden clasificar como hidrolizables y condensados, los taninos hidrolizables a diferencia de los segundos poseen mayor solubilidad, pueden absorberse en el intestino delgado y se concentran principalmente en hojas y vainas mientras que los taninos condensados o proantocianidinas son estructuralmente más complejos, no susceptibles a la degradación enzimática anaerobia e insolubles en alcohol y solventes inorgánicos normalmente se encuentran en las vacuolas y paredes celulares aunque se ha encontrado altas concentraciones de taninos en casi todas las partes de las plantas (Khanbabae & van Ree, 2001; Lara & Suarez, 2008; Sieniawska & Baj, 2017).

Con frecuencia altas producciones de taninos están asociadas con la presencia de algunas enfermedades por lo que se supone un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros, en presencia de bacterias secretan un polisacárido extracelular que inhibe la formación del complejo tanino-bacteria (McSweeney *et al.*, 2001; Sieniawska & Baj, 2017). Las elevadas cantidades de taninos en frutos inmaduros actúan como un mecanismo de disuasión para herbívoros para no ser comidos antes de alcanzar la madurez (Viña, 2013). Los taninos condensados son los polifenoles más abundantes en la dieta incluyen la catequina, las epigallocatequinas y las epicatequinas y poseen capacidad para formar complejos reversibles con las proteínas (Smeriglio *et al.*, 2017).

Los taninos pertenecen a los flavonoides una de las clases más importantes nutricionalmente, poseen: efecto pigmentante, el termino proantocianidina deriva de las reacciones de oxidación que ocurren en soluciones alcohólicas ácidas produciendo antocianinas (pigmentos de diferente color entre el rojo y el violeta) (Viña, 2013). Variable peso molecular (500 y 3.000 Daltons) y tienen la capacidad de precipitar ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, saponinas y esteroides, teniendo efecto quelante frente a la absorción de minerales como el zinc, hierro y el cobre además interfieren en la absorción de la vitamina B12 y A, debido a esto son considerados como compuestos “antinutricionales” (Berdonces, 1996; Karamač, 2009; Lara & Suarez, 2008). Otros efectos nocivos que pueden resultar del consumo excesivo de taninos incluyen alteración en la excreción de ciertos cationes, daño al revestimiento de la mucosa del tracto gastrointestinal, y aumento en la excreción de proteínas y aminoácidos esenciales (Reddy & Pierson, 1994).

Chung *et al.*, (1998) informaron que cuando se consume entre 0,5-2% de taninos se observa un crecimiento deprimido en los animales, en humanos Ahmad Fuzi *et al.*, (2017) encontraron que el consumo de té puede inhibir la absorción de hierro no hemo cuando es consumido directamente. Sin embargo, la evidencia sugiere que en combinación con otros

bioactivos principalmente ácido ascórbico los efectos inhibitorios no son significantes, echo que explica porque en estudios epidemiológicos los taninos no poseen influencia significativa, Petroski & Minich, (2020) y Kim *et al.*, (2011) informaron que la anemia por deficiencia de hierro no está correlacionada con la ingesta de taninos en la dieta.

En relación de las interacciones con las proteínas los taninos condensados (TC) pueden formar diferentes tipos de enlaces de los cuales las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógenos son los más comunes, estos enlaces son dependientes del pH y reversibles, siendo así que los TC pueden unirse a pH variables y disociarse en pH menores a 3.5 (Min *et al.*, 2003). Los taninos condensados también pueden unirse a enzimas produciendo efectos inhibitorios en las mismas, en particular sobre la ureasa, celulasa, proteasa, alfa-amilasa y beta-glucosidasa, siendo estos dos mecanismos medios que reducen la degradación proteica (McSweeney *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2005).

Existe mayor evidencia de los taninos como potenciales para la salud que como compuestos “antinutricionales”, la ingesta de elagitaninos y catequinas parecen reducir el riesgo de enfermedad coronaria (ECV) mediante el aumento del factor NF-E2 (factor nuclear eritroide), el cual es un factor importante en la desintoxicación del organismo (Hodges & Minich, 2015). Los taninos también poseen propiedades anticancerígenas, desintoxicantes, antioxidantes, además pueden ligarse a las enzimas bacterianas, así como a la pared celular de bacterias y hongos causando lisis e inhibiendo el crecimiento de las mismas siendo antimicrobianos (Lara & Suarez, 2008; Petroski & Minich, 2020). Debido a su capacidad para precipitar alcaloides en caso de intoxicación pueden ser utilizados como tratamiento (Von Poser, 2007).

La astringencia y amargor ocasionados por los compuestos taninos condensados parece ser de mayor importancia para la industria alimentaria, la disminución del consumo de los alimentos en los rumiantes se ha relacionado con la palatabilidad generada por los efectos

astringentes, los taninos ocasionan la pérdida de las propiedades lubricantes mediante la unión con las proteínas de la mucosa y saliva, lo cual afecta la digestión y por consecuencia el crecimiento de los animales (Lara & Suarez, 2008). En el grano de quinua se ha encontrado entre 0,23 a 0,53 g de taninos por cada 100 g, los niveles varían dependiendo la variedad y los métodos de cultivo los valores encontrados son menores a los reportados en el arroz, pero superiores a los encontrados en la cebada (Ruales & Nair, 1993b).

Ácido Fítico

El ácido fítico es un éster dihidrógenofosfato séxtuple de mioinositol, los números 1-6 indican la existencia de seis sitios de unión potenciales, a los cuales les debe el gran potencial quelante pues le confieren la capacidad de absorción de compuestos policatiónicos tales como Cu^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} (Martínez *et al.*, 2002; Raboy, 2003, 2020). Esta presente naturalmente en muchas plantas ricas en fibra, como cereales, legumbres y nueces, sirve como una molécula de almacenamiento de fosfato estando compuesto entre un 60%-90% de fósforo y representa entre 1 a 3% del peso en las semillas, las frutas y verduras de hoja generalmente están desprovistas de fitatos (Martínez *et al.*, 2002; Schlemmer *et al.*, 2009).

En las plantas los fitatos se acumulan durante la maduración de las semillas ayudando a la desintoxicación del fósforo inorgánico, tóxico para las plantas (Yang *et al.*, 2017). Promueven la biosíntesis de almidón manteniendo los niveles de fósforo bajos, que tras la germinación sufren hidrólisis liberando los minerales y el fósforo (Iwai *et al.*, 2012; Oatway *et al.*, 2007). Bregitzer & Raboy, (2006) y Dong *et al.*, (2020) han encontrado que niveles bajos de fitato están asociados con un rendimiento, tasa de germinación y sensibilidad al estrés reducidos. “La 3-fitasa parece ser característica de los microorganismos, mientras que la 6-fitasa se encuentra en granos y semillas de plantas superiores” (Reddy & Pierson, 1994).

Debido a su estructura química que facilita la formación de complejos con proteínas, minerales y biopolímeros, el ácido fítico ha sido considerado como antinutriente, el cuerpo

humano no posee endófitas por lo cual no puede degradar el fitato a diferencia de los rumiantes para quienes el fitato es digerible (Mellanby, 1949; Shitan & Yazaki, 2013; M. S. C. Wilson *et al.*, 2015). A pesar de que los enlaces de ácido fítico son reversibles y pueden reducirse durante el procesamiento de los alimentos (por medio de fitasas presentes en la planta / harina y durante la actividad de la fitasa expresada en el microbiota que reside en el tracto intestinal), su eliminación desde el punto de vista nutricional es una práctica deseable y común (Brouns, 2022; Kumar *et al.*, 2010). (Vats *et al.*, 2007) Informó que el fósforo no absorbido ocasiona influencia en la contaminación ambiental debido a la alta carga de excreción junto con el fósforo no absorbido.

El ácido fítico sin embargo posee también propiedades benéficas para la salud mediante la unión con enzimas y aminoácidos puede actuar como antioxidante un ejemplo de esto es la reducción en la peroxidación lipídica inducida por el hierro (Brouns, 2022). Shitan & Yazaki, (2013) describieron propiedades anticancerígenas, Fe^{3+} y Cu^{2+} median la oxidación y proliferación de células tumorales siendo la actividad quelante benéfica en estos casos, además se refuerza la apoptosis de células cancerosas mediante la unión fuerte de hierro libre de prooxidantes. Se han encontrado también efectos beneficiosos sobre el Parkinson y el Alzheimer (Wang & Guo, 2021). Belmiro *et al.*, (2020) sugiere que la disminución en la ingesta de fitatos no es necesaria en casos de que no exista una posible deficiencia de minerales en la dieta.

En la industria alimentaria Du *et al.*, (2012) encontraron que el jugo de manzana tratado con ácido fítico obtuvo una reducción significativa en la formación de pardeamiento debido a la inhibición del polifenol oxidasa por IP6. Mientras que Ghiretti *et al.*, (1997) informaron un aumento en la vida útil de la carne, IP6 actuó sobre los ácidos grasos insaturados contribuyendo a la preservación de la calidad de la carne mediante la inhibición de la peroxidación lipídica.

Compuestos Funcionales

Fenoles

Los fenoles son el grupo más grande de metabolitos secundarios del reino vegetal, se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático (grupo fenol), el comportamiento ácido de los fenoles se debe al oxígeno (-O) del grupo hidroxilo, el cual está unido fuertemente al anillo fenilo, en tanto el enlace relativamente débil entre el (-H) y el (O -) permite la disociación de un protón (H+) generando un ion fenolato negativo, que puede ser liberado al medio (Bowsher *et al.*, 2008; Viña, 2013). Los fenoles pueden existir en sus unidades monoméricas o como polifenoles compuestos que presentan más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos bencénicos, debido a su diversidad estructural pueden clasificarse de diversas maneras según su estructura se tienen dos grupos: no flavonoides (fenoles no carboxílicos y ácidos fenólicos) y flavonoides unidos por un puente tricarbonado (antocianos, flavanoles y taninos) (Gimeno, 2004; Viña, 2013).

En las plantas sus funciones biológicas son varias: contribuyen al soporte mecánico; las cutinas, suberinas y ligninas forman parte integral de la pared de las estructuras celulares, pueden actuar como pesticidas o antibióticos naturales; los ácidos y resinas fenólicos, así como los taninos son disuasorios de aves y herbívoros debido a que interfieren en el proceso de la digestión y el sabor (Strack, 1997). Funcionan como fitoalexinas o fitotoxinas; las hidroxycumarinas se acumulan en cantidades suficientes como para protegerse de posibles ataques fúngicos o bacterianos, contribuyen como atrayentes de polinizadores; debido a los roles que muchos de los compuestos fenólicos cumplen como aroma, pigmentos y sabores, las antocianinas (responsables del color azul, rojo y violeta) actúan como pigmentos de flores y frutos, el gingerol contribuye al sabor pungente del jengibre, la capsaicina es la causante de la sensación de ardor en los pimientos, y el eugenol es el aromatizante presente en el clavo de olor (Bowsher *et al.*, 2008; Viña, 2013).

Los polifenoles se encuentran en muchos alimentos están presentes en: frutos como uvas, manzanas y nueces, en especies, en verduras (cebollas), y bebidas (vino, té y café), identificándose más de 500 polifenoles en diferentes alimentos (Issaoui *et al.*, 2020; Neveu *et al.*, 2010). Son de importancia en la industria alimentaria, así como en la farmacéutica Scott *et al.*, (2022). informaron que en el 2020 los fenoles y esterres fenólicos representaron el 62% de medicamentos de moléculas pequeñas aprobados.

Tienen especial interés debido a sus propiedades antioxidantes, los fenoles son muy susceptibles a la oxidación, cuando el átomo de H del grupo hidroxilo del fenol sufre escisión, este es rápidamente estabilizado por resonancia del radical feniloxilo, este carácter oxidante permite proteger a otras moléculas potencialmente oxidantes y la estabilización mediante la recuperación del radical hidroxilo le da la capacidad de evitar nuevamente la oxidación de otros elementos (J. Amaya, 2015). También son captadores de radicales libres actuando como quelantes de metales, se han encontrado propiedades beneficiosas frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gimeno, 2004). Por su grado de actividad antioxidante que se correlaciona con el número de grupos hidroxilo, los fenoles son capaces de disminuir las tasas de LDL oxidada y estabilizar las fibras de colágeno de la pared arterial, compuestos fenólicos como las isoflavonas que tienen estructura similar a los estrógenos, pueden unirse a los receptores de estas inhibiendo su acción ayudando en algunos tipos de cáncer estrógeno dependientes como el cáncer de mama y enfermedad cardiovascular (J. Amaya, 2015; Bajetta *et al.*, 2000).

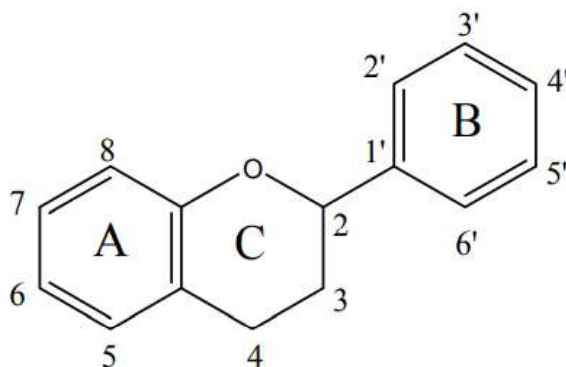
Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios fenólicos de las plantas, con más de 6.000 estructuras diferentes se encuentran generalmente de forma natural como flavonoides o-glicósidos con uno o más grupos hidroxilos unidos a azúcares en las plantas, su esqueleto común está compuesto por dos anillos de seis átomos de carbono unidos por enlaces que

normalmente forman un anillo adicional (Cartaya & Reynaldo, 2001; Panche *et al.*, 2016; Viña, 2013).

Figura 2

Estructura de los compuestos flavonoides



Nota. Tomado de “Compuestos Fenólicos” por S. Viña en *Productos Naturales Vegetales*, (p.91-150), 2013, Argentina, Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/112803>.

Los flavonoides son el grupo más extendido de los compuestos fenólicos, se encuentran ampliamente en frutas, verduras e incluso algunas bebidas (vino), el té junto con las cebollas son las fuentes dietéticas primarias de flavonoles y flavonas, en las plantas los flavonoides cumplen diversas funciones, están presentes como pigmentos (azul, rosado, violeta, amarillo y blanco) de gran parte de las estructuras florales de las plantas angiospermas las cuales a diferencia de los carotenoides tienen afinidad por el agua, a pesar de ser importantes en la coloración floral su existencia no se limita a las flores, encontrándose en varias partes de la planta, también se desempeñan como moléculas de señalización, algunos flavonoides actúan selectivamente en los rizobios inductores de genes de la nodulación y también como compuestos antimicrobianos por ejemplo el cumestrol se acumula luego de la explosión a microorganismos, (Panche *et al.*, 2016; Viña, 2013).

Los flavonoides tienen importantes implicaciones en la salud humana, poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antimutagénicas y antioxidantes, así como fuerte actividad estrogénica (Panche *et al.*, 2016). Hollman *et al.*, (1996) y Oomah & Mazza, (1996) encontraron asociación entre el consumo de flavonoides y la síntesis de la prolina y lisina e inhibición en la síntesis de la prostaglandina (precursora de la inflamación y el dolor), mientras que (Mohammad, 2008) informó la actividad de los flavonoides como inhibidores de XO cataliza la cual cataliza la conversión de hipoxantina en xantina y posteriormente xantina en ácido úrico, el cual en concentraciones altas provoca hiperuricemia asociado con complicaciones como los cálculos.

También se han encontrado propiedades fisiológicas relacionadas con la percepción de la luz Strack, (1997) informó que los flavonoides son capaces de absorber el espectro electromagnético de la radiación UV (200 y 400 nm). En los alimentos los flavonoides son importantes constituyentes contribuyendo a importantes propiedades organolépticas como el sabor (dulce de dihidrochalconas y amargo de ciertas flavanonas) y el color (antocianos). (Cartaya & Reynaldo, 2001). En la industria cosmética se usan como tratamiento en la hiperpigmentación de la piel (Dey, 1990).

Actividad Antioxidante

Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas debido a que en su último orbital poseen un electrón desapareado, estos pueden reaccionar químicamente con ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas lo que ocasiona alteraciones celulares. En los seres vivos los radicales libres provienen principalmente del oxígeno y del nitrógeno y su reacción está asociada a patologías generadas por las alteraciones celulares (Granados *et al.*, 2021; Gülçin, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2014; Palomo *et al.*, 2009). Los antioxidantes naturales han sido de gran interés debido a su efectividad para prevenir el estrés oxidativo, reducir las

especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros oxidantes, ya sea como componentes químicos o como extractos crudos (Zengin *et al.*, 2011).

El organismo humano posee un mecanismo antioxidante inherente de ahí sus funciones biológicas de antienvjecimiento, antimutagénicas y anticancerígenas (Göçer & Gülçin, 2011; Gülçin, 2012). La industria farmacéutica, cosmética y alimenticia ha mostrado elevado interés en los antioxidantes naturales, debido al enorme margen para corregir el desequilibrio, estos han mostrado efectividad en la desactivación y estabilización de los radicales libres, se ha encontrado potencial antioxidante en compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y proantocianidinas (Aidi Wannas *et al.*, 2010; Djeridane *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2012).

Los radicales libres se han asociado efectivamente en varias enfermedades agudas y crónicas como el envejecimiento, la diabetes, la neurodegeneración y la inmunosupresión, la ingestión de antioxidantes está relacionada inversamente con la mortalidad y morbilidad de estos trastornos. También se ha encontrado que las enfermedades hepáticas son agravadas por el daño tisular ocasionado por los radicales libres a través de mecanismos de unión covalente y peroxidación lipídica, siendo los antioxidantes un enfoque terapéutico eficaz para estos daños.(Gülçin, 2012; Harman, 1988; Kuroda *et al.*, 2012; Pandey, G 2011)

Carotenoides

Los carotenoides también conocidos como tetraterpenoides son isoprenoides formados por 40 átomos de carbono y 8 unidades de isopreno, son un componente esencial en los organismos fotosintéticos por sus propiedades fotoprotectoras y antioxidantes, contienen un extenso sistema de dobles enlaces conjugados y pertenecen al grupo de los pigmentos, son de naturaleza hidrófoba encontrándose de forma libre o esterificados con ácidos grasos orgánicos, están sujetos a degradación oxidativa siendo sensibles a temperatura elevada, presencia de oxígeno, luz y ácido (Langi *et al.*, 2018; Lohr, 2009; Pradhan *et al.*, 2022; Saini *et al.*, 2015). Se

clasifican en carotenos que contienen solo hidrogeno y carbono y xantofilas que adicionalmente contienen oxigeno (criptoxantina, astaxantina) (Milani *et al.*, 2017)

Debido a la presencia de enlaces simples y dobles alterados poseen varios isómeros, las propiedades y funciones de los carotenoides están asociados con su estructura molecular, la conjugación de doble enlace confiere las propiedades de reactividad química y fotoquímicas hacia las moléculas, incluidos los radicales libres (Maoka, 2020; Saini *et al.*, 2015). El cromóforo de polieno conjugado es el que determina las propiedades de absorción y captación de luz, este absorbe las longitudes de onda de la luz visible (entre 400 y 600 nm) y confiere las características de color y acciones fotoprotectoras a los carotenoides (Amaya, E 2014; Kiokias *et al.*, 2013).

Los carotenoides no pueden ser sintetizados por animales ni humanos siendo la dieta su única fuente de adquisición, las verduras y las frutas son la principal fuente dietética de estos compuestos, frutos amarillos y naranjas son ricos en β -caroteno y α -caroteno, la mandarina es fuente de α -criptoxantina, el tomate de licopeno y verduras de tonalidad verde oscura aportan luteína (Rao & Rao, 2007; Saini *et al.*, 2015). En la naturaleza se han identificado más de 600 carotenoides, pero en una dieta común se establece que tan solo se encuentran presentes alrededor de 40, principalmente se concentran en los tejidos grasos sin embargo se ha identificado en casi todas las partes de las plantas incluidas raíces, hojas y principalmente en flores dentro de los cromoplastos (Fernández-García *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015).

En las plantas cumplen funciones biológicas siendo necesarios para el desarrollo de las mismas, pero también son responsables de la enorme cantidad de colores (rojo, amarillo, naranja y sus derivados) tanto en flores como en hojas, así como de proporcionar aromas, generalmente están presentes en forma de éster o diéster; por lo tanto, para su utilización se necesita saponificación.

En la salud los carotenoides han demostrado actuar frente a enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, oftálmicas, diabetes ser potentes antioxidantes, anticancerígenos y actuar como refuerzo de la inmunidad. Los carotenoides disminuyen el estrés oxidativo al interferir con los radicales libres quienes cumplen un papel importante en los procesos de inflamación, patogenia y enfermedades relacionadas con el estrés como los trastornos neurodegenerativos, cardiovasculares y oftálmicos (Zaid & Wani, 2019). Inhiben los radicales libres neutralizándolos, uniéndose a ellos o mediante la donación de los átomos de hidrogeno (H) y remplazo de electrones gracias a sus dobles enlaces (Cicero & Colletti, 2017).

En el cáncer (Sever & Brugge, 2015) encontraron que los carotenoides atenúan las vías de señalización del cáncer desregulando la transcripción de genes asociados como la proteína quinasa B (PKB o Akt) y la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K), mientras que (Saini *et al.*, 2020) informaron que las caspasas desencadenan la apoptosis celular de las células cancerígenas, al parecer los carotenoides detienen el ciclo celular al regular negativamente la expresión de ciclina (CDK4, CDK6, D1,D2) (Rowles & Erdman, 2020) y Mantienen el equilibrio del estrés oxidativo actuando como antioxidantes para las células normales y como prooxidantes selectivos de las células cancerosas (Vijay *et al.*, 2018).

Los estudios clínicos sugieren que el consumo de carotenoides está relacionado con un menor riesgo de enfermedades oculares, las cataratas, el glaucoma, la DMRE son unos de los problemas oculares más comunes del envejecimiento estos pueden conducir a la pérdida parcial o total de la visión (London & Beezhold, 2015). El estrés oxidativo es la razón principal detrás de estas anomalías siendo el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los carotenoides uno de los aspectos de mayor interés (Fernández de la Cámara *et al.*, 2013). La luteína y la zeaxantina son carotenoides maculares que neutralizan y protegen las células fotorreceptoras de las reacciones de oxidación (Bernstein *et al.*, 2016).

Capítulo III: Materiales y métodos

Materiales

Muestras

Cepa microbiana y condición de cultivo

Rhizopus var. oligosporus se obtuvo de estudios anteriores realizados en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIAP el cual se encontraba liofilizado. Se cultivó en medio PDA (agar papa dextrosa) por un lapso de 4 días según la metodología realizada por Park *et al.* (2016) a temperatura de 29°C, hasta la formación de esporas en concentración de 50mg/200ul.

Quinua

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Santa Catalina (INIAP-EESC) mantiene un banco de germoplasma en el cual preserva los distintos genotipos de quinua: Las variedades Chimborazo, INIAP-Tunkahuan e INIAP-LPQE4 fueron donados por la institución. La variedad INIAP-Tunkahuan es una variedad mejorada y comercial. El genotipo Chimborazo es propio de la provincia de Chimborazo, donde se ubica su nicho de producción y procesamiento para el expendio como grano desaponificado, mientras que INIAP-LPQE4 es una línea promisoría en proceso de liberación y registro en el MAG.

Diseño Experimental

Diseño experimental y análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un diseño cruzado AXB en arreglo factorial 3x3 con tres observaciones. El análisis estadístico de varianzas ANOVA, se plantea según lo indicado en la Tabla 2.

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor medio \pm la desviación estándar. Para analizar los cambios tras la desaponificación y fermentación de

la quinua, el conjunto de datos se sometió a una prueba de tukey a nivel de significancia de $p < 0,05$. También se aplicó la correlación de pearson, los softwares estadísticos utilizados fueron Infostat versión 2008, statgraphics 18.1.08 y el entorno de R.

Análisis estadístico

Después de verificar la normalidad de los datos experimentales, se realizó un ANOVA, como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1

Esquema del análisis de varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	26
Genotipo (Factor A)	2
Estado (Factor B)	2
Interacción (AXB)	4
Bloques	2
Error Experimental	16

Factores de estudio

En la Tabla 2 se muestra los factores de estudio, se utilizaron 3 variedades y 3 estados de quinua.

Tabla 2

Factores en estudio para la elaboración de quinua

Factor	Descripción	Código	Descripción
A	Genotipo	A1	Chimborazo
		A2	Tunkahuan
		A3	LPQE4
B	Estado	B1	Amarga
		B2	Desaponificada
		B3	Fermentada

Tratamientos

En la Tabla 3, se detalla los tratamientos resultantes de la combinación de los factores de estudio.

Tabla 3

Tratamientos para la fermentación en estado sólido de la quinua

Tratamiento	Descripción
A1B1	Chimborazo, Amarga
A1B2	Chimborazo, Desaponificada
A1B3	Chimborazo, Fermentada
A2B1	Tunkahuan, Amarga
A2B2	Tunkahuan, Desaponificada
A2B3	Tunkahuan, Fermentada
A3B1	LPQE4, Amarga
A3B2	LPQE4, Desaponificada
A3B3	LPQE4, Fermentada

Metodología

Desaponificación de quinua

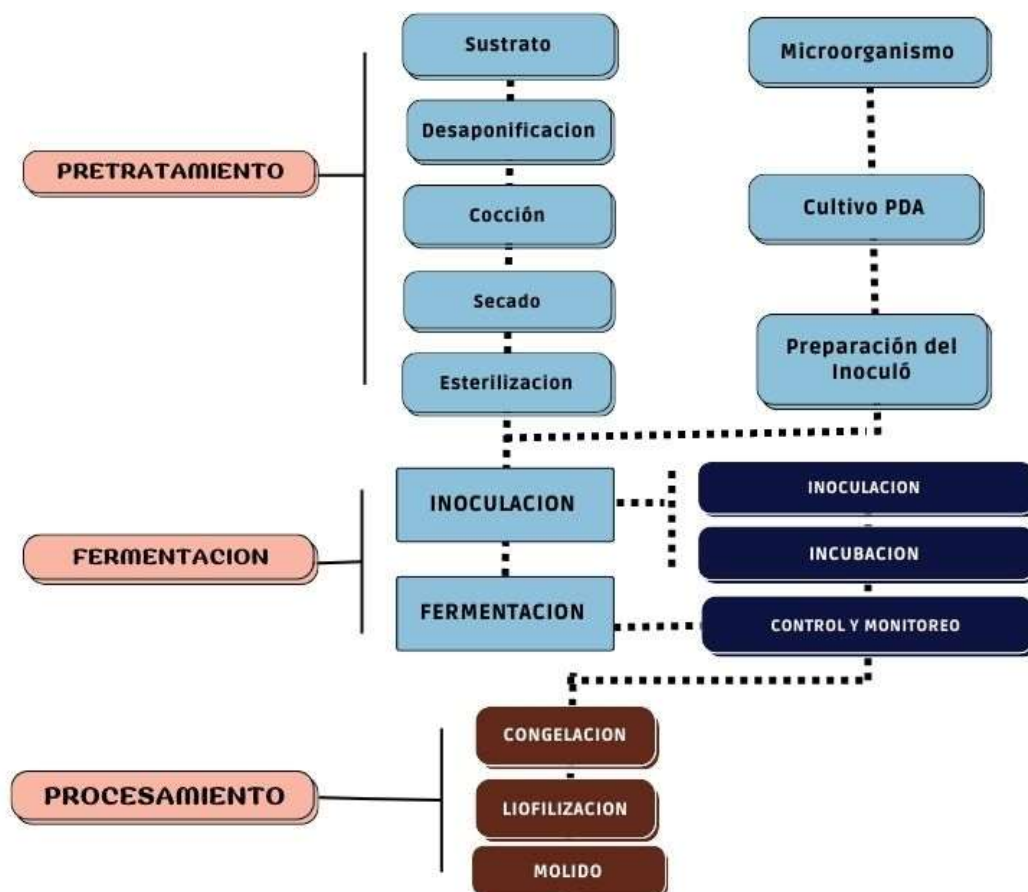
El proceso de desamargado de la quinua se realizó mecánicamente, los tres genotipos de quinua fueron lavados con agua potable fría, durante el proceso las muestras se-frotan constantemente con las manos, este procedimiento se repitió hasta obtener un agua residual medianamente clara. Posteriormente la quinua fue secada en una estufa a 60°C durante toda la noche, este proceso es importante para evitar la germinación del grano.

Fermentación quinua

El proceso de fermentación de la quinua fue realizado conforme indica la Figura 3.

Figura 3

Proceso de fermentación de la quinua



Preparación de quinua

El grano de quinua previamente desaponificado, se pre-coció (300g/L de H_2O) durante 10 minutos (contados desde el hervor), la línea LPQE4 utilizó un tiempo de pre-cocción de 15 minutos debido a la dureza del grano, una vez obtenido el grano precocido se coló el agua restante y se secó por 30 min a 65°C, el tiempo de secado fue estandarizado conforme a la metodología (determinación de humedad). La quinua (60% humedad) fue empacada en bolsas plásticas (100 g en cada bolsa) y esterilizada en una autoclave (121 °C por 10 minutos).

Preparación del inóculo

Los inóculos de *Rhizopus ssp.* se prepararon a partir del micelio formado previamente tras el cultivo en medio PDA. Con la ayuda de un asa esteril se tomó una masa de esporas, con ayuda de un asa de cultivo la masa fúngica formada conteniendo 10^5 unidades formadoras de colonias g^{-1} (UFC g^{-1} sustrato preparado) y se mezcló hasta formar una suspensión homogénea.

Fermentación

La fermentación fue realizada según la metodología descrita por (Villacrés *et al.*, 2006) con modificaciones, en condiciones de asepsia bajo una cámara de flujo laminar, 1 ml el inóculo preparado fue adicionado a 100 g de quinua cocina y empacada en bolsas, se mezcló el conjunto. A fin de permitir el intercambio gaseoso se realizaron pequeños orificios alrededor de las fundas plásticas. Finalmente, la quinua inoculada fue colocada en una inculadora a 29 °C durante 24 horas, la presencia de hifas blanquecinas en toda la quinua indico la finalización de la fermentación, un color de fermento verde indica posible contaminación o exceso de fermentación. En el gráfico 3 se presenta el esquema de la fermentación

Tratamiento de la masa fermentada

Una vez que se logró el crecimiento de *R. oligosporus*, la quinua se retiró de la cámara de fermentación y se congeló a -20 °C/24h, posteriormente se liofilizó en un equipo Labconco, durante 5 días, las muestras liofilizadas fueron molidas en un molino Retsch ultra ZM 200 a un tamaño de partícula de 150 μm y se almacenaron a 4°C, hasta la realización de los análisis.

Determinación de componentes nutricionales

Humedad

Para la determinación de humedad se utilizó el método 930.15 (AOAC, 1996) Adaptado en el departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

Principio

Este es un método directo y gravimétrico se basa en la pérdida de peso por medio del secado en estufa, determina la cantidad de agua presente en una muestra, los resultados se expresan en base seca o porcentaje de humedad.

Procedimiento

-Los recipientes se lavaron y secaron en una estufa por 5 horas a 105 °C, una vez secos se colocaron en un desecador y se pesó cuando estaban (P_c).

-Se pesó 2 g de muestra molida de quinua, se colocó en los crisoles (P_{cmh}) y se llevó a una estufa por toda la noche o 16 horas,

-Pasado el lapso de tiempo se colocó la cápsula o crisol en un desecador y se dejó enfriar, finalmente se pesó la cápsula con el residuo (P_{cms}).

-Se determinó el porcentaje de humedad mediante la siguiente formula:

Cálculos:

$$\%H = \frac{P_{cmh} - P_{cms}}{P_{cmh} - P_c} \times 100$$

Donde:

%H= Humedad expresada en porcentaje.

P_c= Peso del crisol o recipiente.

P_{cmh}= Muestra húmeda más recipiente.

P_{cms}= Muestra seca más recipiente.

Cenizas

La determinación de cenizas se realizó en base al método A.O.A.C. (1984) Adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad INIAP.

Principio

El valor de ceniza se realiza mediante la determinación del material inorgánico, tras la calcinación se elimina la materia orgánica y esta es medida por diferencia de peso mediante gravimetría, el resultado se expresa en porcentaje.

Procedimiento

-Para la determinación de la humedad es necesario obtener el recipiente a masa constante: Se lavó y seco los recipientes una estufa por 5 horas a 105 °C, se colocó en un desecador y se pesó una vez frío con aproximación de milésimas.

-Se tomó 2 g de muestra molida de quinua y se colocó en los recipientes, se llevó a una mufla a 600 °C por 6 horas, hasta obtener una muestra homogénea de ceniza color grisáceo o blanco.

-Se colocó en un desecador y se pesó inmediatamente en cuanto se alcanzó la temperatura ambiente para evitar interferencias de humedad.

- El porcentaje de humedad se determinó mediante la presente ecuación, cada ensayo se realizó por triplicado:

$$\%C = \frac{P_{cz} - P_c}{P_m} \times 100$$

%C= Porcentaje de cenizas

P_c=Peso de Crisol

P_{cz}= Peso del recipiente más ceniza.

Grasa

Principio

Los enlaces de los lípidos cuando están en presencia de disolventes no polares, pueden hidrolizarse o separarse debido a la gran afinidad que presentan las grasas por estos compuestos, formando lípidos libres. Esta es una extracción sólido-líquido.

Procedimiento

Fibra

Para la determinación del contenido de fibra cruda se utilizó el método oficial AOAC/INEN 522 adaptado en el Departamento de Nutrición y Calidad INIAP.

Principio

La harina de quinua se sometió a procesos de digestión con ácidos y álcalis (simulan las condiciones de digestión), todas aquellas sustancias no nitrogenadas, libres de grasa (menos 20%) y de humedad (menos del 20%), que no se disuelvan hirviendo, constituyen el contenido de fibra bruta. Se determina por gravimetría y corresponde al residuo después de incinerar la muestra.

Los valores de FC son generalmente 3 a 5 veces menores que los valores de fibra dietética (Grossi *et al.*, 2015).

Procedimiento:

-Se pesó 2 g de quinua y se añadió 200 ml de ácido sulfúrico (7/1000), se digirió por 30 minutos a 100 °C, posteriormente se agregó 20 ml de Na (OH) al 22% y se digirió por 30 minutos más, disminuyendo la temperatura.

-Se filtró al vacío con ayuda de un crisol al que se le colocó fondo de lana de vidrio (hasta la mitad), se lavó con agua destilada hirviendo, 100 ml de ácido sulfúrico (7/1000), hexano 20 ml y nuevamente agua destilada hirviendo.

-Se secó en una estufa a 105 °C durante 8 horas para después calcinar en una mufla por 4 horas a 600 °C.

Cálculos

$$\%FC = \frac{P_{cf} - P_{cc}}{P_m} \times 10$$

Fc= Porcentaje de fibra cruda

Pcf=Peso del crisol seco

Pcc= Peso del crisol calcinado

Pm= Peso de la muestra

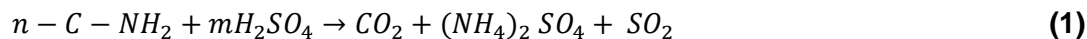
Proteína

Principio:

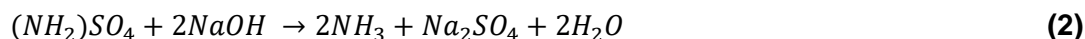
Esta técnica determina el contenido de nitrógeno inorgánico, las proteínas y los compuestos orgánicos son digeridos mediante una mezcla con ácido sulfúrico y catalizadores, el nitrógeno orgánico se transforma en sulfato de amonio que es neutralizado con una base y posteriormente destilado en una solución de ácido bórico, formando aniones borato que al titularse con un ácido comúnmente HCl proporciona la cantidad de nitrógeno presente en la muestra. El resultado del análisis determina la cantidad de proteína cruda debido a que existen interferencias con componentes nitrogenados no proteicos.

Reacciones

Digestión



Neutralización y Destilación



Titulación



Procedimiento:

La determinación del contenido de proteína se realizó conforme al método (A.O.A.C, 1980) con modificaciones en el Departamento de Nutrición y Calidad INIAP.

Digestión:

- Se pesó 0.15 g de harina de quinua en un matraz micro-Kjeldahl y se añadió 2.5 ml de H_2SO_4 con 1 g de catalizador.
- La muestra fue sometida a digestión hasta la formación de una coloración verde esmeralda, por 30 minutos a 70°C y 60 minutos a 100 °C.
- Se enfrió y añadió 7 ml de agua destilada.

Destilación

- Se colocó la muestra en la cámara de ebullición, con 5 ml de agua destilada se enjuago el matraz micro-Kjeldahl y vertió el residuo.
- En un frasco Erlenmeyer se colocó 10 ml de ácido bórico junto con dos gotas de indicador, esta solución se utilizó para recoger el residuo de la destilación

- El NaOH fue vertido en la unidad de destilación y cuando se obtuvo 40 ml de solución se dio por terminada la destilación

Titulación

- Las muestras fueron tituladas con HCL 0.1 N un color rosa pálido indico el punto de viraje.

Determinación de Antinutrientes

Saponinas

El análisis de saponinas se realizó conforme a la metodología descrita por Hur *et al.*, (2018) con modificaciones.

-Se agito durante una hora 1 g de muestra en un matraz con 20 ml de Etanol 50%.

- Se filtró y aforo a 25 ml con la solución extractante (etanol 50%) y se tomó 500 ul del extracto en un tubo con 2 ml de la mezcla de reactivos (ácido acético glacial/ácido sulfúrico 1:1 v/v),

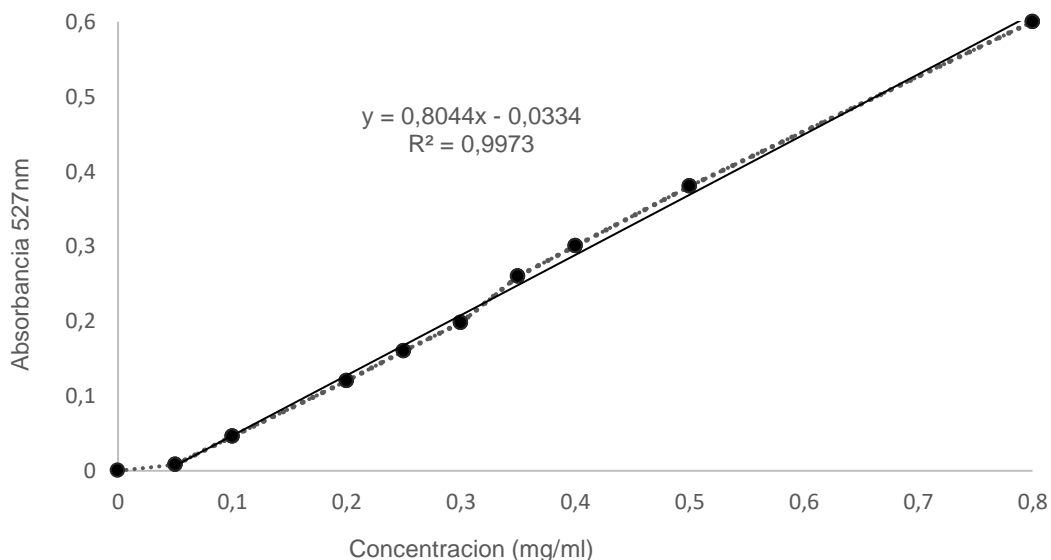
- Para el blanco de reactivo se utilizó ácido acético glacial y la mezcla de reactivos (ácido acético glacial/ácido sulfúrico 1:1 v/v) en las mismas cantidades.

- Se mezcló vigorosamente en un vortex y se dejó en baño maría durante 30 minutos para el desarrollo de color. Se midió la absorbancia a 527 nm (espectrómetro UV-vis: UV-3100PC, VWR International LLC., Visalia, CA), los ensayos se realizaron por triplicado.

El contenido total de saponina se obtuvo comparando con la curva estándar de ácido oleanólico presentada en la figura 3 (100 µg/mL a 1000 µg/mL) los resultados se expresaron como mg/mL de ácido oleanólico equivalente.

Figura 4

Curva de calibración de Saponina



Nota. La figura representa la curva de calibración de ácido oleanólico, la curva cumple con la ley de Beer y posee una tendencia lineal, la absorbancia está directamente relacionada con la concentración, siendo el ajuste lineal positivo de R^2 de 0,9947

Actividad de la Ureasa

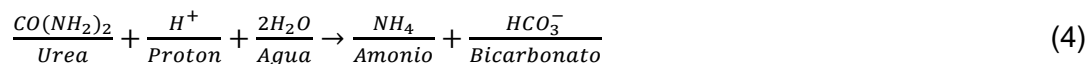
Para la determinación de la ureasa en la harina de quinua se determinó conforme al método (AACC, 2000).

Principio

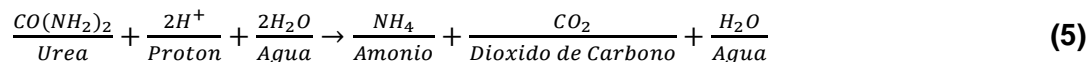
La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, en el proceso se genera una molécula de amoníaco y carbonato. El amoníaco es protonado y aumenta el pH, el aumento de pH se relaciona directamente con la actividad de la ureasa (Zimmer, 2012).

Conforme a Zambelli *et al.*, (2014) la reacción de la hidrólisis de la urea es:

A pH mayor de 6.3 la hidrólisis de la urea es:



A pH menor de 6.2 la hidrolisis de la urea es:



Procedimiento:

-Se peso 0,2 g de harina de quinua en un tubo de ensayo junto con 10 ml de solución de urea (15 g de urea en 500 ml de buffer fosfato a pH 7, se puede utilizar tolueno como conservante) y se mezcló, para el blanco se utilizó 0,2 g de harina de quinua con 10 ml de la solución buffer fosfato 0,05 M (3,404 g de KH_2PO_4 en 100 ml de H_2O destilada y 4,355 g de K_2HPO_4 en 100 ml de H_2O destilada; aforados a 1000 ml y pH ajustado a 7).

-Para la digestión, se incubo en un baño maría durante 30 minutos a 30 °C en constante agitación cada 5 minutos.

-Trascurrido el tiempo de digestión se determinó el pH de las muestras a los 5 minutos de retirar las muestras.

Cálculos:

El incremento de pH es proporcional al aumento de la actividad de la ureasa:

$$IAU (\text{Delta pH}) = \text{pH muestra} - \text{pH blanco}$$

Inhibidores de Tripsina

Para la determinación de los inhibidores de tripsina se siguió el método (Hamerstrand *et al.*, 1981; Kakade *et al.*, 1984) con modificaciones.

Principio

Este análisis se basa en el método AACCC en el cual se mide la capacidad de los inhibidores para reducir la actividad de la tripsina mediante la formación de un complejo en sustrato sintético BAPA (Clorhidrato de p-nitroanilida de α -benzoil-DL-arginina). En la hidrólisis del BAPA se produce la liberación de un cromóforo (p-nitroanilina) el cual es absorbido en la región azul a 410 nm (Arnon, 1965, como se citó en Buttazzoni, 1981). Esta técnica expresa la actividad de inhibidores de tripsina en TIU mg/g.

Procedimiento:

Previamente se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución Tris-Buffer: 0,59 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ junto con 1,21 g de Tris (hidroximetil) aminometano aforado a 200 ml a pH 8,2.
- Solución de BAPA: 0,080 g de BAPA previamente disuelto en 2 mL de DMSO (Dimetil sulfóxido) y posteriormente aforado a 200 ml con la solución de Tris-Buffer (previamente precalentado a 37 °C). Solución es estable 4 horas.
- Solución Tripsina: 0.0040 g de tripsina en 200 ml de HCL (0,001 N). Se conserva en refrigeración de 5-10 °C.

-Se desengraso la muestra conforme el procedimiento detallado para la determinación de grasa y se pesó 1 g de muestra en un Erlenmeyer junto con 50 ml de NaOH (pH entre 8,4-10) manteniéndose en agitación constante durante 3 horas.

- Se filtro las muestras y siguió conforme el siguiente procedimiento:

Tabla 4*Tabla de procedimiento inhibidores de tripsina*

Se pipeteó en tubos de 10 ml	Estándar	Blanco de muestra	Muestra
L. BAPA	0	0	0
Muestra	0	2ml	2ml
Agua	2 ml	0	0
Ac. Acético	0	0	0
S. Tripsina	2 ml	0	2 ml

- Se mezcló el contenido en los tubos con ayuda de un vortex y se colocó en baño maría por 10 minutos a 37 °C.
- Posterior al tiempo de incubación, se colocó 5 ml de solución BAPA a todos los tubos y se incubó en baño maría por 10 minutos a 37 °C.
- Terminada la incubación se agregó:

Tabla 5*Tabla de procedimiento inhibidores de tripsina*

	Estándar	Blanco de muestra	Muestra
Ac Acético 30%	1 ml	1 ml	1 ml
S. Tripsina	0	2 ml	0

- Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Scientific Evolution 201 a 410 nm frente a la muestra del blanco.

Cálculos:

$$TI \frac{mg}{g} \text{ de muestra} = \frac{Ab_e - (Abs_m - Abs_b)}{0,019 * 1000} \times FD$$

Abs_m = Absorbancia de la muestra

Abs_b = Absorbancia del blanco

Ab_e = Absorbancia del estándar

0,019 = Es una constante se estima que 1 ug de tripsina pura posee actividad equivalente de 0,019 unidades de absorbancia.

FD = Factor de dilución $\left(\frac{50 \text{ ml de Solucion}}{2 \text{ ml de muestra}} = 25ml\right)$

-Para este procedimiento debido a la coloración de la muestra se utilizó un factor de dilución adicional, la solución de muestra final previo a la lectura espectrofotométrica fue diluida en un factor de 1/10 $\left(\frac{1 \text{ ml muestra}}{10 \text{ ml agua destilada}}\right)$.

Taninos

Los taninos se determinaron utilizando el método A.O.A.C., (1964) 952.03 con modificaciones realizadas en el departamento de Nutrición y Calidad INIAP Santa Catalina.

Procedimiento:

-Previo a la determinación de taninos se prepararon los reactivos:

Solución Folin-Denis: Se calentó por 2 horas: wolframato de sodio deshidratado (100 g); ácido fosfomolibdico (20 g) y ácido fosfórico (50 ml), en 750 mL (H_2O destilada). Se aforo en 1000 ml.

-Solución de carbonato de sodio saturado: Se colocó carbonato de sodio anhidro (35 g) en 100 ml de agua destilada a 70-80 °C y se dejó precipitar por 12 horas, posteriormente se

colocó 1-2 g de cristales de carbonato de sodio decahidratado. Una vez que se forme la cristalización se filtró y se guardó en oscuridad.

-Se desengraso 1g de muestra conforme al procedimiento antes descrito para determinar grasa y se colocó en ebullición con 100 ml de H_2O destilada. Se filtro y aforo a 100 ml.

En balones de 100ml, se añadió 5 ml del extracto, 2 ml de reactivo de Folin-Denis y 5 ml de la solución de carbonato, para la solución blanco en vez del extracto se tomó 5 ml de H_2O destilada junto con los demás reactivos. Finalmente se aforó a 100 ml con H_2O destilada.

Se dejó en oscuridad por 30 minutos para que ocurra la reacción, una vez trascurrido el tiempo se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Scientific Evolution 201 a 680 nm.

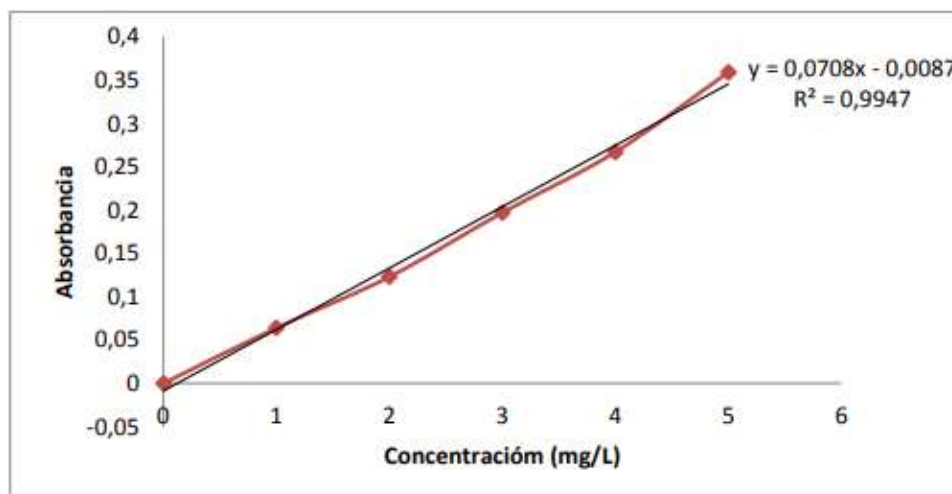
Curva de calibración:

- Se preparo soluciones de 10 ml a partir de una solución madre de ácido tánico (100 pm), en concentraciones de 1,2,3,4 y 5 ppm.
- A cada estándar se añadió 0,4 ml de reactivo de Folin-Denis junto con 1 ml de la solución de carbonato y se aforo a 10 ml H_2O destilada. Se leyó a 680 nm.

Nota. tomado de Fernandez E. (2017).

Figura 5

Curva de calibración de taninos

**Cálculos:**

Los resultados se expresan como ácido tánico conforme a la curva de calibración y en base a la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{mg taninos}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{LR \times V \times FD}{Pm \times 1000} \times 100$$

LR= Lectura de regresión (mg/L)

V= Volumen final de aforo (ml)

FD= Factor de dilución

Pm= Peso de la muestra (g)

1000= Conversión de L a ml

100= Conversión mg/g a mg/100g

Ácido Fítico

El ácido fítico se determinó conforme al Kit K-PHYT Megazyme International Limited, 2007. Phytic acid (phytate)/total phosphorus.

Principio

Procedimiento

- Los reactivos contenidos en Megazyme fueron estabilizados a temperatura ambiente:
Buffer Acetato de Sodio (24 ml, 200 mM; pH 5,5) y Azida de sodio (0,02% p/v).
Suspensión de Fitasa (1,2 ml, 12.000 U/ml)
Buffer de glicina (25 ml, 400 mM, pH 10,4) mas $MgCl_2$ (4 mM), $ZnSO_4$ (0,4 mM) y azida de sodio (0,02% p/v).
Suspensión de fosfatasa alcalina (1,2 ml, 50 ug/ml) y azida de sodio (0,02% p/v).
- Se peso 1 g de muestra junto con 20 ml de ácido clorhídrico (0,66 M) y se agito mecánicamente durante toda la noche a temperatura ambiente (se debe agitar por lo menos 3 horas).
- Se centrifugo 1 ml del extracto a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió 0,5 ml del sobrenadante a tubos de 1,5 ml y se neutralizó con 0,5 ml de NaOH (0,75 M).
- El extracto neutralizado fue utilizado en la reacción de desfosforilación enzimática conforme a:

Tabla 6

Determinación de ácido fítico

Se pipeteo en tubos 1,5 ml	Fósforo libre (ml)	Fósforo total (ml)
Agua destilada	0,63	0,6
Solución I (Buffer de acetato de sodio)	0,20	0,2
Muestra Neutralizada	0,05	0,05
Suspensión 2 (fitasa)	-	0,02

-Se mezcló con vortex y se incubó en baño maría por 10 minutos a 40 °C

Tabla 7

Determinación de ácido fítico

Se pipeteo en tubos 1,5 ml	Fósforo libre (ml)	Fósforo total (ml)
Agua destilada	0,02	-
Solución 2 (Buffer de glicina)	0,20	0,2
Suspensión 4 (ALP)	-	0,02

- Se mezcló con vortex y se incubó en baño maría por 15 minutos a 40 °C
posteriormente se detuvo la reacción añadiendo ácido tricloroacético (50 % p/v). una vez terminada la reacción se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se prosiguió con la determinación colorimétrica.

-Para la determinación colorimétrica se añadió 1 ml de estándar de fósforo y 0,5 ml del reactivo de color. Se mezcló e incubó durante 1 hora a 40 °C, trascurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia a 655 nm (la lectura debe hacerse antes de las 3 horas).

Curva de calibración

Para la determinación de fósforo se preparó una curva de calibración, se prepararon estándares de fósforo conforme a la tabla 8:

Tabla 8

Determinación de ácido fítico

Se pipeteo en tubos de 13 ml	STD	STD	STD 2	STD 3	STD 4
<i>P</i> (ug)	0	0,5	2,5	5,0	7,5
Agua Destilada (ml)	5	4,95	4,75	4,5	4,25
Estándar de Fosforó (ml)	-	0,05	0,25	0,5	0,75
Volumen total (ml)	5	5	5	5	5

Se calculó el valor promedio de M y este se usó para calcular el contenido de fósforo en la sección de cálculos.

$$\text{Promedio (M)} = \frac{\frac{(STD1 - STD0)}{P (ug)} \dots + \dots \frac{(STD4 - STD0)}{P (ug)}}{4}$$

Cálculos

Para determinación del contenido de ácido fítico, se restó la absorbancia del fósforo libre al fósforo total (FT-FL) para obtener $\Delta A_{fosforo}$.

La concentración de fósforo se calculó conforme a:

$$c (g/100g) = \frac{\text{promedio M} \times 20 \times F}{10.000 \times 1 \times v} \times \Delta A_{fosforo}$$

Donde:

Promedio de M= el valor promedio de M

20=volumen del extracto de la muestra (ml)

F=Factor de dilución

$\Delta A_{fosforo}$ = Cambio de absorbancia de la muestra

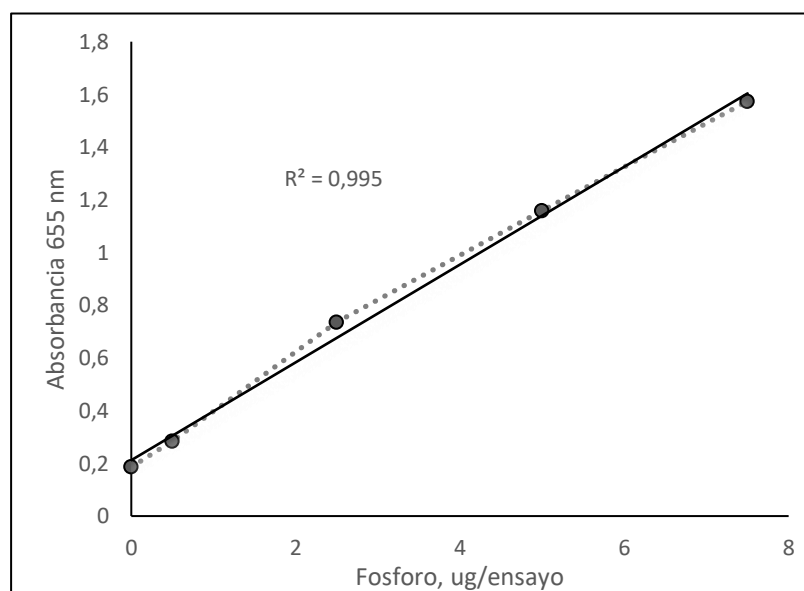
10.000= Conversión de ug/g a g/100g

1= peso de la muestra (g)

V=volumen de la muestra (usada en la determinación colorimétrica)

Figura 6

Curva de calibración de ácido fítico



Nota. La curva de calibración demuestra la linealidad de la determinación colorimétrica de fósforo como se describe en el procedimiento K-PHYT. Los estándares de fósforo fueron analizados con 1 cm de trayectoria de luz.

Componentes Funcionales

Fenoles

Principio

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por colorimetría mediante el empleo de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico o reactivo Folin Ciocalteu, el cual reduce los compuestos fenólicos a óxidos cromógenos (azul intenso). La absorción que se produce

presenta una abs máxima es de 765nm y es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos.(Waterhouse, 2002).

Procedimiento

Extracción

-Se peso 0,8 g de harina (el peso depende de la coloración de la muestra), y se añadió 10 ml de metanol 70%, se homogenizó por 10 segundos en vortex y se agito por otros 15 minutos. (primera extracción)

-Se filtro el extracto (primera extracción) y se añadió 10 ml de metanol 70%, se homogenizó en vortex y colocó a 80 °C en baño maría por 5 min (segunda extracción).

-Se filtro los dos extractos y se aforo a 25 ml con metanol 70%.

Determinación CFT

-En un tubo de ensayo se colocó: 400 ul del extracto de muestra junto con 8 ml de agua destilada y 500 ul de reactivo de Folin Ciocalteau 2N, se dejó reposar en oscuridad por 6 min.

-Para el blanco se incubó los demás reactivos junto con agua destilada en vez del extracto de muestra.

-Se añadió 1500 ul de carbonato de sodio saturado (descrito en la sección de taninos), se mezcló e incubo por 30 min a 40 °C.

-Se leyó a 765 nm y se calculó el contenido de compuestos fenólicos en base a la curva estándar en mg acido gálico/100g de muestra.

Curva estándar para CFT

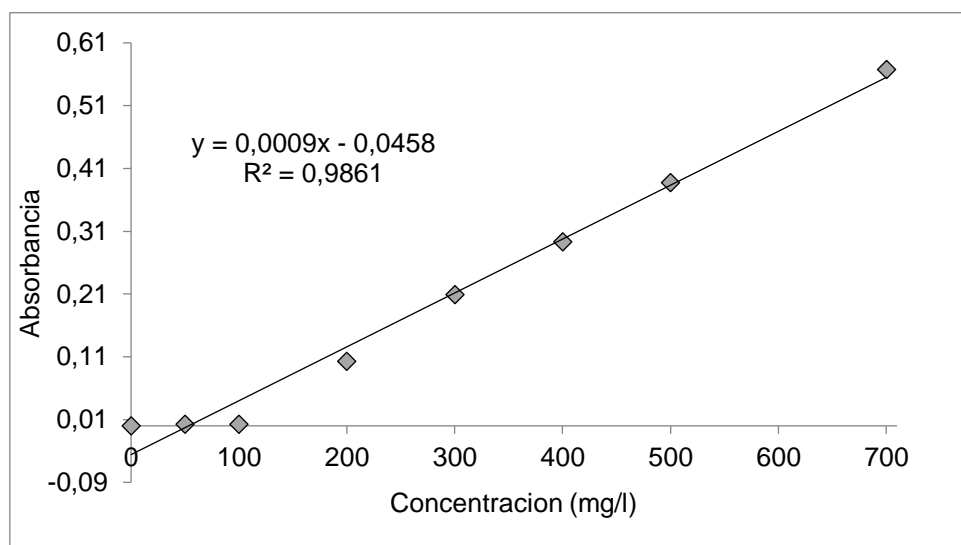
Se preparó un stock de ácido gálico (5000 mg/l) y a partir de este se prepararon soluciones estándares de concentraciones 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 700 (mg/l) para ello se

tomó alícuotas de 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3;5 (ml) del stock y se aforo con agua destilada a 25 ml.

Se añadió 1500 ul de carbonato de sodio saturado y se mezcló e incubo por 30 minutos a 40 °C y leyó a 765 nm.

Figura 7

Curva estándar para CFT



Cálculos

$$F \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} = \frac{LR \times v \times FD * 100}{p * 1000}$$

F= Compuestos fenólicos expresados en mg ácido gálico por 100g de muestra

LR= Lectura de regresión (mg/l)

v= volumen de aforo ($\frac{25}{0,4} \text{ ml}$)

p= peso de la muestra (g)

FD= Factor de dilución ($\frac{1}{10}$)

100= Factor de conversión de mg/g a mg/100g

1000= Factor de conversión de L a ml

Flavonoides

Extracción

-Se peso 1 g de muestra molida de quinua (el peso de la muestra depende del color de las muestras 0,7 para muestras moradas y 1 g para muestras blancas o crema) y se añadió 15 ml de metanol 80%, se homogenizo y agitó en oscuridad durante 10 min. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, y guardo el sobrenadante en un balón de 25 ml (primera extracción).

-Al precipitado de la centrifugación se añadió 10 ml de metanol 80%, y se repitió el proceso anterior (segunda extracción).

-Se junto los sobrenadantes de la primera y segunda extracción y se aforo a 25 ml con la solución extractiva (metanol 80%).

Cuantificación

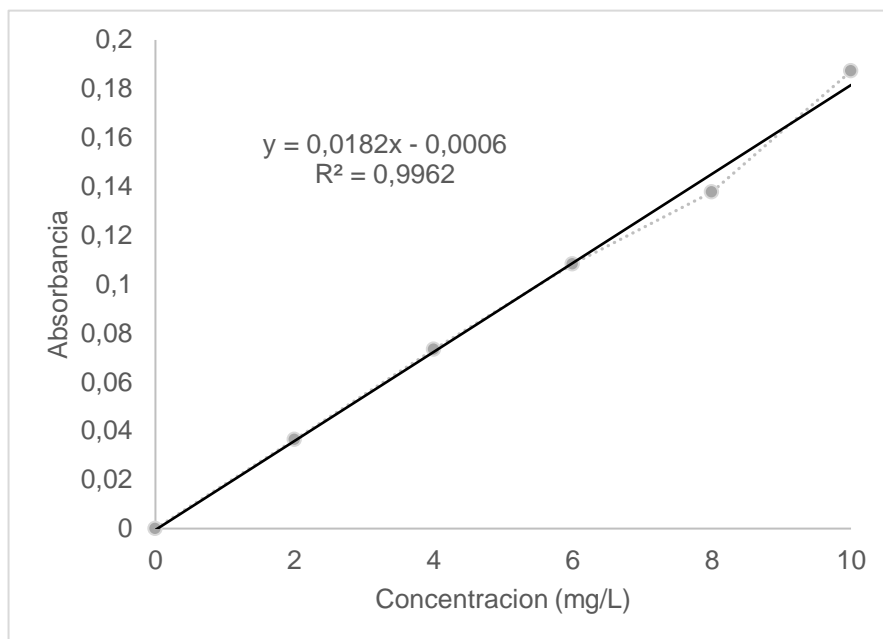
-Del extracto de muestra obtenido se tomó 3 ml y se colocó en un tubo de ensayo junto con 6 ml de $AlCl_3$ metanoico al 2%. Para el blanco en vez del extracto de muestra se utilizó 3 ml de agua destilada.

-Posteriormente se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó reposar en oscuridad por 10 minutos para el desarrollo del color, trascurrido el tiempo se leyó en un espectrofotómetro a 430 nm.

Curva de calibración

Figura 8

Curva determinación de Flavonoides



Cálculos:

$$Fl \frac{mg}{100 g} = \frac{LR \times v \times FD * 100}{p * 1000}$$

Fl= Flavonoides

LR= Lectura de regresión (mg/l)

v= volumen de aforo (25 ml)

p= peso de la muestra (g)

FD= Factor de dilución

100= Factor de conversión de mg/g a mg/100g

Actividad Antioxidante

Principio:

La determinación de la actividad antioxidante se realizó conforme al método descrito por (Re *et al.*, 1999) con modificaciones.

La actividad antioxidante se mide por la capacidad de las moléculas redox de los alimentos de formar radicales libres, se considera el efecto en conjunto de todos los antioxidantes de manera sinérgica y no por separado. Se basa en la reducción del radical cromógeno preformado ABTS (máximo de absorción 734 nm) mediante acción de los antioxidantes en comparación con TROLOX (antioxidante estándar).

Procedimiento

Extracción

-Se tomo 0,08 g de muestra previamente desengrasada y se adiciono 5 ml de metanol 80%, para después mezclar y agitar por 30 minutos.

-Se centrifugo por 10 minutos a 5000 rpm, se separó el sobrenadante y guardo en congelación a oscuridad en un balón de aforo de 10 ml durante toda la noche.

-Al pellet se le coloco la solución extractante (metanol 80%) y se repitió el proceso anterior.

-Al día siguiente se combinaron las dos soluciones, se centrifugaron a 5000 rpm y aforaron a 10 ml.

Determinación

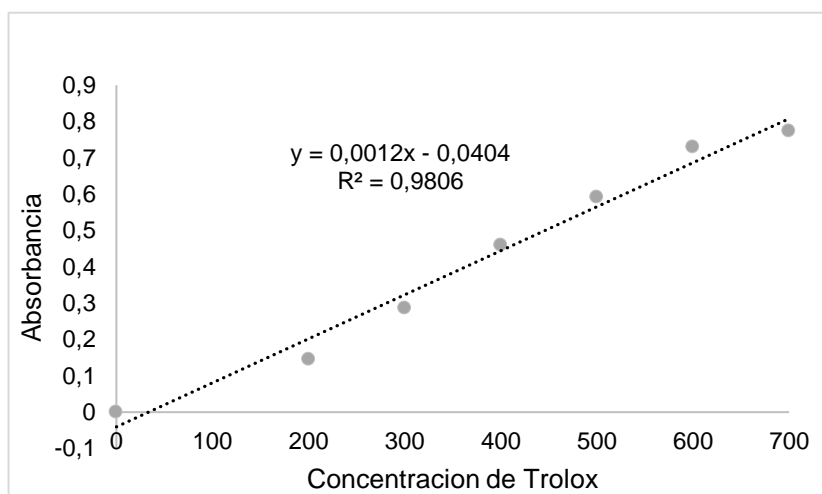
-Se tomo 150 ul de muestra y 2850 ul de la solución ABTS diluida en un tubo de ensayo, se agitó y dejó en reposo 10 minutos en oscuridad. Para el blanco se utilizó la solución

extractante en vez de la muestra y se siguió el mismo procedimiento, finalmente se volvió a agitar y espero otros 10 minutos para después leer la absorbancia a 734 nm. (Para absorbancias inferiores a 0,2 se debe realizar diluciones con la solución extractante).

Curva de calibración

Figura 9

Curva de calibración, capacidad antioxidante



Cálculos:

$$Fl \frac{mg}{100 g} = \frac{LR \times v \times FD}{p}$$

Fl= Flavonoides

LR= Lectura de regresión uM/L

v= volumen de aforo (10 ml)

p= peso de la muestra (g)

FD= Factor de dilución

Carotenoides

-La determinación de carotenoides se realizó conforme al método detallado por Burgos *et al.*, (2009) con modificaciones, el cual es un método adaptado y desarrollado por (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Extracción de la muestra

-Se peso 8 g de muestra de quinua molida (el peso depende de la coloración de la muestra, harinas amarillas pálidas 6-8 g, amarillo intermedio 4-5 g y de 2-4 g amarillo intenso) y se añadió acetona helada (40 ml) para después homogenizar en agitación durante 15 minutos y filtrar. Todo el procedimiento debe realizarse en frascos protegidos de la luz. La extracción se repitió hasta obtenerse un residuo sin color.

Separación líquido-líquido

-En una pera de separación se colocó 30 ml de éter de petróleo junto con 10 ml de agua

-El extracto de la muestra se transfirió a la pera de separación en cuatro fracciones: primero se colocó el $\frac{1}{4}$ del total del extracto de la muestra en la pera (lentamente) y posteriormente se añadió 50 ml de agua destilada y luego se prosiguió de igual manera con las otras partes restantes hasta transferir toda la muestra. Se dejó reposar hasta que se formen dos fases, se descartó la fase acuosa inferior.

-La solución restante se lavó con 200 ml de cloruro de sodio (1%) para evitar que se forme emulsiones. Se dejó reposar nuevamente y se descartó la fase acuosa inferior.

Saponificación

-El extracto resultante, se colectó en una matriz y se añadió antioxidante BHT (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol) y 40 ml de solución metanólica de KOH (10%). A oscuridad se agitó durante 3 horas.

-Posteriormente se transfirió el extracto saponificado a una pera de separación y se recolectó la fase metanólica (fase inferior) en un matraz al que se añadió un volumen similar de acetona helada.

-A la fase etérea (fase superior) se le añadió 25 ml de éter etílico y se transfirió en cuatro fases (conforme a la metodología antes descrita), después de cada transferencia se agito las muestras y añadió 50 ml de agua destilada por las paredes (suavemente). Se dejó reposar y descarto la fase acuosa.

-Se lavo 4 veces con 50 ml de agua destilada (volumen total 200 ml), se dejó se formen dos fases y descarto la fase acuosa. Se filtro el extracto obtenido en un embudo con sulfato de sodio anhidro y se aforo a 25 ml con éter de petróleo. Se leyó a 450 nm.

Cálculos

La concentración de carotenoides totales se determinó usando el coeficiente de absorción recomendado para mezclas de carotenoides (2500).

$$C \frac{ug}{100g} = \frac{Abs \times v \times 10^5}{2500 \times p}$$

Donde:

Abs= Absorbancia de la muestra

v= volumen de aforo en ml (25 ml)

2500= coeficiente de absorción recomendado para mezclas de carotenoides

p= peso de la muestra en g

Minerales

La cantidad de hierro y zinc para los tres genotipos de quinua en estado amargo, desaponificado y fermentado fueron determinados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP en el departamento de Nutrición y Calidad.

Capítulo IV: Resultados y discusión

La quinua es un cultivo de alto valor nutricional, es una de las pocas especies del reino vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, contiene alto contenido de proteínas y posee un equilibrio excepcional de aminoácidos, sin embargo, la existencia de compuestos bioactivos como saponinas, provocan que los nutrientes no estén completamente disponibles, entre los métodos de disminución y eliminación de antinutrientes se encuentra la desaponificación y fermentación (Mahan & Raymond, 2010; Rojas *et al.*, 2011; Zikankuba & James, 2017). En este estudio se evaluó el efecto de la fermentación en tres genotipos de quinua, se encontró que tanto la fermentación como la desaponificación provocan cambios en el contenido de nutrientes, antinutrientes y compuestos funcionales de la quinua.

Fermentación de Quinua

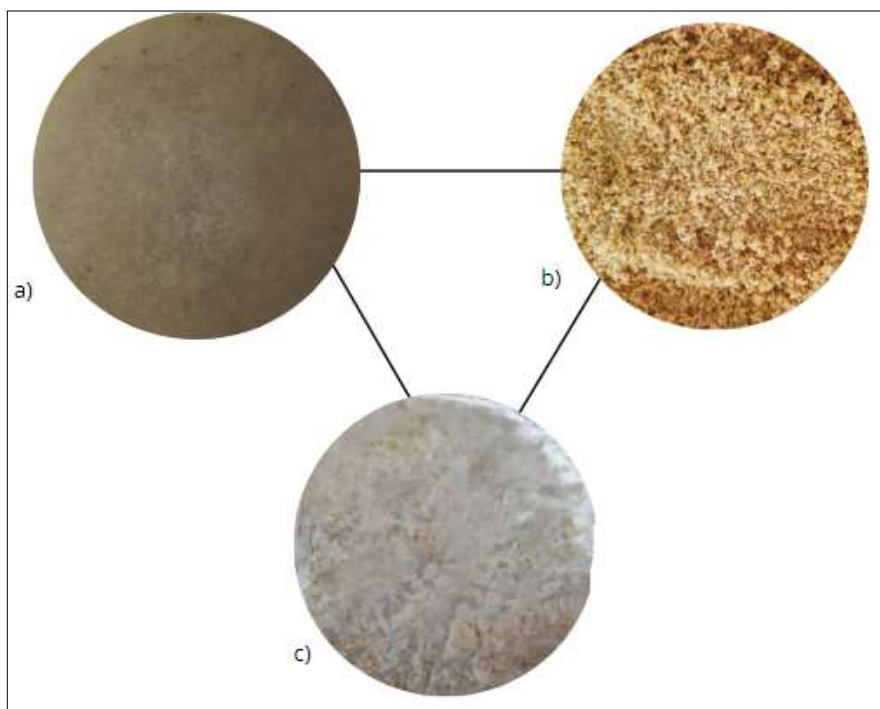
La fermentación se realizó conforme al procedimiento detallado en la Figura 3, la desaponificación permite eliminar sustancias antimicrobianas naturales (saponinas) así como sus principios amargos.

La quinua fue humedecida hasta el porcentaje óptimo de humedad e inoculada con 10^5 unidades formadoras de colonias g^{-1} (UFC g^{-1} de sustrato preparado) utilizando la cepa fúngica de *Rhizopus oligosporus*. A escala doméstica la mayoría de productores utilizan un inóculo cultivado en hojas de plantas ya que el grado de esporulación puede inspeccionarse visualmente. Niveles bajos de cepa fúngica ($10^2 \leq \text{UFC } g^{-1}$) necesitan de periodos de incubación más largos lo que implica mayores posibilidades de deterioro bacteriano además se ha reportado crecimiento irregular mientras que niveles altos (10^6 o mayores UFC g^{-1}) pueden ocasionar un elevado aumento en la temperatura de fermentación causando la muerte prematura del hongo (Nout & Kiers, 2005).

La quinua se homogeniza con el inóculo en capas de entre 3 a 5 cm de espesor. La aireación es uno de los factores que influyen durante el proceso de fermentación, con este objetivo se perforaron las fundas de polietileno. Hur *et al.*, (2018) ha reportado tiempos de fermentación mayores en sustrato de quinua de entre los 3 a 5 días sin embargo en esta investigación un tiempo de entre 24 a 36 horas fue suficiente, posiblemente el tiempo de incubación menor puede deberse a la interacción con otros factores dependientes del metabolismo de los microorganismos de la FES como la humedad, A_w , la aeración, el tamaño de la partícula, el pH y la acidez (Humberto, 2012). Nout & Kiers, (2005) menciono que tiempos de incubación de entre 24 a 48 horas son suficientes para el desarrollo exuberante del micelio y la germinación de esporas. En la Figura 10 se muestra la quinua fermentada.

Figura 10

Apariencia de la quinua fermentada con R. oligosporus



Nota. Quinua Fermentada: a) Hongo cultivado en medio PDA a 29 °C b) Quinua variedad Tunkahuan desaponificada c) Quinua fermentada con *R. oligosporus* durante 24h a 29 °C.

El suministro de aire restringido permite que las esporas del hongo se produzcan en cantidades mínimas, y se forme una pasta cremosa con un atractivo color blanco uniforme, libre de coloraciones negras o grises (ocasionadas por esporangiosporas pigmentadas) (Nout & Kiers, 2005). Normalmente el fermento no se consume crudo, si no que se utiliza como fuente de enriquecimiento para alimentos como por ejemplo en guisos, formulas o como papas fritas (tempe kripiik) (Ang *et al*, 1989, como se citó en Nout & Kiers, 2005; VAIDEHI *et al.*, 1996).

Análisis Proximal

En la tabla 9 se presenta los resultados obtenidos de la composición proximal de las quinuas Chimborazo, INIAP-Tukahuan e INIAP-LPQE-4 en sus respectivos estados amargo, desaponificado (Dulce) y fermentado, se presenta la media \pm desviación estándar (n = 3).

Tabla 9

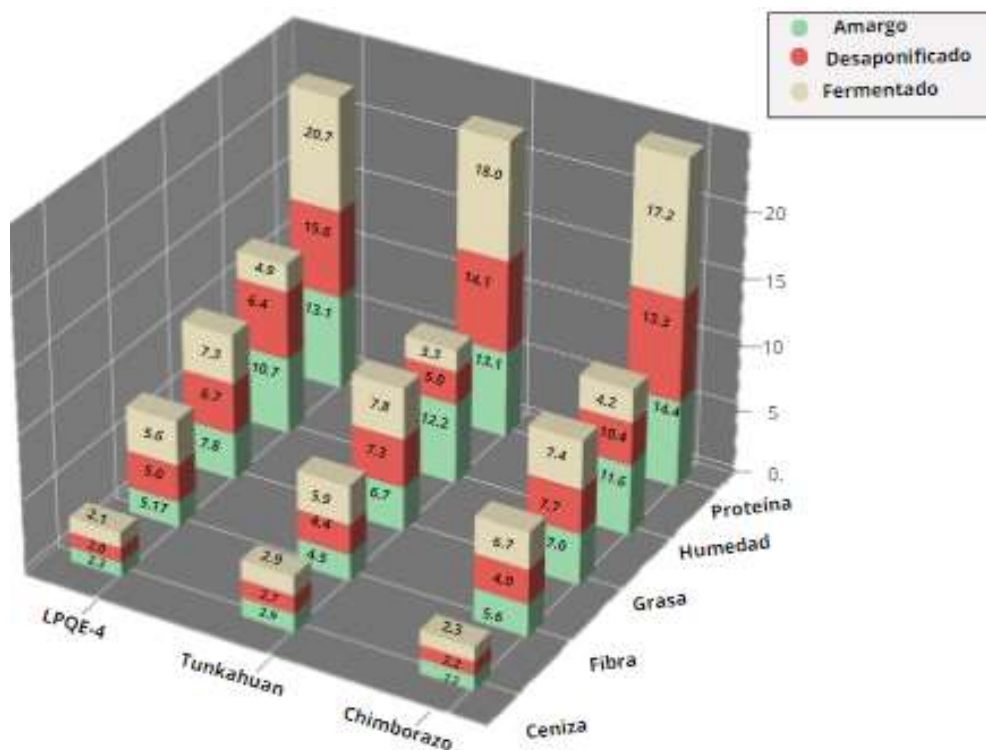
Composición proximal de tres genotipos de quinua en sus diferentes estados.

		Humedad	Cenizas	Grasa	Fibra	Proteína
Chimborazo	Amargo	11,56 \pm 0,2 ^F	2,22 \pm 0,03 ^A	7,05 \pm 0,05 ^{CD}	5,60 \pm 0,10 ^B	14,41 \pm 0,2 ^D
	Dulce	10,41 \pm 0,3 ^E	2,22 \pm 0,03 ^A	7,71 \pm 0,02 ^{AB}	3,90 \pm 0,10 ^E	13,32 \pm 0,5 ^E
	Fermentado	4,23 \pm 0,15 ^B	2,34 \pm 0,05 ^A	7,47 \pm 0,35 ^{ABC}	6,77 \pm 0,07 ^A	17,27 \pm 0,6 ^B
Tunkahuan	Amargo	12,20 \pm 0,1 ^G	2,91 \pm 0,07 ^A	6,71 \pm 0,01 ^D	4,49 \pm 0,10 ^D	13,14 \pm 0,1 ^E
	Dulce	4,98 \pm 0,2 ^C	2,68 \pm 0,18 ^A	7,30 \pm 0,10 ^{ABC}	4,04 \pm 0,20 ^E	14,05 \pm 0,3 ^{DE}
	Fermentado	3,32 \pm 0,03 ^A	2,92 \pm 0,18 ^A	7,78 \pm 0,13 ^A	5,86 \pm 0,02 ^B	18,08 \pm 0,6 ^B
LPQE4	Amargo	10,71 \pm 0,1 ^E	2,32 \pm 0,07 ^A	7,77 \pm 0,28 ^{AB}	5,17 \pm 0,02 ^C	13,10 \pm 0,1 ^E
	Dulce	6,42 \pm 0,30 ^D	2,02 \pm 0,04 ^A	6,67 \pm 0,03 ^D	4,93 \pm 0,12 ^C	15,65 \pm 0,4 ^C
	Fermentado	4,99 \pm 0,19 ^C	2,15 \pm 0,01 ^A	7,30 \pm 0,30 ^{BC}	5,60 \pm 0,05 ^B	20,71 \pm 0,3 ^A

Nota. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como (g/100 g peso seco de la muestra). En la humedad (a) representa los valores más bajos de porcentaje y los otros parámetros la letra (a) representa las cantidades más altas.

Figura 11

Diagrama de composición proximal de tres genotipos de quinua



Humedad

La cantidad de humedad varió durante los procesos fermentado y desaponificado, el porcentaje de humedad se muestra en la tabla 9, se observó diferencias altamente significativas entre los factores de estudio genotipos (p -valor 0,0001) y estado (p -valor 0,0001) así como entre sus interacciones (p -valor 0,0001). En la tabla 10 se presenta el análisis estadístico ANOVA.

El porcentaje de humedad disminuyó significativamente durante el proceso de eliminación de saponinas (desaponificación), la variedad Tunkahuan sufrió las pérdidas más considerables disminuyendo 72% el contenido de humedad seguido por los genotipos LPQE4 (40%) y Chimborazo (10%). La fermentación también provocó pérdidas en el contenido de agua, sin

embargo, estas fueron menores a las ocasionadas por la desaponificación (Figura 11). Entre genotipos la cantidad de humedad fue variable (Figura 12^a), siendo la variedad Tunkahuan fermentada la variedad con menor cantidad de humedad (Tabla 9).

Tabla 10

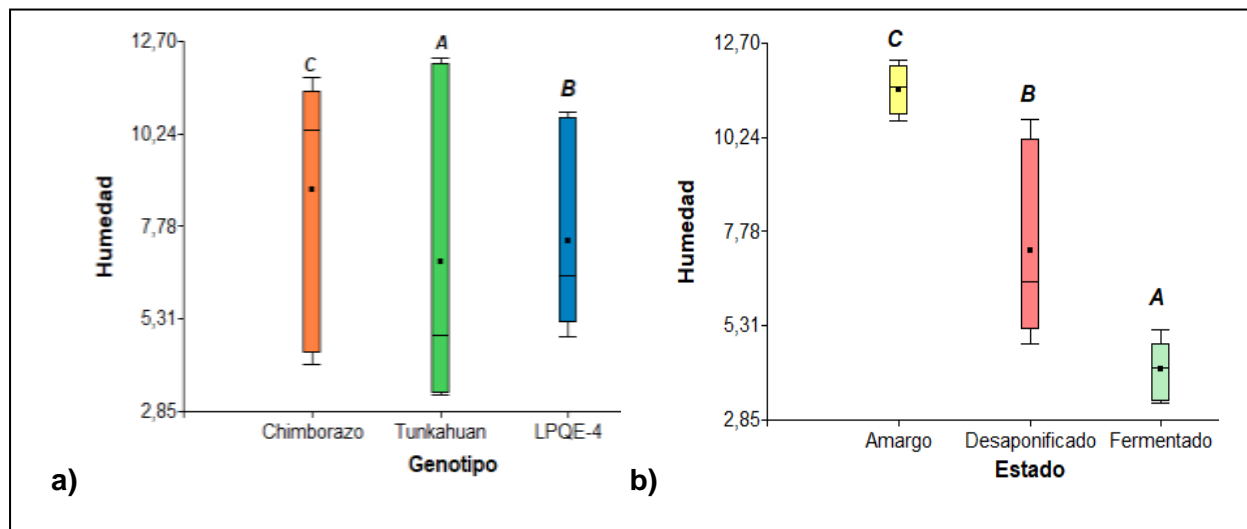
Análisis de la varianza para la humedad de la quinua

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	17,3395	2	8,66976	275,82	<0,0001**
B:Estado	242,388	2	121,194	3855,61	0,0001**
C:Bloque	0,100112	2	0,050056	1,59	0,2340
Interacciones					
AB	37,8066	4	9,45165	300,69	0,0001**
RESIDUOS	0,502929	16	0,0314331		
TOTAL	298,137	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Figura 12

Efecto de la fermentación en la cantidad de humedad de la quinua (Factor A y Factor B).



Nota No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados ascendentemente la letra A indica la menor cantidad de humedad.

Los resultados de la tabla 9 indican que los tres genotipos de quinua en sus diferentes estados, tienen un porcentaje de humedad inferior a $12,20\% \pm 0,08\%$, estos se encuentran dentro límites máximos permisibles por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 3042 donde la humedad de la quinua no debe exceder el 13,5%. Las quinuas en su estado amargo presentaron humedades de entre 10 a 12% Olivares (2005) y Pantoja *et al.*, (2020) en sus estudios determinaron contenidos de humedad similares a los reportados en esta investigación. El contenido de humedad entre los granos de quinua fue diferente entre genotipos (Figura 12^a), siendo INIAP-Tunkahuan el genotipo con menor contenido de humedad, probablemente dichas diferencias fueron ocasionadas por variables como el genotipo, el ambiente, el riego, la humedad, temperatura de almacenamiento y las condiciones de cultivo de cada variedad, de las cuales depende en cierto grado la composición proximal de la quinua (Gómez & Aguilar, 2016).

La desaponificación fue el estado en el que se obtuvo mayor variabilidad entre humedades, mientras el genotipo Chimborazo perdió 9% de humedad, las variedades Tunkahuan y LPQE-4 disminuyeron más de 40% el contenido de agua, esto pudo suceder por el proceso de secado, la intensidad del aire, así como la temperatura y el tiempo de secado que influyen de manera directa al contenido de humedad (Gomez & Aguilar, 2016). Otro factor que pudo influir es la diferencia entre los granos, distintos genotipos pueden retener diferentes porcentajes de humedad, existen variedades de quinua que incluso son resistentes a la sequía, uno de los factores que les confiere esta capacidad es la cualidad de retención de agua. El secado en la quinua es importante, evita la proliferación de microorganismos indeseables y retarda el desarrollo de ácaros e insectos y a la vez aumenta el tiempo de vida útil de almacenamiento (Mujica *et al.*, 2001).

La cantidad de humedad reportada en la fermentación fue la más baja en todos los genotipos de quinua (Figura 12^b), al comienzo de la fermentación el contenido de humedad fue establecido alrededor del 60% y una vez finalizado se obtuvo niveles inferiores al 5%. En la FES la humedad es un parámetro de importancia, a diferencia de la fermentación en estado líquido la fermentación en estado sólido ocurre en ausencia de agua libre y la humedad contribuye al desarrollo la actividad fúngica (Pastrana, 2009). Un alto contenido de humedad provoca que los espacios entre las partículas se llenen de agua, se disminuya la porosidad y que la difusión del oxígeno se pierda, lo que incrementa el riesgo de crecimiento de micelio aéreo y contaminación microbiana mientras que niveles por debajo del límite de crecimiento pueden afectar la difusión de gas y sólidos en la célula ocasionando inactividad del hongo y en ocasiones esporulación (Pérez, 1996; Ramesh & Lonsane, 1990), siendo entonces el porcentaje de humedad óptimo para la FES valores entre 60-75% (Pérez, 1996; Rodriguez *et al.*, 2006).

La disminución del contenido de humedad posterior a la fermentación según Sargantanis *et al.*, (1993) podría explicarse por el metabolismo del hongo, el cual utiliza agua para su desarrollo. También ocurren pérdidas por evaporación, conforme a Puspawati *et al.*, (2018) durante la fermentación el contenido de la humedad se ve disminuido debido al metabolismo fúngico, el cual en el proceso libera calor que a la vez aumenta la temperatura y evapora cierto contenido de agua. Entre las quinuas las variedades fermentadas reportan cantidades de humedad idóneas, INIAP-Tunkahuan fermentada presento el menor porcentaje de humedad (3,3%). Una cantidad baja de humedad en los granos y cereales disminuye el riesgo de germinación, aglomeración de materiales pulverulentos, y predisposición al desarrollo microbiano, por lo tanto, están inversamente relacionados a la calidad del grano (Cazares, 2011; Rosique, 2013). Además de la fermentación la liofilización también fue una variable de influencia la cual contribuyo a que la cantidad de humedad final en la quinua sea menor al 5%.

Ceniza

El porcentaje de ceniza vario durante los procesos desaponificado y fermentado, los porcentajes de ceniza se expresan en la tabla 9, se observó diferencias altamente significativas entre los factores de estudio genotipos (p -valor $<0,0001$) y estado (p -valor $0,002$), no hubo diferencias entre los bloques (p -valor $0,567$) ni entre las interacciones (genotipo*estado). En la tabla 11 se presenta el análisis estadístico ANOVA.

Tabla 11

Análisis de la varianza para la ceniza de la quinua

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	2,38795	2	1,19398	128,23	$<0,0001^{**}$
B:Estado	0,175691	2	0,0878457	9,43	$0,002^{**}$
C:Bloque	0,0116409	2	0,00582043	0,63	0,5478
INTERACCIONES					
AB	0,100279	4	0,0250699	2,69	0,0687
RESIDUOS	0,14898	16	0,00931124		
TOTAL	2,82454	26			

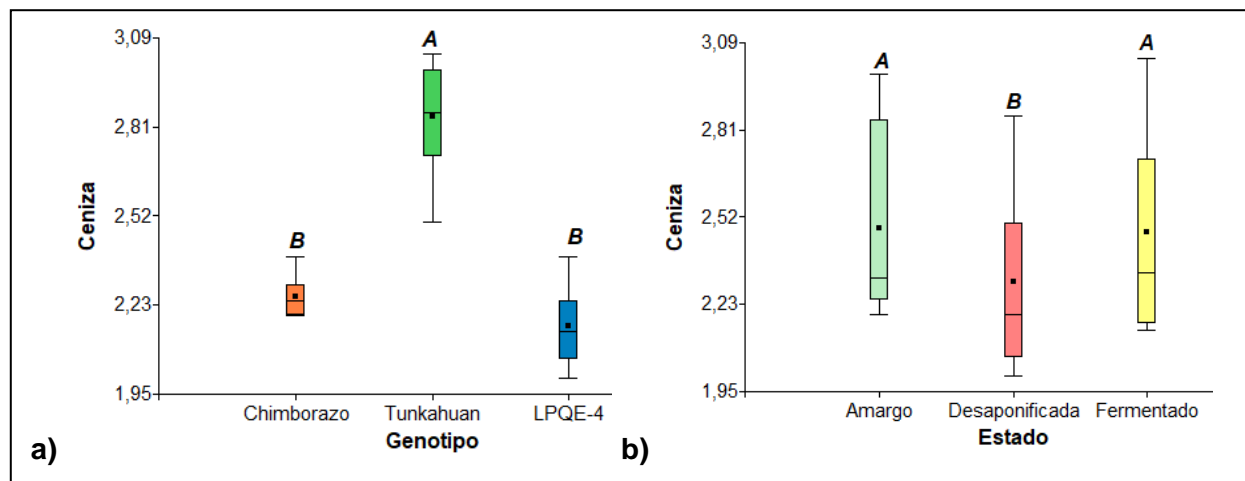
Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

El porcentaje de ceniza difirió entre los distintos genotipos y estados de la quinua como indica la tabla 11, debido a que la diferencia fue significativa se aplicó la prueba de múltiples rangos Tukey. Durante la desaponificación la cantidad de ceniza disminuyó en los genotipos Tunkahuan y LPQE-4, mientras que Chimborazo no presento diferencias significativas.

En la fermentación por otro lado, se observó aumentos uniformes entre todos los genotipos. La variedad Tunkahuan fue la que mayor contenido de cenizas presento (Figura 13^a) entre los genotipos. y entre los estados, las variedades fermentadas y amargas fueron las de mayor porcentaje de ceniza (Figura 13^b). INIAP-Tunkahuan fermentada fue el genotipo con el porcentaje de ceniza más alto con aproximadamente 0,5% y 07% más cantidad de ceniza que sus homologas fermentadas Chimborazo y LPQE-4 respetivamente.

Figura 13

Efecto de la fermentación en la cantidad de ceniza de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados descendientemente la letra A indica la mayor cantidad de ceniza.

El porcentaje de ceniza en los diferentes estados de los tres genotipos de quinua, fue inferior a $3\% \pm 0,18$, según la Norma técnica ecuatoriana (INEN 1671) 3,5% es el máximo permisible. El contenido de ceniza en la quinua conforme a Maradini *et al.*, (2015) es mayor que el reportado para el trigo (1,8 %) y el arroz (0,5 %) si bien el contenido de ceniza es la cantidad de compuestos inorgánicos y un índice de pureza también representa el contenido de minerales mayoritariamente fosfatos, carbonatos, sulfatos, sílice y silicatos presentes en un alimento (Mamani *et al.*, 2017). El cual según Maradini *et al.*, (2015) en el grano de quinua es alto.

El porcentaje de ceniza encontrado en los genotipos de quinuas amargas (Tabla 9) es similar al reportado por otros autores 2,52% (Mamani *et al.*, 2017), $2,44 \pm 0.05\%$ (Pantoja *et al.*, 2020), 2,89% (Mira & Sucoshañay, 2016), 1,4–3,83% (Isam *et al.*, 2021). La diferencia significativa encontrada entre los genotipos de quinua (Tabla 11) según la prueba de múltiples rangos (Figura 13^a) se debe a que INIAP-Tunkahuan presenta porcentajes significativamente

superiores de ceniza, mientras la línea L-PQE4 contiene porcentajes de ceniza menores y similares al genotipo Chimborazo, indicando indirectamente que entre estas dos variables existe un menor contenido de minerales. Mujica *et al.*, (2001) ha informado diferente contenido de minerales entre variedades de quinua, factores como el genotipo, condiciones de cultivo, el suelo, fertilizantes entre otros puede influir en el porcentaje total de minerales (Schlick & Bubenheim, 1993; Vega-Gálvez *et al.*, 2010)

El contenido significativamente inferior en las variedades desaponificadas (Figura 13^b), de ceniza, podría ser el resultado del procedimiento de lavado y limpieza de la quinua, el cual fue utilizado para la eliminación de saponinas, según Ruales & Nair, (1993a), estos procesos han logrado disminuir hasta un 46% de potasio, 27% en manganeso, 28% en hierro y 8% en magnesio. Nazaretha *et al.*, (2018) informó que una disminución en el porcentaje de cenizas podría indicar en la soja que algunos minerales se encuentran contenidos en la epidermis, una inferencia igual puede relacionarse con la quinua. Konishi *et al.*, (2004) localizaron en el tejido embrionario cantidades de fósforo, potasio y magnesio mientras que el pericarpio calcio y potasio. En trabajos similares Castro, (2010) reportó disminución en el contenido de ceniza en el grano pulido de quinua.

La fermentación provocó que la cantidad de cenizas aumente (hasta un 5% en la var. Chimborazo), el incremento podría deberse al aumento de minerales, proteína y fibra (detallados más adelante), cada componente aporta un contenido de cenizas que tras la incineración contribuyen al contenido final de cenizas (DINGONATURA, 2018). Nazaretha *et al.*, (2018) informó que la ceniza después de la fermentación con *Rhizopus moulds*, para la producción de tempeh gembus se redujo. Mientras Ruiz-Terán & Owens, (1996) no observaron cambios significativos en la fermentación con *R oligosporus*. A pesar del incremento de cenizas en la fermentación, no existieron cambios significativos entre la interacción AXB (genotipo*estado), es decir INIAP-Tunkahuan, Chimborazo y LPQE-4 después de la

fermentación no cambian de manera significativa, siendo sus porcentajes de cenizas similares entre genotipos y estados.

Grasa

El porcentaje de grasa fue similar entre los distintos genotipos, así como entre los bloques, a diferencia de los estados y la interacción AXB (genotipos x estados) en los que se encontró diferencias altamente significativas, p-valor ($< 0,001$) (Tabla 12).

Tabla 12

Análisis de la varianza de grasa de quinua

Fuente	SC	Gl	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	0,147076	2	0,0735382	2,63	0,1033
B:Estado	0,609113	2	0,304557	10,87	$<0,001^{**}$
C:Bloque	0,199942	2	0,0999711	3,57	0,0523
INTERACCIONES					
AB	3,62242	4	0,905606	32,33	$<0,001^{**}$
RESIDUOS	0,448217	16	0,0280136		
TOTAL	5,02677	26			

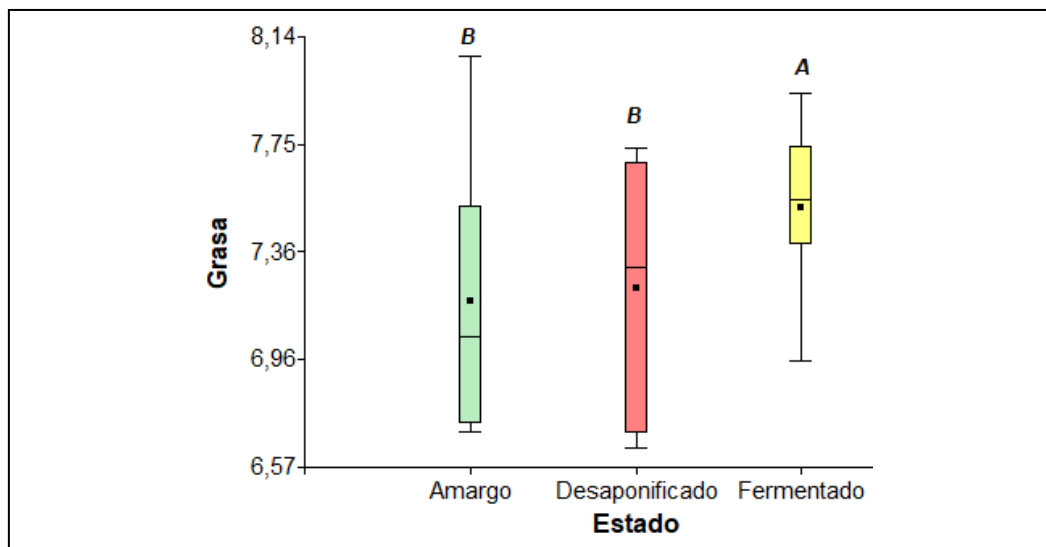
Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

El contenido de grasa no vario significativamente entre los genotipos de quinua (Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4), pero si entre los estados amargo, desaponificado y fermentado (Figura 14) al igual que la combinación del genotipo y tipo de procesamiento (factor AXB), es decir estos dos últimos influyen significativamente en el contenido de grasa de la quinua.

Durante la fermentación, la cantidad de grasa fue afectada de forma distinta entre los genotipos, mientras las variedades Tunkahuan y LPQE-4 aumentaron el contenido de extracto etéreo, en el genotipo Chimborazo este se redujo (Figura 11).

Figura 14

Efecto de la fermentación en la cantidad de grasa de la quinua (Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados descendientemente la letra A indica la mayor cantidad de grasa.

La quinua es conocida como un pseudocereal por razones botánicas y por su composición inusual y excepcional equilibrio entre aceite, grasa y proteína (Vega-Gálvez *et al.*, 2010). El contenido de grasa tiene alto valor nutricional debido al alto índice de ácidos grasos no saturados (Rojas *et al.*, 2014). El porcentaje de grasa bruta encontrado para los distintos genotipos de quinua, así como sus diferentes estados fue mayor a $6,67\% \pm 0,03$, valores superiores a los establecidos por la Norma ISO 11085, donde se exige un rango superior a 4%.

El contenido de grasa entre los granos de quinua es variado Vega-Gálvez *et al.*, (2010) encontraron contenidos de 6,3%, Mira & Sucoshañay (2016), de $7,6\% \pm 0,16$ y Bravo *et al.*, (2013) de 7,83%. El porcentaje determinado para todas las muestras de quinua analizadas se encontró dentro de los rangos antes descritos. Las quinuas Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4 presentaron concentraciones similares de grasa entre genotipos (Tabla 12), sin embargo, otros autores han encontrado diferencias entre ecotipos de quinua (Castro, 2010).

La quinua posee mayor contenido de grasa que el trigo, el arroz y el maíz los cereales conocidos como “granos de oro” (Rojas *et al.*, 2010), este contenido de grasa es de interés culinario, cosmético y para la obtención de aceites vegetales, siendo entonces la quinua una fuente potencial para la extracción de aceite, aspecto que lastimosamente ha sido poco estudiado (Repo-Carrasco *et al.*, 2001 como se citó en Rojas *et al.*, 2011).

Durante la fermentación el contenido de grasa fue estadísticamente mayor, para la variedad Tunkahuan fermentada la cual fue la quinua con mayor contenido de grasa y línea LPQE-4, sin embargo, el genotipo Chimborazo mostró una reducción en el porcentaje de grasa (Tabla 9). Las diferencias encontradas en la cantidad de grasa pueden atribuirse al mecanismo de fermentación del hongo. Ruiz-Terán & Owens (1996) Indicaron que durante la primera etapa de la fermentación en soja no existe cambios significativos en el contenido de grasa, pero conforme avanza la fermentación la actividad de las lipasas aumenta y se generan lentamente ácidos grasos libres acompañado por un leve aumento de glicerol libre (Hass & Joerger, 1995). Posteriormente la cantidad de lípidos crudos disminuye y luego permanece constante hasta nuevamente disminuir abruptamente (Ruiz-Terán & Owens, 1996).

Al parecer el hongo puede aumentar o disminuir el contenido de grasa. De Reu *et al.*, (1994) encontraron que se produjo cierta utilización de ácidos grasos durante la fermentación y aumentos en la actividad de la lipasa hasta las 120 horas de incubación, disminuyendo los ácidos grasos y lípidos después del período de crecimiento más activo. (Ruiz-Terán & Owens, 1996). Contrariamente Nahas, (1988) indicó que, según el nivel de glicerol encontrado durante la fase de crecimiento del hongo, este presenta incapacidad para metabolizarlo y utilizarlo como fuente de energía y carbono. Agranoff, (1999) por otro lado, reporta un aumento sustancial del total de ácidos grasos libres (predominablemente ácidos grasos C18: 1 oleico y C18: 2 linoleico) provocados por la liberación de los ácidos grasos, resultado de la hidrólisis de más del 30% de lípidos neutros. Aspectos que explicarían el aumento y disminución entre los

genotipos. Además, en la fase de crecimiento micelial (0-32h), la materia seca disminuye en aproximadamente un 10% (p/p) y durante la fase de senescencia micelial un 12% más, lo que también podría haber influenciado en la disminución de lípidos crudos (Ruiz-Terán & Owens, 1996)

El mecanismo de la fermentación en soja con *R. oligosporus* está bastante documentado sin embargo existe poca información frente a la fermentación en quinua, el tiempo de fermentación, así como el genotipo utilizado parecen ser factores de influencia. Posiblemente el aumento de grasa tanto en la variedad Tunkahuan como la línea LPQE-4, podría deberse al aumento de ácidos grasos obtenidos en las primeras etapas de la fermentación, la cual según Ruiz-Terán & Owens, (1996) ocurre después de las 12 horas de incubación, probablemente el crecimiento relativamente rápido del hongo (entre 24-36 horas) en estas dos variedades de quinua no fue suficiente como para llegar a la segunda etapa donde disminuye el contenido graso, o simplemente el hongo no requirió los ácidos grasos y los almaceno o no pudo utilizarlos conforme indica Hass & Joerger, (1995).

Un contenido de grasa mayor, debido a la cantidad de ácidos grasos esenciales en la quinua (ácido linoleico 56% y ácido linolénico 6,7%), es un buen indicador nutritivo por lo cual la variedad Tunkahuan fermentada es de interés, al presentar cantidades de grasa significativamente superiores (Wood *et al.*, 1993). Además, la quinua también posee ácidos grasos insaturados y vitamina E, lo que aumenta la estabilidad oxidativa (Nig *et al.*, 2007).

Fibra

El porcentaje de fibra durante la fermentación con *R. oligosporus* varió significativamente. La existencia de tres p-valores menores a 0,05 representa que entre los factores genotipo y estado, así como entre sus interacciones, existe al menos un factor diferente al resto, no se encontraron diferencias significativas entre los bloques.

Tabla 13*Análisis de la varianza para la fibra*

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	1,98037	2	0,990187	103,95	<0,0001**
B:Estado	13,9065	2	6,95323	729,95	<0,0001**
C:Bloque	0,0344402	2	0,0172201	1,81	0,196
INTERACCIONES					
AB	3,76898	4	0,942246	98,92	<0,0001**
RESIDUOS	0,15241	16	0,00952563		
TOTAL	19,8427	26			

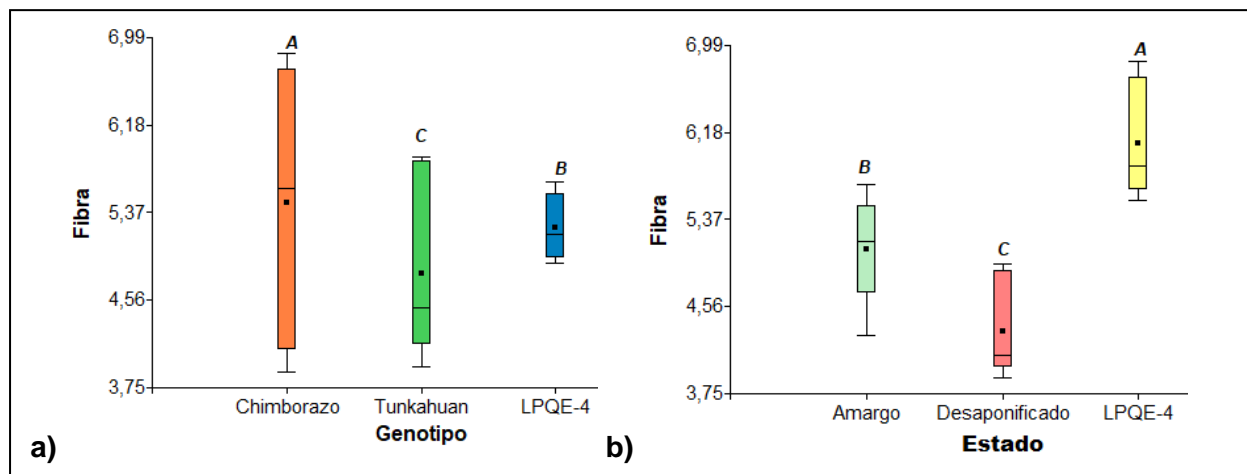
Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

La figura 15^a indica que entre los genotipos la variedad Tunkahuan es la que posee los valores más bajos de fibra seguido por la línea LPQE-4 y el genotipo Chimborazo. Durante el procesamiento de la quinua, la desaponificación ocasionó que los niveles de fibra bajen (figura 15^b), sin embargo, la fermentación recuperó la fibra perdida y la elevó siendo esta mayor que la obtenida inicialmente, lo que en consecuencia provocó que sean las variedades fermentadas las que obtengan los valores más altos de fibra (Tabla 9).

Chimborazo fermentada fue la quinua con mayor contenido de fibra, seguida por Chimborazo amarga quien también se encuentra dentro de los grupos más altos en contenido de fibra (Tabla 9, grupo B), su estado amargo se asemeja con los estados fermentados de las variedades Tunkahuan y LPQE-4.

Figura 15

Efecto de la fermentación en la cantidad de fibra de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados descendientemente la letra A indica la mayor cantidad de fibra.

La quinua destaca por su nivel de fibra, el cual es superior que el trigo y del arroz, además del grano las hojas y las panículas son fuertes importantes de fibra, sus propiedades funcionales están relacionadas entre otros componentes con la existencia de fibra, la cual le confiere efectos beneficiosos relacionados con la digestibilidad y la salud (Isam *et al.*, 2021; Palombini, 2013; Tapia, 1997).

Se han obtenido diferentes valores de fibra entre variedades de quinua, Pantoja *et al.*, (2020) reportó porcentajes de $3.11 \pm 0.03\%$, Bravo *et al.*, (2013) de $4,58\%$, y Peralta, (2010) de $6,22\%$, Entre variedades el genotipo Chimborazo fermentado destacó por su alto contenido de fibra $6,77\%$ siendo significativamente superior al de la línea Tunkahuan y línea LPQE-4 respectivamente, el porcentaje de fibra parece estar influenciado por la variedad. Castro, (2010) de igual manera informó sobre diferentes porcentajes de fibra entre ecotipos de quinua.

La norma NTE INEN 1671 exige un mínimo permisible de 3% de fibra para la quinua, todas las variables de quinua en sus diferentes estados estuvieron dentro de este valor, siendo

entonces aceptables para el consumo. La variedad Chimborazo desaponificada fue la variable que reportó el nivel más bajo de fibra, pero conforme a la norma este posee 1% sobre el máximo permisible. Desde el punto de vista comercial y siendo la quinua un pseudocereal complementario en la dieta de los celíacos (que no pueden consumir muchos de los cereales por poseer gluten) los valores de fibra óptimos deben oscilar en alrededor 3,2% de fibra, valores que se cumplen en todas las muestras analizadas (Mujica *et al.*, 2001).

El proceso de eliminación de saponinas (desaponificación) resultó en los niveles más bajos de fibra (Figura 15^b). Los granos enteros, generalmente denominados integrales están formados por el salvado (corteza), endospermo y germen, el salvado y el germen conforman gran parte de la fibra (Chaquilla *et al.*, 2018; Ruiz & Calvo, 2015). Las células del perispermo de la quinua están conformados por hemicelulosa, pectinas, celulosa, pentosa, gomas y glucofructanos que en conjunto conforman la fibra (Mujica *et al.*, 2001). Al parecer el proceso de eliminación de saponinas, que incluye lavados repetitivos y manipulación de la corteza están relacionados inversamente con la proporción de fibra. Repo- Carrasco & Astuhuaman (2011) informó que la transformación de fibra insoluble a soluble, la actividad mecánica (corte) así como las altas temperaturas genera la ruptura de los enlaces químicos y crea partículas más pequeñas y solubles de fibra. Resultados similares fueron obtenidos por Peralta, (2010) con una disminución del 0,66% de fibra en la quinua desaponificada (Var. Tunkahuan).

Durante el proceso de fermentación se obtuvieron los valores más altos de fibra entre cada genotipo (Tabla 9). La fermentación con *R. oligosporus* aumenta la fibra dietética de entre 3,7% a 5,8%, debido a los micelios que en el proceso de fermentación FES, se desarrollan en las partículas del sustrato (karyadi, 1989, como se citó en Nout & Rombouts, 1990), que explicaría el aumento de 2,8%, 1,8% y 0,6% para los genotipos de quinua Chimborazo, Tunkahuan y línea LPQE-4 respectivamente.

Las fibras de la dieta en quinua están conformadas por fibras solubles (22%) con propiedades prebióticas y fibras insolubles (78%) que facilitan la defecación (Isam *et al.*, 2021). Repo- Carrasco & Astuhuaman (2011) encontraron que la ingesta de granos enteros está relacionada con la reducción de la mortalidad y el riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos, de igual manera numerosas investigaciones han relacionado la fibra con propiedades como la capacidad de reducir la respuestas glucémica e insulinemia, la capacidad de reducir el colesterol del plasma (por interferencia de la absorción del colesterol y de los ácidos biliares), la facultad de unirse a los ácidos biliares (Gallaher *et al.*, 1986), la capacidad de intercambio catiónico para unirse a los minerales (zinc, cobre calcio, hierro) Schlemmer, 1989, la mejora en la digestión mediante la disminución en el tiempo de tránsito, aumento de la defecación y mejora en la microflora intestinal por medio del fermento del sustrato (Eastwood & Morris, 1992; He *et al.*, 2010; Heller *et al.*, 1980; Schlemmer, 1989). Los valores relativamente altos encontrados en esta investigación podrían relacionarse con las propiedades previamente descritas teniendo así un beneficio potencial.

Proteína

La cantidad de proteína varió durante los procesos de fermentado y desaponificado, los porcentajes de proteína se expresan en la tabla 9, se observó diferencias altamente significativas entre los factores de estudio genotipos (p-valor 0,0001) y estado (p-valor 0,0001) así como entre sus interacciones (p-valor 0,0001), no hubo diferencias entre los bloques (p-valor 0,065), En la tabla 14 se presenta el análisis estadístico ANOVA.

Durante la desaponificación se observa que el porcentaje de proteína aumenta a excepción de la variedad Chimborazo (Figura 11). Durant la fermentación si existe un aumento homogéneo para todos los genotipos de quinua. El genotipo Chimborazo y la variedad Tunkahuan tuvieron cantidades proteicas similares, a diferencia de la línea LPQE-4 que después de la desaponificación aumentó de manera significativa su contenido proteico, siendo

entonces la línea LPQE-4 fermentada la quinua con el porcentaje de proteína más alto (20,71%).

Tabla 14

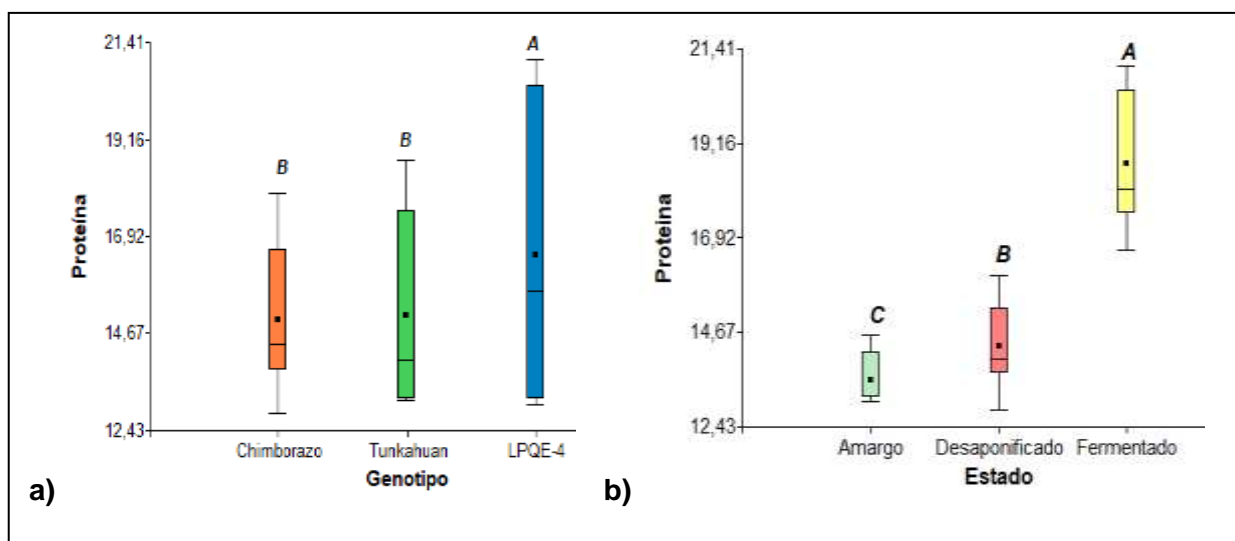
Análisis de la varianza de proteína

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	12,4534	2	6,22671	50	<0,0001**
B:Estado	137,759	2	68,8795	553,13	<0,0001**
C:Bloque	0,807216	2	0,403608	3,24	0,0658
INTERACCIONES					
AB	18,7542	4	4,68856	37,65	<0,0001**
RESIDUOS	1,99241	16	0,124526		
TOTAL	171,766	26			

Nota. Los valores con (**) indican diferencia altamente significativa.

Figura 16

Efecto de la fermentación en la cantidad de proteína de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados descendientemente la letra A indica la mayor cantidad de proteína.

La quinua (*Chenopodium quinoa*) es reconocida por su excelente calidad proteica (equilibrio entre aminoácidos), nueve son los aminoácidos necesarios para el ser humano de los cuales todos se encuentran en la quinua, es rica en lisina lo que la convierte en una proteína completa y de mayor contenido proteico que la mayoría de las verduras y cereales, su aporte proteico es similar al de la caseína de la leche (Maradini *et al.*, 2015; Vega-Gálvez *et al.*, 2010).

Kozioł (1992) informó que el contenido de proteína en el grano de quinua varía de 13,8% a 16,5%, mientras que Rojas *et al.*, (2014) informó de valores entre 10,21 a 18,39%. En esta investigación los valores determinados fueron de 13,10%, 13,14% y 14,41% para los genotipos amargos LPQE-4, Tunkahuan y Chimborazo respectivamente (Tabla 9) respectivamente, valores que se encuentran dentro de los rangos antes descritos y que además cumplen los mínimos necesarios dentro la normativa ISO 20483 la cual exige un mínimo de 10%. Entre genotipos se observaron diferencias, la línea LPQE-4 tuvo valores significativamente superiores de proteína (Figura 16^a) que las variedades Tunkahuan y Chimborazo, según Reyes (2006) y Rojas *et al.*, (2011) la cantidad de proteínas varía según la variedad.

La fermentación aumento los niveles de proteína en todos los genotipos al igual que la desaponificación a excepción de la variedad Chimborazo donde se observó una reducción, siendo entonces el estado amargo o crudo donde se encontró las cantidades más bajas de proteína (Figura 11). La cantidad de humedad influye sobre el contenido proteico, la disminución de este se ve reflejado en el porcentaje de proteínas (Castro, 2010), aspecto que explicaría el aumento encontrado en las variedades desaponificadas. La pérdida de humedad a nivel proteico tiene aspectos positivos y negativos por un lado puede conducir a la agregación proteica y la perdida de las propiedades tecnológicas y por otro lado contribuye al aumento de

la estabilidad química y microbiológica por el descenso de la actividad del agua (a_w) (Castro, 2010)

La reducción encontrada en la variedad Chimborazo durante la desaponificación, puede deberse al proceso de secado el cual en esta variedad fue mayor por la dureza del grano, según Mira & Sucoshañay (2016) es posible que el tratamiento térmico ocasione desestabilización de las proteínas disminuyendo su cantidad, también puede deberse a que hay mayor cantidad de compuestos nitrogenados en la fracción de la corteza que fue manipulada en el proceso de eliminación de las saponinas, conforme a Castro (2010) quien además obtuvo resultados similares en el proceso de desaponificación, encontró aumentos y disminuciones en el contenido proteico entre diferentes genotipos, sin embargo, las disminuciones encontradas en la proteína fueron pequeñas y desde el punto nutricional insignificantes.

Los genotipos fermentados estuvieron en los grupos con contenido más alto de proteínas (Figura 16^b), siendo así la fermentación un método de influencia en el aumento proteico. Los altos niveles de proteínas alcanzados en la línea LPQE-4 fermentada (20%), la destacan como un alimento con potencial nutritivo. Ruiz-Terán & Owens (1996) describieron la utilización de las proteínas durante el proceso de fermentación sólido para la soja, estos autores sugieren que el hongo durante las primeras etapas utiliza a las proteínas como fuente de energía y de carbono y posteriormente disminuye su consumo a un ritmo más lento. Dicho mecanismo es contrario a los resultados encontrados pues el consumo y el aumento de las enzimas proteolíticas (proteasas) presentes en el hongo disminuirían el porcentaje de proteína.

Sin embargo, según el mismo autor solo se utiliza una cantidad relativamente pequeña de proteína (5%) y la mayor parte es asimilada y acumulada como aminoácidos y péptidos, en ese estudio no se analizaron los aminoácidos libres pero otros autores como Murata *et al.*, (1967) y Nowak & Szebiotko (1992) han informado la acumulación de estos en concentraciones

de 20-55 g (kg de tempe seco)-l. En otro estudio Matsuo (2006) informó que la cantidad de lisina se incrementó durante la fermentación de *R. oligosporus*. Según Nazaretha *et al.*, (2018) el hongo produce alfa amilasa, beta amilasa, fosforilasa, isoamilasa, maltasa y enzima ureasa. El aumento en la cantidad de proteínas se debe a que *Rhizopus oligosporus* sintetiza las enzimas ureasas que se utilizan para descomponer la urea en ácido amoniacal y CO_2 .

Estudios similares han reportado resultados parecidos a los encontrados en este estudio Nazaretha *et al.*, (2018) durante el procesamiento de lavado, remojo, descascarado y cocción detectó pérdidas en el contenido proteico, pero durante la fermentación dicha perdida se vio recompensada de 3,7% a 6,7 %. Todos los genotipos de quinuas fermentadas obtuvieron mayor contenido proteico que la cebada (11,0 %), el sorgo. (12,4%), el maíz (10,5 %) acercándose al porcentaje del queso (20%) (Comai *et al.*, 2007; Jancurová *et al.*, 2009; Koziol, 1992; Rojas *et al.*, 2011). Además, según los requerimientos reportados para los niños preescolares (1.46 g/kg/día) y adultos, también se supliría la cantidad de aminoácidos requeridos, siendo entonces la quinua fermentada un alimento con elevado potencial nutricional.

Minerales

En la tabla 22 se representan la cantidad de hierro y zinc presente en las quinuas Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4 en los estados amargo, desaponificado (dulce) y fermentado, se presenta la media \pm la desviación estándar.

Tabla 15

Cantidad de hierro y zinc presente en la quinua amarga, desaponificada y fermentada.

	Estado	Hierro (ppm)	Zinc (ppm)
Chimborazo	Amargo	121,50±0,50 ^D	33,03±0,06 ^F
	Desaponificado	44,50±0,50 ^F	10,03±0,06 ^G
	Fermentado	136,00±1,00 ^C	35,50±0,50 ^{EF}
Tunkahuan	Amargo	353,00±5,00 ^A	34,50±0,50 ^{EF}
	Desaponificado	147,50±3,50 ^B	38,50±0,50 ^D
	Fermentado	151,50±4,50 ^B	62,00±2,00 ^A
LPQE4	Amargo	113,50±0,50 ^D	36,50±0,50 ^{DE}
	Desaponificado	72,00±2,00 ^E	44,00±1,00 ^C
	Fermentado	138,03±0,06 ^C	48,50±0,50 ^B

Nota. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La letra (a) indica la mayor cantidad.

La cantidad de minerales se expresa en la tabla 15, durante la fermentación y desaponificación, el contenido de minerales vario significativamente (Tabla 16 y 17). El hierro se redujo tras el proceso de eliminación de saponinas, y aumento durante la fermentación, sin embargo, en la variedad Tunkahuan no se llegó a los niveles iniciales observándose reducciones de 57%. A diferencia de los genotipos Chimborazo y LPQE-4 quienes, posterior el aumento provocado por la fermentación obtuvieron cantidades superiores que sus recíprocos amargos.

El contenido de zinc por otra parte, tuvo efectos variables, durante la desaponificación LPQE-4 y Tunkahuan aumentaron, pero la variedad Chimborazo disminuyó, en tanto durante la fermentación LPQE-4 disminuyó y los otros dos genotipos aumentaron, siendo la fermentación y desaponificación factores influyentes en el contenido de hierro y zinc.

Tabla 16*Análisis de la varianza de Hierro*

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A: Genotipo	1921,41	2	960,707	1279,84	<0,0001**
B: Estado	1584,05	2	792,023	1055,12	<0,0001**
C: Bloque	0,502963	2	0,251481	0,34	0,7202
INTERACCIONES					
AB	1144,59	4	286,148	381,2	<0,0001**
RESIDUOS	12,0104	16	0,750648		
TOTAL	4662,56	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

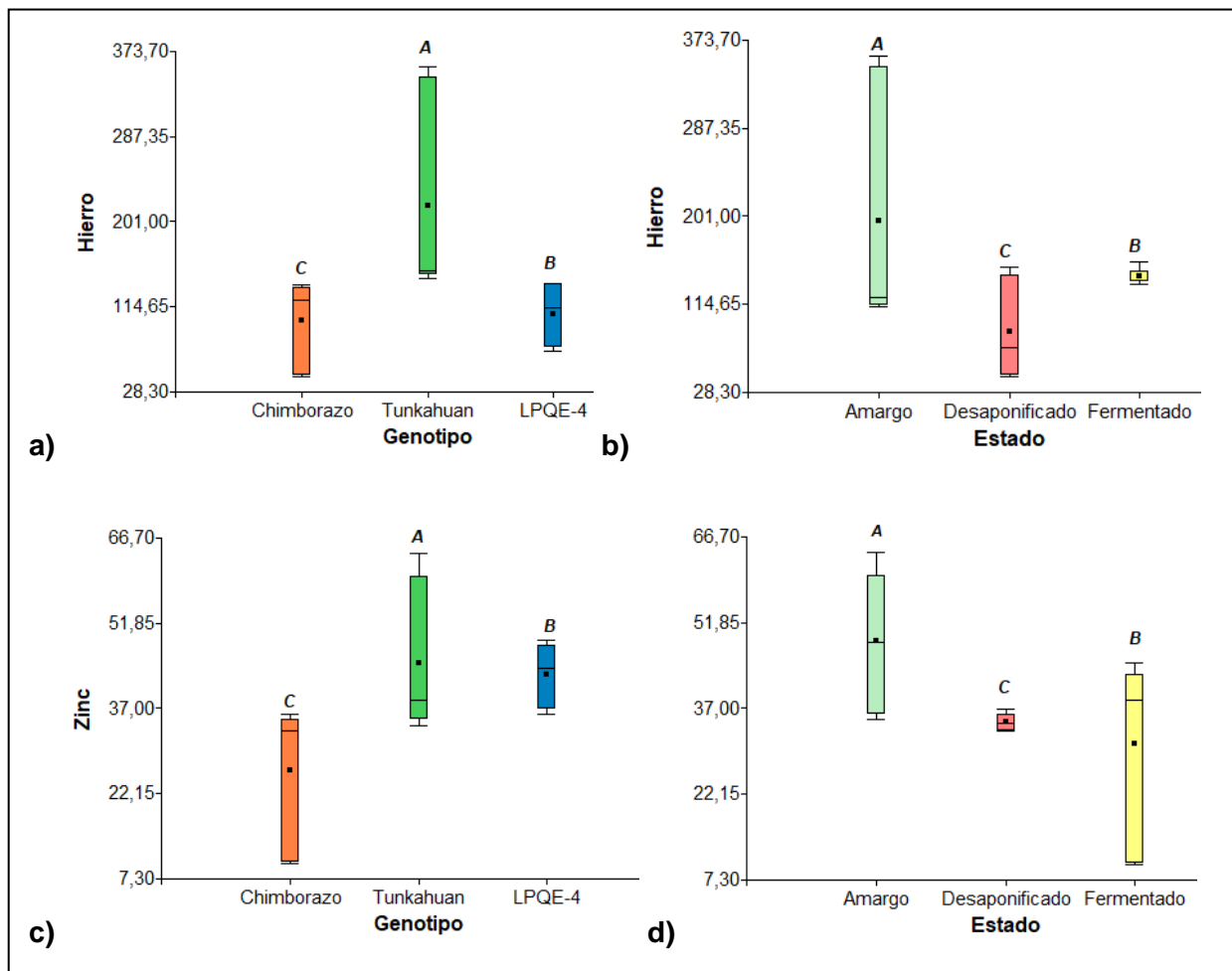
Tabla 17*Análisis de la varianza de zinc*

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	1921,41	2	960,707	1279,84	<0,0001**
B:Estado	1584,05	2	792,023	1055,12	<0,0001**
C:Bloque	0,502963	2	0,251481	0,34	0,7202
INTERACCIONES					
AB	1144,59	4	286,148	381,2	<0,0001**
RESIDUOS	12,0104	16	0,750648		
TOTAL	4662,56	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Figura 17

Efecto de la fermentación en la cantidad de hierro y zinc de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados descendientemente la letra (a) indica la mayor cantidad de hierro y zinc respectivamente.

Los minerales son compuestos inorgánicos que no pueden ser producidos por el organismo, están involucrados en muchas funciones importantes del cuerpo, protegen lípidos, células y membranas biológicas (propiedades antioxidantes) y son cofactores de gran cantidad de reacciones enzimáticas, mineralización ósea y enzimas antioxidantes, la baja

biodisponibilidad e ingesta puede provocar deterioro de las funciones vitales y desequilibrios en la salud (Cozolino, 2009; Schlenker & Gilbert, 2003; Vega-Gálvez *et al.*, 2010).

La quinua ha mostrado cantidades significativamente más altas de minerales en comparación con la mayoría de los cereales (Sezgin & Sanlier, 2019). Según los estudios realizados por Ruales & Nair, (1993a) la quinua puede suplir los requerimientos diarios de algunas vitaminas y ciertos minerales para niños de 1 a 3 años. En este estudio la cantidad de hierro fue significativamente superior (Tabla 15) a la reportada para el trigo (46 ppm), cebada (46 ppm), avena (62 ppm), centeno (44 ppm) y arroz (28 ppm), mientras que la cantidad de zinc fue ligeramente superior (33, 31, 30, 20, 18 ppm) para los mismos cereales respectivamente (Respo-Carrasco 2003). El hierro es de especial interés debido a ser uno de los elementos deficitarios en los productos sin gluten (Filho *et al.*, 2017). Experimentos en alimentación con animales han demostrado que la disponibilidad de hierro de las dietas a base de quinua era al menos tan buena como la disponibilidad de hierro del sulfato ferroso (Koziol, 1992; Ruales & Nair, 1993a).

Varios autores han reportado cantidades diversas tanto de hierro y zinc en la quinua, las variaciones según Filho *et al.*, (2017) se deben al genotipo, el tipo de suelos y las diferentes composiciones minerales y/o fertilizantes aplicados. Koziol (1992) y Ruales & Nair, (1993a) informaron de cantidades de hierro (132 ppm) y zinc (36 ppm) similares a las encontradas en este estudio. Al parecer según lo reportado por Filho *et al.*, (2017) los valores de hierro en la quinua se encuentran entre rangos de 20-168 ppm y de zinc de 0-48. En esta investigación INIAP-Tunkahuan tuvo los valores más altos de hierro y zinc seguidos por LPQE-4 y el genotipo Chimborazo fermentados respectivamente (Figura 17^a y 17^c).

El proceso de lavado y limpieza utilizado para la eliminación de las saponinas, al parecer influye en el contenido de minerales. El contenido de hierro de INIAP-Tunkahuan, LPQE-4 y Chimborazo se redujo de manera homogénea durante la desaponificación (Figura

17^b y 17^d)., Según Chauhan *et al.*, (1992) en la quinua al igual que en los cereales una cantidad considerable de minerales se concentran en las capas exteriores de salvado y por ello la manipulación y lavado disminuye su contenido. La cantidad de zinc tuvo un comportamiento similar en la variedad Chimborazo reduciéndose un 69% la cantidad de zinc, sin embargo, las variedades Tunkahuan y LPQE aumentaron su porcentaje de zinc en un 11,5% y 20,5% respectivamente.(Ruales & Nair, 1993a) informaron de reducciones significativas en la cantidad de hierro 27%, potasio 28% y magnesio 8%.

El aumento en las variedades probablemente se deba a que en estos genotipos la mayor cantidad de zinc no se encuentre en la cubierta o el endospermo y por ende no fue afectado por los procesos de lavado Gómez *et al.*, (2012) menciona que una práctica sostenible para evitar las pérdidas vitaminas y minerales tras el proceso de eliminación de saponinas es el riego deficitario pues encontró que las saponinas disminuyen en condiciones salinas y de sequía. Las notorias disminuciones en la cantidad de hierro también pueden estar influenciadas con la gran solubilidad de este (Vega-Gálvez *et al.*, 2010).

La fermentación aumentó significativamente ($p < 0,05$) la fracción de masa de hierro y zinc en todos los genotipos de quinua, Toor *et al.*, (2021) ha reportado resultados similares en soja y garbanzo fermentados con *R. oligosporus*, al igual (Ali *et al.*, 2018) en la soja fermentada con *Bacillus subtilis*. Los mayores contenidos minerales en las quinuas fermentadas podrían ser producto de la actividad de las enzimas microbianas (amilasa, proteasa y tanasa) que durante la fermentación hidrolizan y liberan a los minerales de los compuestos complejos quelatados convirtiéndolos en sus formas más simples lo que resulta en una mayor digestibilidad y biodisponibilidad de nutrientes, minerales, y aminoácidos limitantes (Asres *et al.*, 2018; de Pasquale *et al.*, 2020; Toor *et al.*, 2021).

El aumento reportado en la fermentación es de interés desde el punto de vista nutricional, las variedades Tunkahuan fermentada y amarga fueron las de mayor contenido de

zinc y hierro respectivamente, un mayor contenido de minerales se relaciona positivamente con el buen funcionamiento del cuerpo, Matsuo (2006) elaboró galletas sustituyendo el 20% de la harina por harina fermentada por *R. oligosporus* obtuvo puntuaciones sensoriales más altas en el sabor y dureza así como aumentos en el contenido de hierro y α -tocoferol en un factor superior a 2.5, además la digestión de hierro en la harina fermentada en ratas también fue superior, lo que sugiere el gran potencial de la quinua fermentada en la digestión, probablemente reflejando por la absorción de nutrientes y/o minerales de fácil acceso (Kiers *et al.*, 2000; Macfarlane *et al.*, 1990).

Antinutrientes

En la tabla 18 se representan los resultados de los factores antinutricionales de las quinuas Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4 en los estados amargo, desaponificado y fermentado, se presenta la media \pm la desviación estándar.

Tabla 18

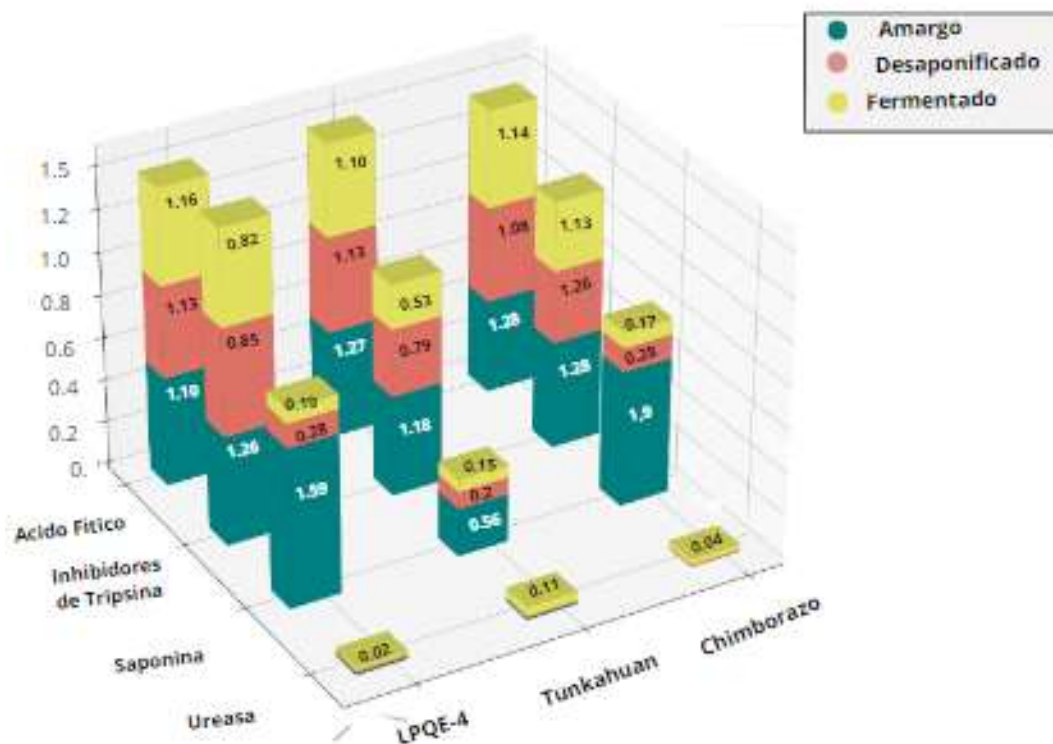
Factores antinutricionales de tres genotipos de quinua en sus diferentes estados

		Saponinas (%)	Ureasa (pH)	Inhibidores De Tripsina (TI mg/g)	Taninos (mg/100g muestra)	Ácido Fítico (g/100g) BS
Chimborazo	A	1,86 \pm 0,07 ^C	0,03 \pm 0,0 ^{AB}	1,28 \pm 0,05 ^D	6,18 \pm 0,51 ^{CD}	1,28 \pm 0,09 ^A
	D	0,28 \pm 0,01 ^A	0,03 \pm 0,0 ^{AB}	1,26 \pm 0,10 ^D	4,93 \pm 2,98 ^{BC}	1,08 \pm 0,02 ^A
	F	0,17 \pm 0,03 ^A	0,04 \pm 0,0 ^{BC}	1,13 \pm 0,10 ^C	13,45 \pm 2,42 ^E	1,14 \pm 0,05 ^A
Tunkahuan	A	0,56 \pm 0,13 ^B	0,01 \pm 0,02 ^A	1,18 \pm 0,05 ^D	6,93 \pm 0,64 ^D	1,27 \pm 0,06 ^A
	D	0,20 \pm 0,02 ^A	0,01 \pm 0,01 ^A	0,79 \pm 0,07 ^{AB}	6,26 \pm 4,64 ^{CD}	1,13 \pm 0,28 ^A
	F	0,15 \pm 0,01 ^A	0,11 \pm 0,02 ^D	0,53 \pm 0,12 ^A	19,39 \pm 5,29 ^F	1,10 \pm 0,06 ^A
LPQE4	A	1,59 \pm 0,02 ^B	0,01 \pm 0,0 ^A	1,26 \pm 0,05 ^D	4,62 \pm 0,93 ^B	1,10 \pm 0,09 ^A
	D	0,28 \pm 0,05 ^A	0,03 \pm 0,0 ^{AB}	0,85 \pm 0,18 ^B	1,32 \pm 5,27 ^A	1,13 \pm 0,03 ^A
	F	0,19 \pm 0,01 ^A	0,07 \pm 0,0 ^C	0,82 \pm 0,18 ^{AB}	27,15 \pm 17,3 ^G	1,16 \pm 0,02 ^A

Nota. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). A: amargo, D: desaponificado (Dulce), F:). La letra (a) indica la menor cantidad.

Figura 18

Diagrama del contenido de antinutrientes en la quinua



Saponinas

El porcentaje de saponina durante los procesos de fermentación y desaponificación disminuyó considerablemente, el contenido de saponina se expresa en la tabla 18. Entre los factores de estudio, genotipo y estado, así como entre sus interacciones el p-valor calculado fue menor a 0,0001 (Tabla 19) es decir que se encontraron diferencias altamente significativas, lo que indica que la cantidad de saponinas se ven afectadas durante el proceso de desaponificación y fermentación.

Tabla 19*Análisis de la varianza para las saponinas*

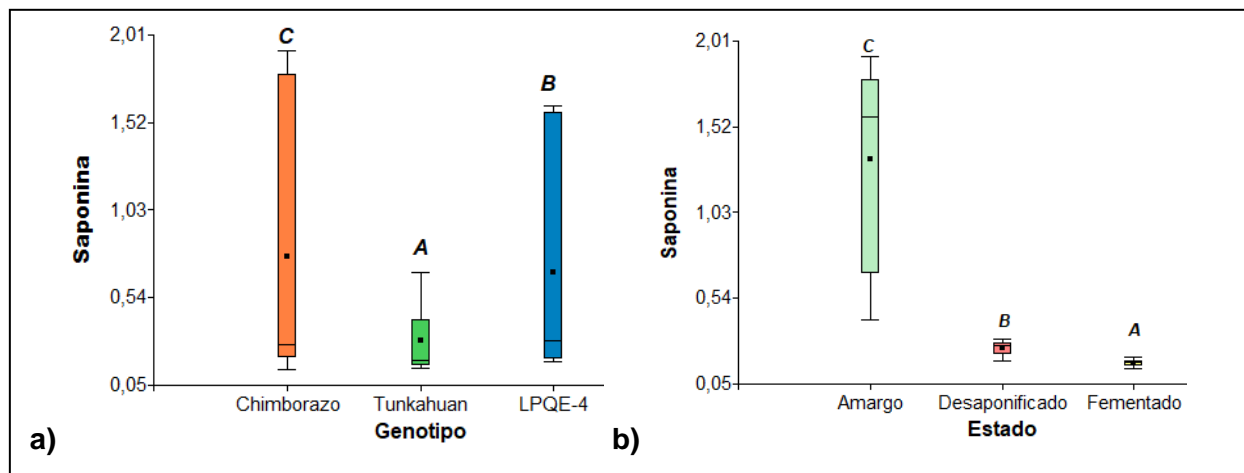
Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	0,653498	2	0,326749	127,35	<0,0001**
B:Estado	9,0716	2	4,5358	1767,85	<0,0001**
C:Bloque	0,0124196	2	0,00620981	2,42	0,1207
INTERACCIONES					
AB	0,93797	4	0,234493	91,39	<0,0001**
RESIDUOS	0,0410515	16	0,00256572		
TOTAL	10,7165	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$). Grupos ordenados ascendentemente la letra A indica la menor cantidad de saponina respectivamente.

La mayor concentración de saponinas se encontró en la quinua amarga o sin procesar (Figura 19^b), la eficiencia del proceso de eliminación de saponinas se evidenció con la notoria disminución de estas, la fermentación también disminuyó el porcentaje de saponinas, pero en menor cantidad que el proceso de desaponificación. Conforme se esperaba, las quinuas de la variedad Chimborazo fueron las que tuvieron el mayor porcentaje de saponinas seguidos por la línea LPQE-4 y la variedad dulce INIAP Tunkahuan (Figura 19^a).

Figura 19

Efecto de la fermentación en la cantidad de saponina de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados ascendentemente. La letra (a) indica la menor cantidad de saponina.

Las saponinas son los principales factores antinutricionales asociados a la quinua, pueden formar complejos con el hierro y zinc, y poseen un característico sabor amargo y astringente (Improta & Kellems, 2001; Southon *et al.*, 1988; Vega-Gálvez *et al.*, 2010). La cantidad de saponinas presente en la quinua puede variar de entre 0,1% a 5% y su concentración depende de la variedad (Stuardo & San Martín, 2008; Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Gómez *et al.*, (2012) encontraron que el porcentaje de saponina está asociado a diferentes variables agronómicas, como el riego y la salinidad, las cuales influyen negativamente en su contenido. Características que explicarían las diferencias encontradas entre los porcentajes determinados de las distintas variedades (Figura 19^a), de los cuales INIAP Tunkahuan posee los porcentajes más bajos de saponina.

INIAP Tunkahuan es una variedad mejorada en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, entre sus características destacan la ligera resistencia al mildiu (enfermedad que ataca a la quinua) y bajo contenido de saponinas, autores anteriores han

informado concentraciones de 0.06 % para la variedad Tunkahuan (INIAP, 2012; Mujica *et al.*, 2001; Peralta, 2010). Sin embargo, el porcentaje de saponina encontrado en este estudio es superior (0,5%), es importante señalar que es la primera vez que se determina el contenido de saponina de esta variedad por un método espectrofotométrico, anteriormente se han reportado resultados únicamente por el método espumoso de rutina INEN 1672:2013, el método empleado en este estudio es más preciso y por ello la concentración superior.

Durante el procesamiento de la quinua se observó un mecanismo de disminución ascendente, las variedades amargas o crudas fueron las que contaron con mayor contenido de saponina, en tanto los porcentajes de las variedades desaponificadas y fermentadas fueron menores (Figura 19^b), El pericarpio de la quinua contiene gran parte de las saponinas presentes en la semilla de la quinua alrededor de un 86%, por ende su manipulación y lavado conducen a la reducción significativa de su contenido (Chauhan *et al.*, 1992; Maradini *et al.*, 2015; Masterbroek *et al.*, 2000). Corzo (2008) informó que la extracción por vía húmeda (involucra remojo, agitación, enjuague y escurrido) pueden disminuir aproximadamente un 68% el contenido de saponina, Peralta (2010) por su parte, reportó un contenido de 0,0% de saponina posterior al lavado.

Paralelamente la fermentación también influye en el contenido de saponinas, Fenwick & Oakenfull (1983) obtuvieron una reducción del 55,8% en las saponinas de la soja fermentada con *R. oligosporus*, sin embargo en este estudio la cantidad de saponinas no disminuyó considerablemente, las variedades desaponificadas y fermentadas presentaron concentraciones de saponinas bajas pero similares (Figura 19^c) el mecanismo por el cual se logra reducir la saponina aún no está bien descrito sin embargo podría ser similar al descrito en la soja fermentada, donde la β -glucosidasa generada durante la fermentación, hidroliza las moléculas de saponina y cadenas laterales de azúcar (Rui *et al.*, 2017).

Actividad de la Ureasa

La actividad de la enzima ureasa durante el proceso de fermentación aumento en los tres genotipos de quinua, la cantidad de actividad ureasa se expresa en la tabla 18. Existieron diferencias significativas entre el genotipo (p-valor 0,0062*) y el estado (p-valor <0,0001**) así como en las interacciones entre ellos, (Tabla 20), al parecer el proceso de fermentación influye sobre la actividad de la enzima ureasa.

Tabla 20

Análisis de la varianza para la actividad de la ureasa

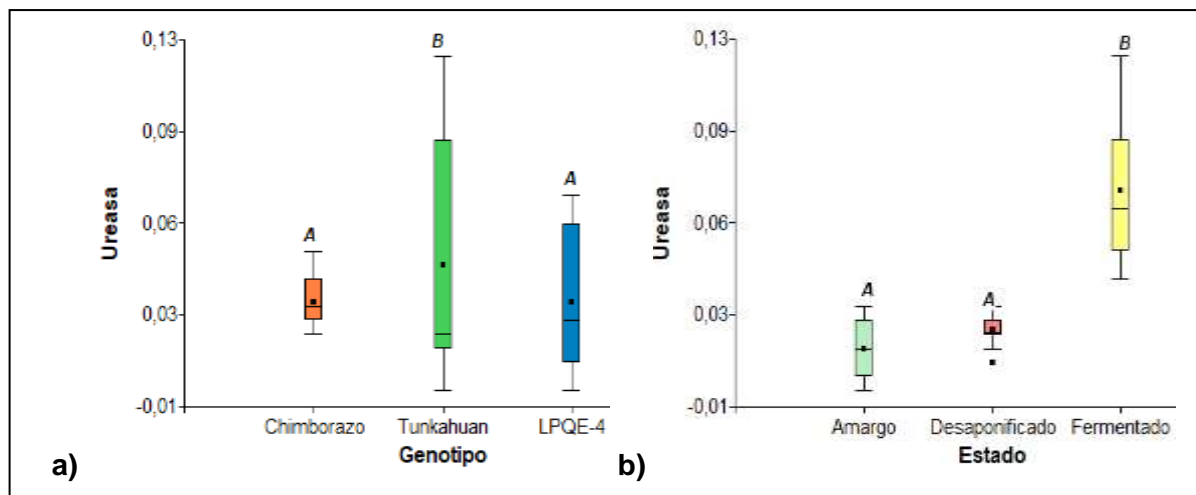
Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	0,00106667	2	0,000533333	7,11	0,0062*
B:Estado	0,0172667	2	0,008633333	115,11	<0,0001**
C:Bloque	0,00005	2	0,000025	0,33	0,7214
INTERACCIONES					
AB	0,005333333	4	0,001333333	17,78	<0,0001**
RESIDUOS	0,0012	16	0,000075		
TOTAL	0,0249167	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$)

La desaponificación no tuvo efecto sobre la actividad de la ureasa a diferencia de la fermentación donde se evidenció un ascenso (Figura 20^b), INIAP-Tunkahuan presentó mayor cantidad de actividad ureásica mientras que los genotipos Chimborazo y LPQE-4 menores concentraciones, pero similares entre sí (Figura 20^a), La variedad Tunkahuan y línea LPQE-4 amarga fueron los que presentaron menor cantidad de actividad de la ureasa

Figura 20

Efecto de la fermentación en la cantidad de ureasa de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados ascendentemente. La letra (a) indica la menor cantidad de ureasa.

La actividad de la enzima ureasa en la quinua se utiliza para determinar el grado de inactivación de la enzima hidrolizante de la urea, por sí sola la actividad de la ureasa no representa un factor antinutricional pero de manera indirecta se utiliza para correlacionar la eliminación de otros factores antinutricionales generalmente termolábiles, los cuales se cree son inactivados de forma simultánea con la ureasa (Dudley-Cash, 2003; Elizalde *et al.*, 2009; Yubero, 2013)..

La tabla 18 detalla los resultados de la actividad de la ureasa; en el estado amargo se obtuvo valores de 0,025; 0,015 y 0,005 para las variedades Chimborazo, Tunkahuan y LPQE-4 respectivamente. Para la soya se ha determinado rangos de valores de entre de 1,8 a 2,1 unidades de pH y para el chocho valores de entre 0,58 a 0,72 (Fernandez, 2017; Pariona, 2016). Cantidades relativamente superiores en comparación con las determinadas para la quinua.

Durante el proceso de desaponificación no se observaron diferencias significativas en el contenido de la ureasa (Figura 20^b). Martínez & Suárez (2010) señalan que un grado de inhibición bajo puede sugerir que el proceso de eliminación de antinutrientes no fue adecuado, lo que indicaría que la desaponificación no fue suficiente para la reducción de los inhibidores de tripsina, aspecto que en esta investigación no fue cierto. La nula inhibición puede deberse al método empleado en la desaponificación, el cual es un método mecánico realizado a temperatura ambiente. Olguin *et al.*, (2001) mencionan que los procesos con calor son más efectivos para disminuir la actividad de la ureasa.

En la fermentación se evidenció que la actividad de la ureasa aumento, Villacrés *et al.*, (2020) han observado resultados diferentes, durante la fermentación con *Lupinus mutabilis sweet* la actividad de la ureasa se redujo hasta un 93,75%. El aumento observado en este estudio no necesariamente debe estar relacionado con la mala eliminación de los compuestos antinutricionales. Ghosh & Ray (2011) mencionan que *Rhizopus spp.* secreta una amplia variedad de enzimas entre ellas: amilasas, lipasas y ureasas, las cuales juegan un papel durante la penetración de los micelios fúngicos y los cambios en las propiedades físicas y químicas en la FES (Pedizzi *et al.*, 2017; Varzakas *et al.*, 1997).

Nazareth *et al.*, (2018) también informó que *Rhizopus oligosporus* sintetiza enzimas ureasas y además el aumento en los iones metálicos Fe^{2+} y $Zinc^{2+}$ (Tabla 9) que son cofactores de la enzima ureasa pudo también influir (Schlegel, 1979; Trevan *et al.*, 1990; Wilseman, 1991). La secreción de la enzima ureasa por parte del hongo, así como la presencia de sus cofactores pudo aumentar la actividad de la ureasa, además como se detalla más adelante pese a que la actividad de la ureasa se incrementó, la cantidad de inhibidores de tripsina no varió. Por otro lado, Moreno & Suárez (2010) no encontraron una buena correlación entre la actividad ureasa y los inhibidores de tripsina-

Las variedades amargas y desaponificadas de Tunkahuan así como Chimborazo amarga, fueron las quinuas con menor actividad de ureasa (Figura 18) sin embargo la FAO establece que alimentos con valores entre 0,05 a 0,30 unidades de pH de actividad ureásica son alimentos que han recibido un procesamiento adecuado, pese al aumento encontrado durante la fermentación en las demás variedades, todas las muestras de quinua evaluadas, cumplen con este criterio por lo que se puede decir que son aptas para el consumo.

Inhibidores de Tripsina

La cantidad de inhibidores de tripsina durante el procesamiento de la quinua disminuyó, el contenido de inhibidores de tripsina se expresa en la tabla 18. Entre los factores de estudio, genotipo y estado, así como entre sus interacciones se encontraron diferencias altamente significativas (Tabla 21), esto indica que tanto el proceso de fermentación y desaponificación influyen en el contenido de inhibidores de tripsina.

Tabla 21

Análisis de la varianza para Inhibidores de Tripsina

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	0,693935	2	0,346967	34,56	<0,0001**
B:Estado	0,798159	2	0,39908	39,75	<0,0001**
C:Bloque	0,0600281	2	0,030014	2,99	0,0789
INTERACCIONES					
AB	0,248326	4	0,062082	6,18	0,0033 *
RESIDUOS	0,160626	16	0,010039		
TOTAL	1,96107	26			

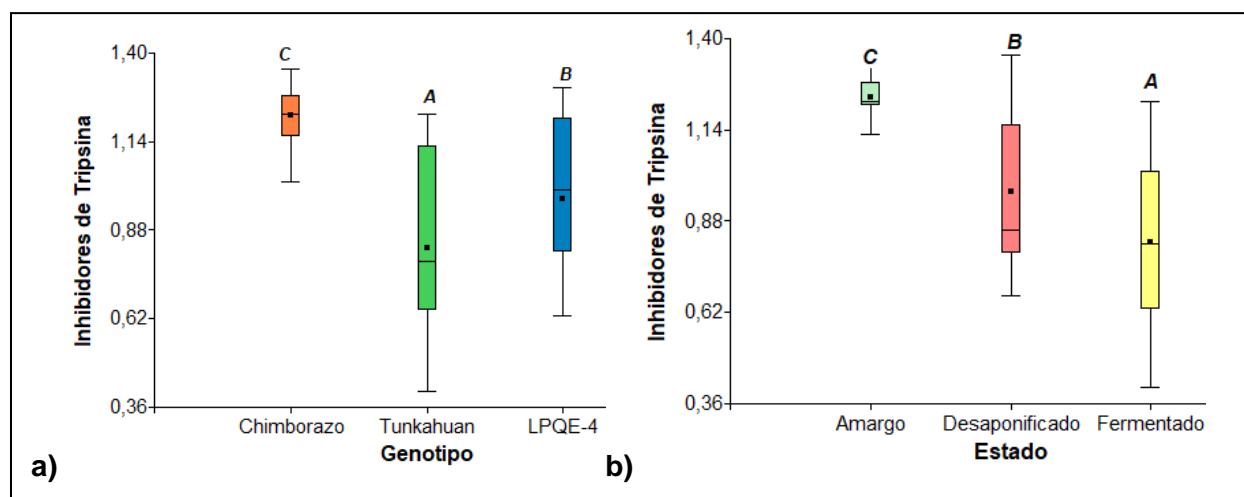
Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$)

El contenido de inhibidores de tripsina varió significativamente entre los diferentes genotipos y estados de la quinua, el estado fermentado fue en el que se obtuvieron los valores más bajos de Inhibidores (Figura 21^b), el descenso de los inhibidores se dio de manera

progresiva decreciente partiendo por el estado crudo o amargo donde se evidenciaron las cantidades más altas de inhibidores, aproximadamente se redujo hasta un 55,5% la actividad inhibitoria de tripsina, siendo INIAP-Tunkahuan en estado fermentada (Figura 21^a), la quinua con las pérdidas más considerables (0,52 TI mg/g).

Figura 21

Efecto de la fermentación en la cantidad de inhibidores de tripsina de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados ascendentemente. La letra (a) indica la menor cantidad de ureasa.

En la quinua se han encontrado varias sustancias antinutricionales, como saponinas, ácido fítico, taninos e inhibidores de la proteasa que pueden tener un efecto negativo en la supervivencia y rendimiento de los animales monogástricos cuando son utilizados como fuente primaria de energía dietética (González *et al.*, 1989; Importa & Kellems, 2001). La cantidad de inhibidores de proteasa en la quinua es menor a 50 ppm (T. Ahamed *et al.*, 1998). según Importa & Kellems, (2001) las concentraciones de inhibidores de tripsina son mucho menores que los determinados en los granos de uso común y, por lo tanto, no representan un problema.

Durante la desaponificación se observó una disminución significativa en los inhibidores de tripsina (hasta un 17% menos), entre la línea LPQE-4 y variedad Tunkahuan el porcentaje de disminución de TIA fue mayor que en la variedad Chimborazo (Figura 18), según Tawali *et al.*, (1998). un porcentaje considerable de Inhibidores de tripsina se filtran o destruyen durante el remojo y la cocción. Reddy & Pierson, (1994) obtuvieron resultados similares en la soja, al cocerlos encontraron que el TIA un 86% que su componente crudo.

La fermentación de la soja con *Rhizopus oligosporus* también ha demostrado disminuir la actividad residual del inhibidor de tripsina obteniendo un tempeth con aproximadamente un 9% de actividad inhibidora de tripsina residual (Reddy & Pierson, 1994). Todas las variedades mostraron menor contenido de TIA en su componente fermentada (Figura 21^b) Reddy & Pierson, (1994) mencionan que la reducción de la actividad los inhibidores de tripsina pueden deberse a la hidrólisis producida los hongos teme durante la fermentación. Ranjan *et al.*, (2019) y Rui *et al.*, (2017) informan de resultados similares, no se conoce aún a ciencia cierta que ocasiona la variación en los resultados de TIA sin embargo a pesar del efecto antinutricional, el ácido fítico y los inhibidores de proteasa también pueden tener efectos benéficos para la salud (Anderson & Wolf, 1995), como la supresión de carcinógenos (Kennedy, 1995).

Taninos

En el procesamiento de la quinua se encontró variaciones en la concentración de los taninos, la tabla 22 indica que los genotipos de quinua, sus diferentes estados, y la interacción entre ellos, muestran diferencias altamente significativas, es decir tanto la desaponificación como la fermentación parecen influir en los taninos.

Tabla 22*Análisis de la varianza para taninos*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	46,1581	2	23,0791	91,8	<0,0001**
B:Estado	1359,97	2	679,987	2704,87	<0,0001**
C:Bloque	0,331148	2	0,165574	0,66	0,531
INTERACCIONES					
AB	284,277	4	71,0693	282,7	<0,0001**
RESIDUOS	4,0223	16	0,251394		
TOTAL	1694,76	26			

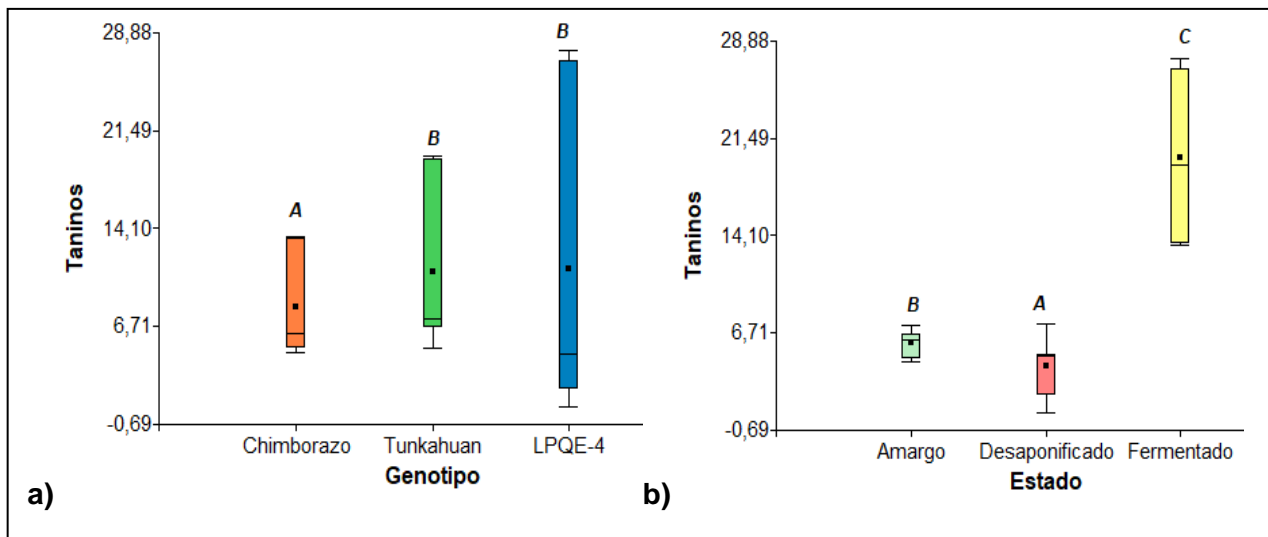
Nota. Valores-p marcados con (*) indican diferencia significativa mientras que valores marcados con (**) representan diferencia altamente significativa.

La etapa de fermentación aumento la cantidad de taninos presentes en la quinua, mientras que la desaponificación los disminuyó (Figura 22^b), la cantidad de taninos perdidos durante la desaponificación se compensaron considerablemente durante el periodo de fermentación, aumentándose hasta 25,15 (mg/100 g).

La línea LPQE-4 represento los cambios más considerables tanto en el proceso de desaponificación como fermentación, durante el proceso de desaponificado la cantidad de taninos disminuyó considerablemente en esta variedad siendo la más baja entre todas las muestras de quinua en sus diferentes estados, pero posterior a la fermentación fue la quinua con el nivel más alto de taninos (Figura 22^a),

Figura 22

Efecto de la fermentación en la cantidad de taninos de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados ascendentemente. La letra (a) indica la menor cantidad de ureasa.

Los taninos condensados son los polifenoles más predominantes en cereales y legumbres, estos forman complejos mediante enlaces carbono- carbono con las proteínas de la dieta y las enzimas digestivas ocasionando la insolubilidad de las proteínas y la inactivación de las enzimas, también pueden formar complejos con el hierro ionizable absorbido (Reddy *et al.*, 1985; Salunkhe *et al.*, 1990; Singh & Eggum, 1984). En los alimentos infantiles los factores que afectan la digestibilidad de la proteína son importantes (Ruales & Nair, 1993b), la menor eficiencia alimenticia, producida por la depresión del crecimiento y menor absorción de hierro podría ser más notoria en este grupo, que necesita mayor cantidad de nutrientes (Reddy *et al.*, 1985; Reddy & Pierson, 1994; Salunkhe *et al.*, 1990).

En este estudio se tuvo una concentración de entre 4-6 mg/ 100 g de base seca para los granos amargos de quinua, Chauhan *et al.*, (1992), informaron concentraciones de 0,53 g

de taninos en semillas enteras de quinua. Mientras que Ruales & Nair, (1993b) no encontraron niveles detectables de taninos en la quinua cruda entera, la quinua cruda pulida y la quinua lavada. Un nivel del 0,5% de taninos en el grano se considera bajo (FAO/WHO, 1996). Los taninos condensados están presentes principalmente en las cubiertas, las capas externas y testa de las semillas y el salvado (Reddy *et al.*, 1985; Salunkhe *et al.*, 1990), factor que explica la reducción encontrada durante el proceso de desaponificado del cual LPQ3-4 fue la quinua con menor contenido de taninos (Tabla 18). Reddy & Pierson, (1994) informaron una reducción del 90% de estos compuestos durante la cocción y descascarillado de la quinua.

Las composiciones de nutrientes y antinutrientes en las plantas alimenticias pueden variar, dependiendo de la variedad, las condiciones de cultivo, el color de la cubierta de la semilla o capa exterior (Reddy & Pierson, 1994; Ruales & Nair, 1993b). Lo que explicaría las diferencias encontradas entre los distintos genotipos de quinuas (Figura 23^a). La cantidad de taninos reportados en la quinua son menores a los reportados para arroz (1,3%), frijol negro y verde (1,1%) y la cebada (0-12%) (D. Kaur & Kapoor, 1992; Kent, 1984). Gorinstein *et al.*, (2008) informó una cantidad de taninos de 0.05% abs en quinua, cuyo valor es comparable al del amaranto.

A pesar de que la línea LPQE-4 presento los niveles más bajos de taninos, durante la fermentación, esta variedad aumento su contenido significativamente sobre las variedades INIAP-Tunkahuan y Chimborazo fermentados. El aumento según Toor *et al.*, (2021) se debe a la hidrólisis enzimática de taninos condensados, contrariamente Paredes-López & Harry, (1989) reportaron 100% de pérdida de taninos en soya durante la preparación del tempe. Toor *et al.*, (2021) informaron resultados similares en la fermentación de garbanzo kabuli donde los valores se redujeron un 16%, al parecer los taninos pueden degradarse por el polifenol oxidasa y/o las enzimas tanasas que se producen durante la fermentación (James *et al.*, 2020).

Anteriormente se detalló que durante la fermentación de la quinua la cantidad de actividad de la ureasa se vio aumentada, Fernando & Roberts, (1976) encontraron que los taninos tienen potencial como inhibidores de la ureasa, el aumento entonces en la cantidad de taninos podría ser beneficiosa para contrarrestar la actividad de la ureasa, si bien esta no representa por si sola un factor antinutricional, su acción puede aumentar el pH y con ello mejorar el medio para proliferar ciertos microorganismos (Modolo *et al.*, 2015).

Ácido Fítico

La cantidad de ácido fítico no varió durante el procesamiento de la quinua, como detalla la Tabla 23, las diferencias encontradas entre los genotipos, estados y las interacciones entre ellos, no fueron significativas estadísticamente, lo que sugiere que tanto la fermentación y desaponificación no causaron un impacto considerable en la cantidad de ácido fítico.

Tabla 23

Análisis de la varianza para ácido fítico

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	0,0520765	2	0,0260383	1,49	0,2553
B:Estado	0,0215195	2	0,0107598	0,62	0,5528
C:Bloque	0,0171171	2	0,00855855	0,49	0,6219
INTERACCIONES					
AB	0,115002	4	0,0287505	1,64	0,212
RESIDUOS	0,279839	16	0,0174899		
TOTAL	0,485554	26			

Nota. Valores-p marcados con (*) indican diferencia significativa mientras que valores marcados con (**) representan diferencia altamente significativa.

El ácido fítico o fitato se une a los minerales y proteínas lo que hace que no estén disponibles para el metabolismo, se encuentra en regiones discretas de tubérculos, raíces, cereales y legumbres, donde representa hasta 85% del fósforo total además forma enlaces estables entre las enzimas (alfa-amilasa, tripsina, beta galactosidasa, pepsina) disminuyendo

su actividad (Ahamed *et al.*, 1998; Khattak *et al.*, 2007; Reddy & Pierson, 1994). Koziol (1992) informó rangos de 10,5 a 13,5 mg g⁻¹ de ácido fítico para cinco variedades diferentes de quinua, Taylor & Parker, (2002) informa que la quinua contiene aproximadamente un 1 % de ácido fítico, en este estudio se encontraron cantidades relativamente menores, pero en concordancia con los valores reportados por Ruales & Nair, (1993b) 1,04 + 0,08 g/100. Las cantidades mínimas de ácido fítico para evitar efectos negativos sobre la absorción de hierro y zinc según Sandberg (1990) son de 10 y 50 mg por comida, respectivamente, cantidades que poseen todas las muestras estudiadas.

Toor *et al.*, (2021) y Tawali *et al.*, (1998) mencionaron que, durante la fermentación, el remojo y la cocción los inhibidores de tripsina y el ácido fítico se reducen, dicha reducción estaría asociada a la actividad de las fitasas endógenas presentes en el hongo durante el proceso de fermentación las cuales hidrolizan el fitato (Reddy & Pierson, 1994). Sin embargo, aquí no se observó disminución en el contenido de ácido fítico ni en el proceso de fermentación y ni en el proceso de desaponificación. El ácido fítico en la quinua no solo se encuentra presente en las capas externas como en el trigo y el centeno, sí no que se distribuye homogéneamente en el endospermo (Ahamed *et al.*, 1998; Khattak *et al.*, 2007), por lo tanto, no puede esperarse la misma reducción como el caso de los inhibidores de tripsina, además Graffham *et al.*, (1995) encontró que *Rhizopus spp.* no podía utilizar ácido fítico como única fuente de carbono y energía.

Ranhotra, (1973) sugiere que la disminución en la hidrólisis del ácido fítico durante la elaboración del pan se debía a la refosforilación del fitato parcialmente hidrolizado o mayor inhibición de la fitasa. McKenzie-Parnell & Davies, (1986) también encontraron poca o ninguna reducción en la cantidad de fitato en panes integrales y el salvado sin levadura, siendo así que los cereales integrales mostraban una hidrólisis baja cuando se fermentaban en la producción de kenkey (maíz fermentado) y rabadi (alimento de mijo perla fermentado) (Amoa & Muller,

1976; Dhankher & Chauhan, 1987). Reddy & Pierson (1994) durante una fermentación de 9 h observó una reducción máxima (27,1 %) de fitato en rabadi. Por lo que talvez con un tiempo de fermentación mayor podría observarse reducciones en la quinua fermentada.

Suparmo & Markakis, (1987) obtuvieron mejores resultados con el uso de semillas germinadas. A pesar del efecto antinutricional en el ácido fítico también se han encontrado efectos positivos para la salud, como la supresión de la carcinogénesis (Anderson & Wolf, 1995; Kennedy, 1995). Las fermentaciones en el tempe con micelio envejecido y micelio en crecimiento activo han provocado diferencias en la liberación de enzimas (Chemical and Enzymic Changes During, Ruiz-Teran) señala que es probable que esto, explique los informes contradictorios con respecto a la capacidad de los hongos en la FES para utilizar compuestos como la rafinosa, la estaquiosa y el ácido fítico.

Componentes Funcionales

En la tabla 24 se representan los resultados de los compuestos funcionales de las quinuas Chimborazo, Tunkahun y LPQE-4 en los estados amargo, desaponificado y fermentado, se presenta la media \pm la desviación estándar.

Figura 23

Diagrama del contenido de compuestos funcionales en la quinua

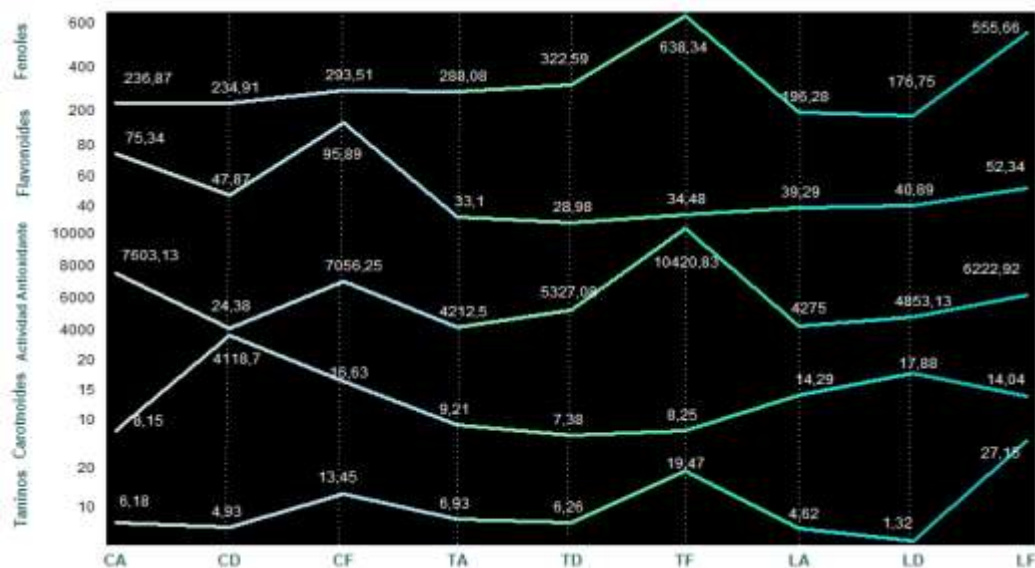


Tabla 24

Factores funcionales de los genotipos de quinua en sus diferentes estados

	Estado	Fenoles	Flavonoides	Actividad antioxidante	Carotenoides
Chimborazo	Amargo	236,87±1,68 ^D	75,34±0,34 ^B	7.603,13±5,2 ^B	8,15±0,63 ^C
	Dulce	234,91±2,80 ^D	47,87±3,09 ^{CD}	4.118,70±0,05 ^H	24,38±1,0 ^A
	Fermentado	293,51±2,82 ^C	95,89±2,59 ^A	7.056,25±4,9 ^C	16,63±2,25 ^B
Tunkahuan	Amargo	288,08±2,59 ^C	33,10±2,06 ^{FG}	4.212,50±5,0 ^{GH}	9,21±1,06 ^C
	Dulce	322,59±1,09 ^C	28,98±0,7 ^G	5.327,08±6,3 ^E	7,38±1,94 ^C
	Fermentado	638,34±2,02 ^A	34,48±2,06 ^{EFG}	10.420,83±4,3 ^A	8,25±1,52 ^C
LPQE4	Amargo	196,28±2,39 ^E	39,29±3,12 ^{EF}	4.275,00±2,9 ^G	14,29±0,64 ^B
	Dulce	176,75±3,69 ^E	40,89±0,23 ^{DE}	4.853,13±6,88 ^F	17,88±0,66 ^B
	Fermentado	555,66±3,56 ^B	52,34±3,43 ^C	6.222,92±5,08 ^D	14,04±0,26 ^B

Nota. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Carotenoides (ug/100g), actividad antioxidante (umol eqq trolox/1000g), flavonoides (mg/100g muestra), fenoles (mg/100g) y taninos (mg/100g muestra). La letra (a) indica la mayor cantidad.

Fenoles

La cantidad de fenoles se vio influenciada por los procesos de fermentación y desaponificación, existieron diferencias significativas entre las variables de estudio genotipos y estado, así como entre sus interacciones (Tabla 25). el contenido compuesto fenólicos se expresa en la tabla 24.

Las mayores concentraciones de compuestos fenólicos (CF) se encontraron en la quinua fermentada, la FES parece influir positivamente en el porcentaje de fenoles, entre el estado amargo y desaponificado, la cantidad de CF fue similar (Figura 24^b). INIAP-Tunkahuan fue la variedad durante los tres estados de la quinua, con los valores más altos de CF (Figura 24^a), la línea LPQE-4 durante el proceso de desaponificación sufrió una pérdida considerable de fenoles, pero con la fermentación aumento su concentración en un 183% más que su nivel inicial. El genotipo tunkahuan fermentado fue la variedad con mayor cantidad de fenoles.

Tabla 25

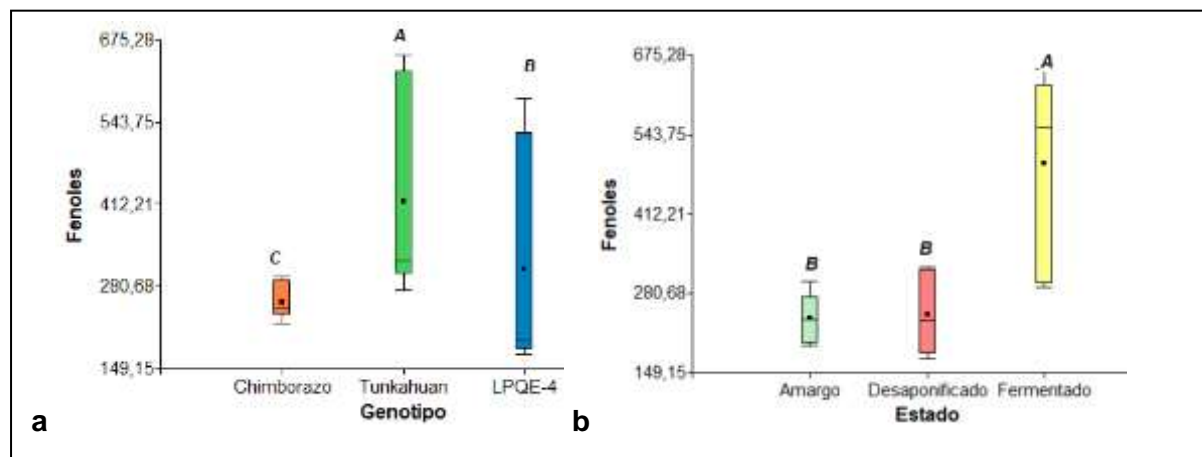
Análisis de la varianza para los compuestos fenólicos

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	121097	2	60548,7	357,96	<0,0001**
B:Estado	384914	2	192457	1137,78	<0,0001**
C:Bloque	4,18622	2	2,09311	0,01	0,9877
INTERACCIONES					
AB	118407	4	29601,8	175	<0,0001**
RESIDUOS	2706,42	16	169,151		
TOTAL	627129	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Figura 24

Efecto de la fermentación en la cantidad de fenoles de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados decrecientemente. La letra (a) indica la mayor cantidad de fenoles.

Flavonoides

Los flavonoides se vieron influenciados positivamente por el proceso de fermentación, mientras que el proceso de eliminación de saponinas disminuyó su contenido. Entre los factores de estudio, genotipo y estado, así como entre sus interacciones el p-valor calculado

fue menor a 0,0001 (Tabla 26) es decir que se encontraron diferencias altamente significativas, lo que indica que la cantidad de flavonoides se ve afectada durante el proceso de eliminación de saponinas y fermentación.

Tabla 26

Análisis de la varianza para los flavonoides

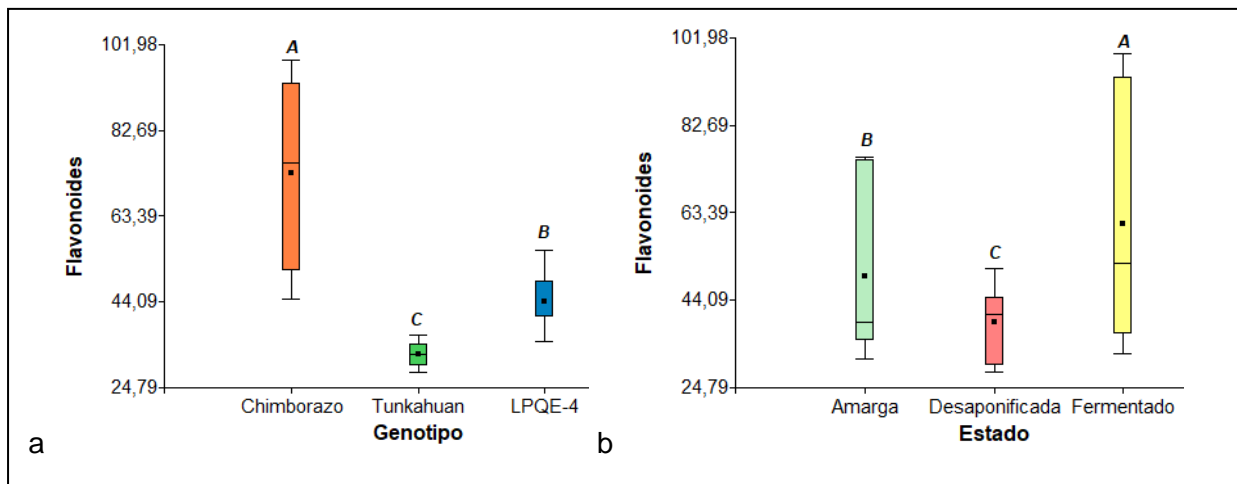
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	7935,11	2	3967,55	665,47	<0,0001**
B:Estado	2113,91	2	1056,96	177,28	<0,0001**
C:Bloque	12,9174	2	6,4587	1,08	0,3621
INTERACCIONES					
AB	1721,46	4	430,364	72,18	<0,0001**
RESIDUOS	95,3926	16	5,96204		
TOTAL	11878,8	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Las mayores concentraciones de flavonoides correspondieron a las quinuas fermentadas (Figura 25^b), durante el proceso de eliminación de saponinas, se evidenció reducciones significativas en la concentración final de flavonoides los tres genotipos (Figura 25^a), la variedad Chimborazo, a pesar de perder aproximadamente 32% de flavonoides durante la desaponificación fue la quinua con mayor contenido de flavonoides durante las tres etapas del procesamiento. Por otro lado, la línea LPQE-4 tuvo aumentos reducidos tras la fermentación (21,7%) en comparación con los otros genotipos.

Figura 25

Efecto de la fermentación en la cantidad de flavonoides de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados decrecientemente. La letra (a) indica la mayor cantidad de flavonoides.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante varió durante los procesos de fermentado y desaponificado, la cantidad de actividad antioxidante se expresa en la tabla 25, se observó diferencias altamente significativas entre los factores de estudio genotipos (p -valor 0,0001) y estado (p -valor 0,0001) así como entre sus interacciones (p -valor 0,0001), no hubo diferencias entre los bloques (p -valor 0,065), En la tabla 27 se presenta el análisis estadístico ANOVA.

Durante el proceso de fermentación la actividad antioxidante aumentó (Figura 27^b), el grano crudo de los genotipos Tunkahuan y LPQE-4 al inicio de la desaponificación tuvieron concentraciones similares, sin embargo, la fermentación afectó de manera heterogénea a cada variedad, aunque todas incrementaron el contenido total de actividad antioxidante, el mayor aumento se dio en INIAP-Tunkahuan. En la desaponificación solo el genotipo Chimborazo mostro menos actividad antioxidante, mientras las otras dos variedades (LPQE-4 y Tunkahuan)

presentaron cantidades superiores (Figura 23). Al parecer tanto los procesos de fermentación y desaponificación afectan de manera distinta a los genotipos de quinua.

Tabla 27

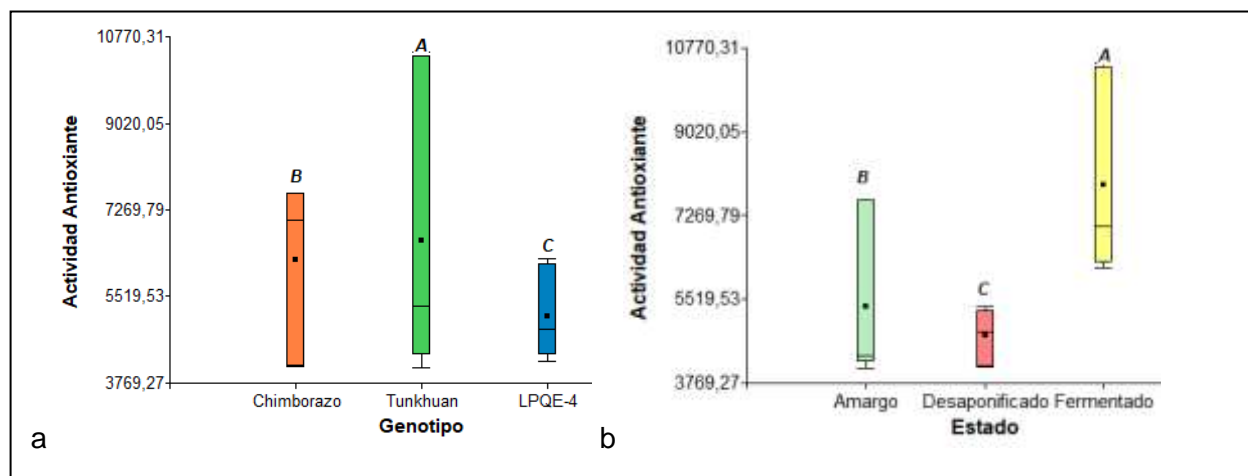
Análisis de la varianza para la actividad antioxidante

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	1224,75	2	612,374	2195,06	<0,0001**
B:Estado	4901,76	2	2450,88	8785,2	<0,0001**
C:Bloque	0,784465	2	0,392233	1,41	0,2738
INTERACCIONES					
AB	4326,87	4	1081,72	3877,42	<0,0001**
RESIDUOS	4,46365	16	0,278978		
TOTAL	10458,6	26			

Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Figura 26

Efecto de la fermentación en la cantidad de actividad antioxidante de la quinua (Factor A y Factor B)

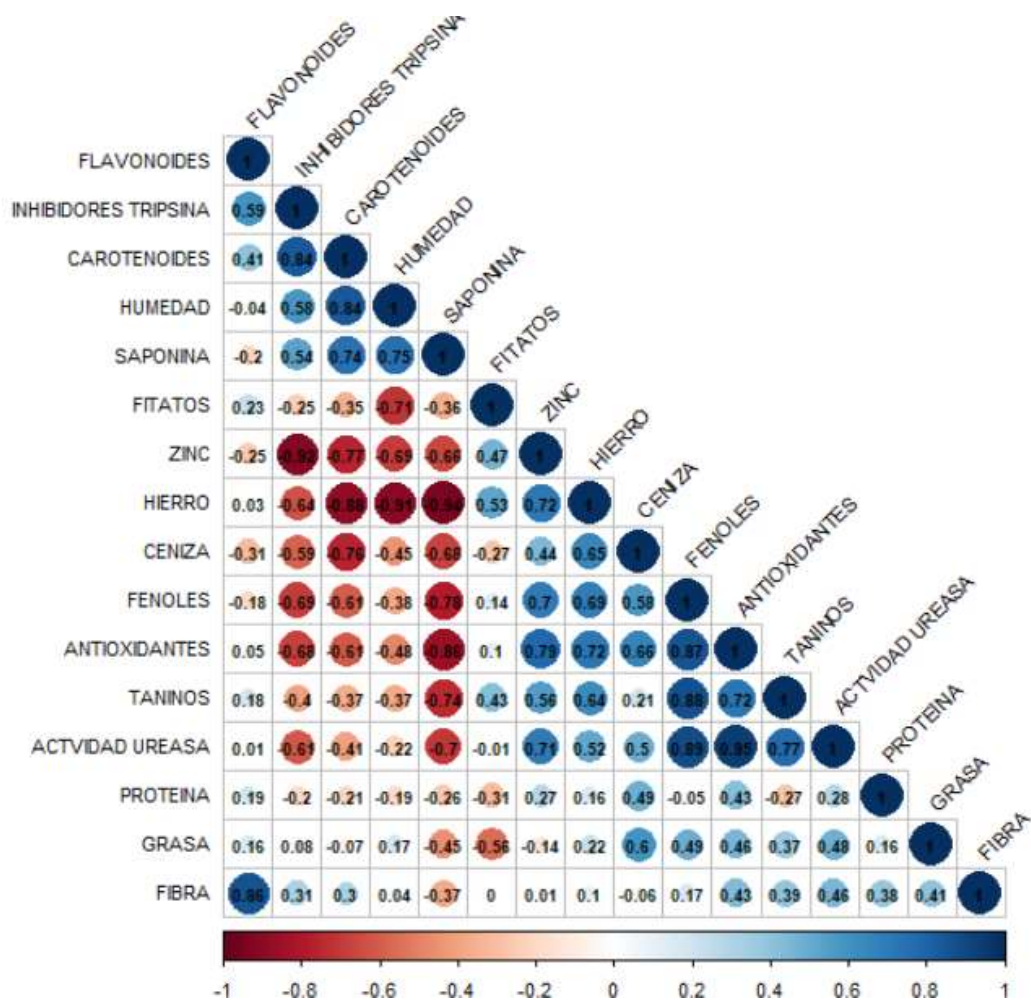


Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados decrecientemente. La letra (a) indica la mayor cantidad de actividad antioxidante.

Análisis de componentes principales

Figura 27

Diagrama de correlación de nutrientes, antinutrientes y compuestos funcionales de la quinua



Nota. Diagrama de correlación de nutrientes, antinutrientes y compuestos funcionales de la quinua, ajustados por genotipo y estado (desaponificado y fermentado). Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para calcular los coeficientes de correlación. Los colores azul y rojo indican correlaciones positivas y negativas respectivamente y la intensidad del color y el tamaño del círculo son proporcionales a los coeficientes de correlación. Todos los factores analizados se expresan en las unidades descritas anteriormente.

Como se detalla en la Figura 27, La actividad antioxidante esta correlacionada con una mayor cantidad de compuestos fenólicos y taninos (seguramente debido a su capacidad de

donación de electrones), pero se asocia negativamente al porcentaje de saponinas. A su vez los taninos y fenoles mostraron una fuerte asociación positiva, es decir, a mayor cantidad de fenoles la cantidad de taninos también aumenta, cabe recalcar que esta no es una relación de causalidad. Por el contrario, el hierro está relacionado con una menor cantidad de saponina y el zinc se asoció negativamente con la cantidad de inhibidores de tripsina, el aumento de la cantidad de estos dos minerales no se correlaciono con la cantidad de ácido fítico. El ácido fítico y las saponinas también se consideran componentes bioactivos; sin embargo, no se encontró una correlación significativa con las actividades antioxidantes en el presente estudio.

Fenoles, flavonoides y actividad antioxidante

Estudios epidemiológicos han informado los beneficios del consumo regular de legumbres, pseudocereales, entre otros, como medios para la prevención del cáncer de colon, enfermedad coronaria, diabetes y osteoporosis. Tales beneficios están influenciados por los aminoácidos, las vitaminas, los péptidos bioactivos y los compuestos fenólicos (Pasquale *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2018; Zalles & de Lucca, 2006). En la quinua los fenoles son los fitoquímicos no nutritivos y antioxidantes más estudiados (Melini & Melini, 2021). Los brotes de quinua y sus semillas se pueden utilizar como alimento, en parte debido a su alto contenido de antioxidantes, fenoles totales y antocianinas (Paško *et al.*, 2009). Los estudios recientes se han centrado en los compuestos bioactivos hidrofílicos, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y la actividad antioxidante de la quinua, pruebas *in vitro* han resaltado el potencial de la quinua en la salud, sin embargo, las pruebas *in vivo* en modelos animales y humanos aún son escasas (Isam *et al.*, 2021; Lazarte *et al.*, 2015; Pellegrini *et al.*, 2018; Repo-Carrasco-Valencia *et al.*, 2010).

La cantidad de compuestos fenólicos encontrados para la quinua son similares a los reportados para el arroz y el maíz y superiores a los del trigo y cebada (Asao & Watanabe, 2010; Repo-Carrasco-Valencia *et al.*, 2010). Hur *et al.*, (2018) han informado de

concentraciones en quinua de 1,4 mg de ácido gálico (GAE)/ 100 g para los compuestos fenólicos y de 13 mg de quercetina equivalente (QE)/ 100 g para los flavonoides. En este estudio se han encontrado valores superiores a los reportados anteriormente, sin embargo, la gran variabilidad en el perfil de los fenoles se atribuye a factores como la genética, las condiciones de cultivo, la molienda, la cocción, el procesamiento posterior a la cosecha y también los procedimientos analíticos para la extracción fenólica (Koch, 2019; Paz *et al.*, 2020). Factores que podrían explicar las diferencias encontradas entre la cantidad de fenoles y flavonoides encontradas entre los genotipos, de los cuales INIAP-Tunkahuan y la variedad Chimborazo tuvieron los valores más altos en CF y flavonoides respectivamente (Figura 29^a y 30^a).

La cantidad de compuestos fenólicos fue similar en el estado amargo y dulce (desaponificado) de las quinuas (Figura 24^b), sin embargo, el porcentaje de flavonoides se vio notoriamente reducido en la variedad Chimborazo y en menor medida la variedad Tunkahuan (Figura 23). Probablemente la disminución observada se deba a que, en la quinua estos compuestos se encuentran en gran medida como ésteres insolubles en las paredes celulares vegetales, formando complejos con proteínas y polisacáridos, y el lavado y la manipulación disminuya su contenido (Xiao *et al.*, 2014). Contrariamente la línea LPQE-4 aumento ligeramente el contenido de flavonoides, posiblemente en este genotipo los flavonoides se liberaron durante el secado (tratamiento térmico), el cual se correlacionó con el aumento en la actividad antioxidante. La elevada pérdida de humedad en este genotipo durante el proceso de secado también pudo ser un factor de influencia (Filho *et al.*, 2017).

La fermentación se puede utilizar para elevar la cantidad de compuestos fenólicos, el uso de granos y harinas de quinua fermentadas ha permitido obtener pasta, pan y yogurt más ricos en CF los cuales poseen mayor capacidad antioxidante (Carciochi *et al.*, 2016; Karovicona *et al.*, 2020; Lorusso *et al.*, 2017). Hur *et al.*, (2018) fermentaron la quinua con *Rhizopus*

oligosporus y obtuvieron cantidades superiores tanto de flavonoides (1,9 mg QE/ 100 g) como fenoles (8 mg GAE/ 100 g), Resultados similares fueron informados por Toor *et al.*, (2021) quien encontró que en soja los compuestos fenólicos se incrementan hasta un 482% (870 mg/ 100 g GAE) y en garbanzos 52% (324 mg/ 100 g GAE), mientras que los flavonoides aumentaron 1140 (mg/ 100 g QE) y 3310 (mg/ 100 g QE) respectivamente.

En los granos principalmente, los compuestos fenólicos se encuentran conjugados como esterres insolubles con proteínas, ácidos grasos o azúcares (Xiao *et al.*, 2015). Durante la fermentación estos compuestos se convierten en sus formas libres, por medio de la actividad de las enzimas (reductasa, β -glucosidasa, descarboxilasas, β -glucuronidasa, xilanasas, hidrolasa y esterasas), ruptura de los enlaces con los componentes de la pared celular del grano y los procesos metabólicos de los microorganismos fermentadores, los cuales además hidrolizan los enlaces glucosídicos y producen compuestos fenólicos unidos y formas de aglicona de mayor bioaccesibilidad y mayor capacidad antioxidante (Adebo & Medina-Meza, 2020; Huynh *et al.*, 2014; McCue & Shetty, 2003; F. Melini & Melini, 2021).

En este estudio la variedad Tunkahuan fermentada y Chimborazo fermentada (Figura 23) fueron las variedades con mayor contenido de fenoles y flavonoides respectivamente. El aumento del contenido de flavonoides, así como los compuestos fenólicos es de influencia en la eliminación de radicales DPPH, y una mayor actividad antioxidante en la quinua fermentada (Hur *et al.*, 2018; Kaur & Kapoor, 2002). Los compuestos fenólicos se correlacionan positivamente con las propiedades antioxidantes (Figura 27) debido a su capacidad de donación de electrones (Toor *et al.*, 2021). Hur *et al.*, (2018) al encontrar propiedades antioxidantes en la quinua fermentada, decidieron también evaluar la actividad antiinflamatoria, encontrando inhibición del óxido nítrico, y Kim *et al.*, (1999) reportó inhibición de las células RAW264.7 y disminución de la expresión de la enzima iNOS, Llegando a la conclusión de que el aumento del efecto antiinflamatorio de la quinua fermentada en comparación con la quinua

regular se debe al aumento del contenido de fenol y flavonoides. Xiao *et al.*, (2014) menciona que el contenido elevado de ácido clorogénico en los garbanzos fermentados era el principal contribuyente de la elevada actividad antioxidante producida. El efecto antioxidante de la quinua es mayor que el encontrado en granos integrales como: mijo, trigo, arroz, amaranto y cebada, además también se ha encontrado mayor actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (23,3%) en quinua (Asao & Watanabe, 2010; Paško *et al.*, 2009).

La influencia de los fenoles y flavonoides se vieron reflejados en la disminución de la actividad antioxidante en la variedad Chimborazo, la cual sufrió pérdidas tanto de CF como de flavonoides. Sin embargo, el aumento considerable de actividad antioxidante observado en los genotipos Tunkahuan y LPQE4 (Figura 23), sugiere que los fenoles y flavonoides no parecen ser los únicos compuestos antioxidantes presentes en la quinua Nsimba *et al.*, (2008) encontró resultados similares, y menciona que la mayor actividad antioxidante en las semillas puede provenir de compuestos no fenólicos como el ácido ascórbico, esteroides, carotenoides, ácido fítico, saponinas, tocoferoles, ecdisteroides, entre otros.

Otros autores como Abu-Salem *et al.*, (2014) han informado reducciones en los CF tras la fermentación, según Melini & Melini, (2021) el efecto positivo o negativo generalmente está asociado a la cepa microbiana utilizada, así como a las condiciones de tiempo y temperatura aplicadas, también puede ocurrir que otras moléculas de fenoles presentes en la matriz alimentaria, sean degradadas por las enzimas microbianas de la fermentación (Dimidi *et al.*, 2019; Gan *et al.*, 2017; Hur *et al.*, 2014; Terefe, 2016).

Producto de la fermentación se han identificado derivados de ácidos hidroxicinámico e hidroxibenzoico así como flavonoides en la quinua, entre los derivados del ácido hidroxibenzoico, se identificaron principalmente ácido vinílico, ácidos gálico y ácido protocatecúico, mientras que entre los derivados del ácido hidroxicinámico, se encontraron ferúlico, ácidos cafeico, p-cumárico y clorogénico. En tanto a los flavonoides se identificaron

mayoritariamente la catequina, la quercetina y el kaempferol, lo que prueba la presencia de CF tras la fermentación, sin embargo, el aumento o disminución de los compuestos según los autores depende de la duración de la FES (Melini & Melini, 2021). Siendo entonces este un factor de importancia.

Carotenoides

Los carotenoides se expresan en la tabla 25 como $\mu\text{g}/100\text{g}$, se observó diferencias altamente significativas entre los factores de estudio genotipos (p-valor 0,0001) y estado (p-valor 0,0001) así como entre sus interacciones (p-valor 0,0001), no hubo diferencias entre los bloques (p-valor 0,065), En la tabla 28 se presenta el análisis estadístico ANOVA

Tabla 28

Análisis de la varianza para los carotenoides

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
A:Genotipo	352,221	2	176,11	99,74	<0,0001**
B:Estado	163,581	2	81,7903	46,32	<0,0001**
C:Bloque	0,875591	2	0,437795	0,25	0,7834
INTERACCIONES					
AB	264,365	4	66,0913	37,43	<0,0001**
RESIDUOS	28,2522	16	1,76576		
TOTAL	809,294	26			

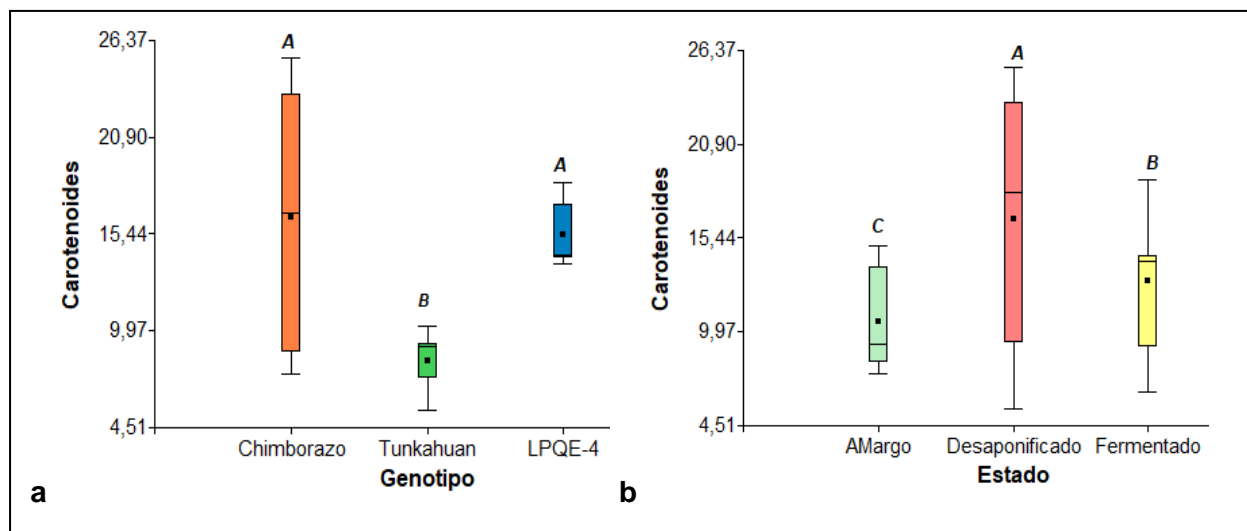
Nota. Los valores p con (*) representan diferencia significativa ($p < 0.05$), los valores con (**) diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Los carotenoides durante los procesos de fermentado y desaponificado, se vieron afectados de manera distinta, el estado dulce fue el que presentó las cantidades más altas de carotenoides (Figura 28^b), mientras que entre variedades los INIAP-Tunkahuan presentó las concentraciones más bajas de carotenoides y los genotipos Chimborazo y LPQE-4 concentraciones superiores y similares entre sí (Figura 28^a), la cantidad de carotenoides

durante la fermentación disminuyó. Únicamente en el genotipo Tunkahuan se observó el mecanismo inverso (Figura 23).

Figura 28

Efecto de la fermentación en la cantidad de carotenoides de la quinua (Factor A y Factor B)



Nota. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma letra ($p < 0.05$). Grupos ordenados decrecientemente.

La quinua es rica en micronutrientes como vitaminas y minerales (α -caroteno y niacina), contiene sustancialmente más riboflavina (B2), α -tocoferol (vitamina E) y caroteno que los cereales (arroz, cebada y trigo) (Agranoff, 1999; Koziol, 1992; Ruales & Nair, 1994; Vega-Gálvez *et al.*, 2010). En las plantas los carotenoides protegen la clorofila del daño fotoinducido pero en el cuerpo humano pueden ser transformados en vitaminas razón por la se denominan “provitaminas”, algunos carotenoides están relacionados con la actividad de la vitamina A, También pueden ser contribuyentes de la actividad antioxidante y reducir el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (Institute of Medicine; Food and Nutrition Board, 2000; Nsimba *et al.*, 2008). La ingesta recomendada de carotenoides es de 9 a 13mg/día (De la Rosa *et al.*, 2009).

Las cantidades totales de carotenoides de las semillas de quinua varían según el color de la semilla y la estructura genética, en este estudio la variedad Tunkahuan (9,25 ug/100g) y Chimborazo (8,19 ug/100g) presentaron cantidades inferiores de carotenoides que la línea LPQE-4 (14,13 ug/100g). En otros estudios se determinó para las semillas de quinua blanca, roja y negra cantidades de 11.87, 14.97 y 17.71 $\mu\text{g/g}$ de carotenoide total, respectivamente (Tang *et al.*, 2015; Zevallos *et al.*, 2014). En las hojas de quinua también se han encontrado carotenoides en cantidades de entre 4,3 y 19,5 $\mu\text{g/g}$ (Sharma *et al.*, 2012).

Durante el proceso de eliminación de saponinas y fermentación de tres variedades de chocho fermentadas con *R.oligosporus* se evidenció disminución (186,21 $\mu\text{g}/100\text{g}$) y aumento (545,36 $\mu\text{g}/100\text{g}$) respectivamente en el contenido de carotenoides. En quinua no se encontraron estudios similares, observándose un mecanismo diferente al descrito para el chocho, el proceso de eliminación de las saponinas, aumentó el contenido de carotenoides mientras que la fermentación lo disminuyó, posiblemente esto se deba a que *R.oligosporus* en la quinua utilice a los carotenoides como fuente de energía. El estado desaponificado de la Chimborazo fue la quinua con mayor contenido de carotenoides, las otras variedades presentaron concentraciones menores que 17 (ug/100g). Los efectos *in vivo* de los compuestos bioactivos de la quinua son escasos y, por lo tanto, se requieren, mayor investigación, el uso de modelos animales y ensayos en humanos aportaría información sobre la efectividad del procesamiento de la quinua y la cantidad de carotenoides (Isam *et al.*, 2021). Por su parte Nout & Kiers, (2005) atribuyen los efectos hipocolesterémicos del tempe a la proteína, fibra, sitosterol, isoflavonas, calcio, lecitina, niacina, ácidos grasos insaturados y carotenoides, pese a que estos últimos se encuentren en menor medida.

Capítulo V: Conclusiones

La quinua es un grano andino considerado como cultivo promisorio para la humanidad, la cantidad de proteínas, ceniza, fibra, grasa, fenoles, flavonoides, actividad antioxidante, hierro y zinc determinados para los tres genotipos de quinua estudiados (Chimborazo, INIAP-Tunkahua y LPQE-4), los cuales en su mayoría fueron superiores al de los cereales y las propiedades funcionales que se correlacionaron positivamente con la actividad antioxidante y los fenoles, destacan su alto valor nutritivo.

En contraste, la cantidad de antinutrientes que pueden afectar la biodisponibilidad y absorción de los nutrientes, entre los cuales destacan las saponinas, lograron disminuir considerablemente tras el proceso de lavado y desaponificado, la cantidad de saponinas disminuyó entre 82%-84%, los inhibidores de tripsina 1,5%; 32,9%; 32,4%, y los taninos 20,2%; 5,3% y 56,8%, para los genotipos Chimborazo, Tunkahuan y línea LPQE-4 respectivamente. El ácido fítico y la actividad de la ureasa no mostraron diferencias significativas por efecto de la desaponificación y fermentación. A pesar de la relativa efectividad del proceso para eliminar antinutrientes, la desaponificación redujo la cantidad de nutrientes, fenoles, flavonoides, actividad antioxidante, carotenoides, hierro y zinc en algunos genotipos.

La fermentación sólida con *R.oligosporus* tuvo un efecto significativo en los parámetros nutricionales, de antinutrientes y funcionales en los granos de quinua, el contenido total de fibra, ceniza, proteína, taninos, fenoles, flavonoides y actividad antioxidante mejoró después de la fermentación mientras el contenido de humedad, saponinas e inhibidores de tripsina disminuyó, lo que en consecuencia ayudó a mejorar el contenido de los nutrientes y minerales, encontrando mayor cantidad de hierro y zinc. A diferencia de los otros antinutrientes los taninos presentaron un aumento considerable, pero por sus propiedades benéficas, dicho aumento no necesariamente debe considerarse negativo. No se observaron cambios en los fitatos, y para el porcentaje de grasa y carotenoides los resultados fueron variables, mientras INIAP-Tunkahuan

y LPQE-4 aumentaron el contenido de extracto etéreo, el genotipo Chimborazo se redujo. En los carotenoides mientras INIAP-Tunkahuan aumentó, los genotipos Chimborazo y LPQE-4 disminuyeron. Los hallazgos heterogéneos encontrados en el comportamiento de la fermentación con los distintos genotipos y los parámetros estudiados parecen estar influenciados por la variedad, parámetros de la fermentación, entre otros, por tanto, la cinética y el mecanismo de la FES en quinua aun requieren mayor estudio.

En definitiva, la quinua es un alimento de alto valor nutricional y la FES un proceso efectivo de tratamiento, pues condujo a una composición nutricional y funcional superior, los compuestos minerales, ácidos grasos y antioxidantes ratifican la gran importancia de este grano como fuerte aporte antioxidante, además la disminución de los compuestos antinutricionales como saponinas e inhibidores de tripsina, cuya disminución ayuda a aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, constituyen al grano fermentado como un alimento promisorio saludable y valioso.

Capítulo vi: Recomendaciones

La información sobre el mecanismo de la fermentación en estado sólido de la quinua es mínima, por lo que conocer los mecanismos inmersos en la fermentación contribuirían para establecer y conocer los principios que generan los cambios en las propiedades nutricionales, funcionales y de antinutrientes, por lo que se recomienda, profundizar la investigación en este campo.

La eliminación de antinutrientes puede generarse por distintos métodos, sin embargo, muchos de ellos pueden contribuir a eliminar componentes nutricionales durante el proceso, el uso de la FES podría ser un buen método para disminuir antinutrientes y a la vez aumentar los compuestos funcionales.

Los datos sobre los efectos *in vivo* de los compuestos bioactivos de la quinua también son escasos, sería interesante probar biológicamente el efecto funcional y antioxidante encontrado tras la fermentación, pues con modelos *in vivo* muchas veces no se observan los mismos resultados debido a que hay muchos factores de influencia.

Debido al alto valor biológico determinado para la quinua en este estudio e innumerables investigaciones científicas, se recomienda promover la producción y el consumo de la quinua sobre todo en los países en desarrollo, ya que aportaría a potenciar la seguridad alimentaria.

La quinua fermentada, puede ser considerada como una fuente para el desarrollo de productos.

Las futuras investigaciones también pueden dirigirse a la búsqueda de nuevos microorganismos, como bacterias y levaduras para realizar el proceso de fermentación pues *R.oligosporus* no es el único hongo reportado para la FES.

Capítulo VII: Bibliografía

- AACC. (2000). American Association of Cereal Chemists. In *Method 22-90. (2000). Measurement of Urease Activity.* (pp. 22–90). <http://methods.aaccnet.org/summaries/22-90-01.aspx>
- Abugoch James, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 58, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Abu-Salem, F. M., Mohamed, R., Gibriel, A., & Rasmy, N. (2014). Levels of Some Antinutritional Factors in Tempeh Produced From Some Legumes and Jojobas Seeds. *World Academy of Science Engineering and Technology*, 8.
- Adebo, O. A., & Medina-Meza, I. G. (2020). Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040927>
- Adlercreutz, H., Hämäläinen, E., Gorbach, S. L., Goldin, B. R., Woods, M. N., Brunson, L. S., & Dwyer, J. T. (1987). Association of diet and sex hormones in relation to breast cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(11), 1725–1726.
- Agranoff, J. (1999). *The complete handbook of tempe : the unique fermented soyfood of Indonesia.* American Soybean Association.
- Ahamed, N., Singhal, R., Kulkarni, P., & Mohinder, P. (1998). A Lesser-Known Grain, *Chenopodium Quinoa*: Review of the Chemical Composition of its Edible Parts. *Food Nutr Bull*, 19(1), 61–70. <https://doi.org/10.1177/156482659801900110>

- Ahamed, T., Singhai, R., Kulkarni, P. R., & Mohlinder, P. (1998). A Lesser-Known Grain, *Chenopodium Quinoa*: Review of the Chemical Composition of its Edible Parts: *Food Nutr Bull*, *19*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1177/156482659801900110>
- Ahmad Fuzi, S. F., Koller, D., Bruggraber, S., Pereira, D. I. A., Dainty, J. R., & Mushtaq, S. (2017). A 1-h time interval between a meal containing iron and consumption of tea attenuates the inhibitory effects on iron absorption: a controlled trial in a cohort of healthy UK women using a stable iron isotope. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *106*(6), 1413–1421. <https://doi.org/10.3945/AJCN.117.161364>
- Aidi Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., ben Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.03.002>
- Ali, M., Shahzad, R., Bilal, S., Adhikari, B., Kim, I. D., Lee, J. D., Lee, I. J., Kim, B. O., & Shin, D. H. (2018). Comparison of antioxidants potential, metabolites, and nutritional profiles of Korean fermented soybean (Cheonggukjang) with *Bacillus subtilis* KCTC 13241. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(8), 2871–2880. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3202-2>
- Amaya, E. (2014). Carotenoids in animal nutrition. *Fefana Publication*.
<https://doi.org/10.1021/BI0492096>
- Amaya, J. (2015). Los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales para superar situaciones de estrés abiótico. *TERRALIA*.
https://www.infoagro.com/documentos/los_compuestos_fenolicos_como_antioxidantes_naturales_superar_situaciones_estres_abiotico.asp

Amoa, B., & Muller, H. (1976). Studies on kenkey with particular reference to calcium and phytic acid. *Cereal Chem*, 365–375.

<https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1976/Documents/CC1976a43.html>

Anderson, R. L., & Wolf, W. (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *Journal of Nutrition*, 125, 558–551.

A.O.A.C. (1964). *Association of official Analytical Chemist, 952.03, 1964. Métodos. Peer Verified Methods. Manual on Polices and Procedures*. Arlington, Estados Unidos.

A.O.A.C. (1980). Association of Official Agricultural Chemists. In *Official Methons of Analysisi*.

AOAC. (1996). Moisture in Animal Feed, Method 930.15. In Gaithersburg (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16a ed.).

Arevalo, S. (2017). *Agua En Los Alimentos* [Tesis de pregado, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana]. <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/5052>

Arts, I. C. W., van de Putte, B., & Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1746–1751.

<https://doi.org/10.1021/JF000025H>

Asao, M., & Watanabe, K. (2010). Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. *Food Science and Technology Research*, 16(2), 163–168.

<https://doi.org/10.3136/fstr.16.163>

Asociación Escuela de Estudiantes de Ingeniería Química. (2001). Revisiones de la Ciencia. In *Tecnología e Ingeniería en los alimentos* (Recitela, Vol. 1).

- Asres, D., Nana, A., & Nega, G. (2018). Complementary feeding and effect of spontaneous fermentation on anti-nutritional factors of selected cereal-based complementary foods. *BMC Pediatrics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1369-3>
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (C. Gómez, Ed.; 4a ed.). Pearson Educación. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/34/CXG_002e.pdf
- Badui, S., Bourges, H., & Anzaldúa, A. (1999). Proteínas. In *Química de los alimentos* (pp. 123–209). Edit. Pearson.
- Bajetta, E., Zilembo, N., Bichisao, E., Martinetti, A., Buzzoni, R., Pozzi, P., Bidoli, P., Ferrari, L., & Celio, L. (2000). Tumor response and estrogen suppression in breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 11(8), 1017–1022. <https://doi.org/10.1023/A:1008388823113>
- Banco Mundial. (2022). *Actualización sobre la seguridad alimentaria*. 8 de Abril de 2022. <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/brief/food-security-update>
- Bates, C., Lyon, A., Sorenson, B., Keller, B., & Jenkins, S. (1997). Utilization of tempeh . In *Symposium on Indigenous Fermented Foods*. Bangkok.
- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21–35. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00534>
- Belmiro, R. H., Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2020). Effects of High Pressure Processing on Common Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): Cotyledon Structure, Starch Characteristics, and Phytates and Tannins Contents. *Starch - Stärke*, 72(3–4), 1900212. <https://doi.org/10.1002/STAR.201900212>

- Berdonces, L. (1996). Toxicología alimentaria. *Natura Medicatrix: Revista Médica Para El Estudio y Difusión de Las Medicinas Alternativas*, 16–20.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4989351>
- Bernstein, P. S., Li, B., Vachali, P. P., Gorusupudi, A., Shyam, R., Henriksen, B. S., & Nolan, J. M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 50, 34–66.
<https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2015.10.003>
- Borlaug, N. E. (1992). Lighting fires at grass roots - Buscar con Google. In *Food Technol* (7th ed., Vol. 46, pp. 84–85).
- Bowsher, Caroline., Steer, M. W., & Tobin, A. K. (2008). *Plant biochemistry*. Garland Science.
- Bravo, M., Reyna, R., Gómez, P., & Huapaya, P. (2013). Estudio químico y nutricional de granos andinos germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*) y kiwicha (*Amarantus caudatus*). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 16(1), 54–60.
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/6558>
- Bregitzer, P., & Raboy, V. (2006). Effects of Four Independent Low-Phytate Mutations on Barley Agronomic Performance. *Crop Science*, 46(3), 1318–1322.
<https://doi.org/10.2135/CROPSC12005.09-0301>
- Brouns, F. (2022). Phytic Acid and Whole Grains for Health Controversy. *Nutrients*, 14(1).
<https://doi.org/10.3390/NU14010025>
- Brumovsky, L. (2014). *Propiedades funcionales de las proteínas propiedades emulsionantes y espumantes*. <https://docplayer.es/60140706-Trabajo-practico-no-3-propiedades-funcionales-de-las-proteinas-propiedades-emulsionantes-y-espumantes.html>

- Burgos, G., Salas, E., Amoros, W., Auqui, M., Muñoa, L., Kimura, M., & Bonierbale, M. (2009). Total and individual carotenoid profiles in *Solanum phureja* of cultivated potatoes: I. Concentrations and relationships as determined by spectrophotometry and HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 503–508.
<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2008.08.008>
- Buttazzoni, M. (1981). *Enzimas Proteolíticas de frutos de algunas especies de Bromelia (Bromeliaceae) que crecen en el país*. [Universidad Nacional de la Plata].
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2607/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Campos, M., Chel, L., & Betancur, D. (2013). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. OmniaScience. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.136>
- Carciochi, R. A., Galván-D'Alessandro, L., Vandendriessche, P., & Chollet, S. (2016). Effect of Germination and Fermentation Process on the Antioxidant Compounds of Quinoa Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 2016 71:4, 71(4), 361–367.
<https://doi.org/10.1007/S11130-016-0567-0>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones - Document - Gale Academic OneFile. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 22(2), 5–14.
<https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>
- Castro, E. (2010). *Harina y aceite de quínoa (Quenopodium quinoa Willd.) de la región VI*.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121448>
- Cazares, M. (2011). *Evaluación Físico-Química Y Farinográfica De La Harina De Trigo (Triticum Aestivum) Obtenida En Los Pasajes De Molienda De La Industria "MOLINOS"* [Tesis de pregrado, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO].
<http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/834>

- Chang, C. T., Hsu, C. K., Chou, S. T., Chen, Y. C., Huang, F. S., & Chung, Y. C. (2009). Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*(4), 799–806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01907.x>
- Chaquilla, G., Balandrán, R., Mendoza, A., & Mercado, J. (2018). *Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo*. *12*(2), 137–147. <http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v12n2/2007-7858-cuat-12-02-137.pdf>
- Chauhan, G., Eskin, N., & Tkachuk, R. (1992). Nutrients and Antinutrients in Quinoa Seed. *Cereal Chemistry Back Issues*, *69*, 85–88. <https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1992/Documents/CC1992a19.html>
- Chiluiza, F., & Saquina, S. (2017). *Diseño y construcción de un molino de bolas para aplicaciones de pulvimetalurgia en los Laboratorios de Ingeniería Mecánica de la Facultad de Ingeniería Civil y Mecánica de la Universidad Técnica de Ambato* [Tesis de pregrado, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26388>
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*(6), 421–464. <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>
- Cicero, A. F. G., & Colletti, A. (2017). Effects of Carotenoids on Health: Are All the Same? Results from Clinical Trials. *Current Pharmaceutical Design*, *23*(17). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170207095459>
- Comai, S., Bertazzo, A., Bailoni, L., Zancato, M., Costa, C. V. L., & Allegri, G. (2007). The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal

flours. *Food Chemistry*, 100(4), 1350–1355.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.10.072>

Corzo, D. (2008). *Análisis y Selección de Diferentes Métodos para Eliminar las Saponinas en dos Variedades de Chenopodium Quinoa Willd.* 153–164.

Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291–302.

<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.05.022>

Cozolino, M. (2009). *Biodisponibilidade de nutrientes*. <https://www.amazon.com/-/es/Silvia-Maria-Franciscato-Cozzolino-ebook/dp/B08RY983CX>

de la Rosa, L., Alvarez, E., & González, G. A. (2009). Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*, 1–367. <https://doi.org/10.1002/9780813809397>

de Pasquale, I., Pontonio, E., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2020). Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *International Journal of Food Microbiology*, 316. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108426>

de Reu, J. C., Ramdaras, D., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (1994). Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. *Food Chemistry*, 50(2), 171–175.

[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90116-3)

de Ruiter, G., van Bruggen-van der Lugt, A., Nout, M. J. R., Middelhoven, W., Soentoro, P. S. S., Notermans, S., & Rombouts, F. (1992). Formation of antigenic extracellular polysaccharides by selected strains of *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Absidia corymbifera* and *Syncephalastrum racemosum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62(3), 189–199. <https://doi.org/10.1007/BF00582579>

- Dey, P. M. (1990). *METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY VOL 1 APL.* 1, 565.
<https://www.elsevier.com/books/methods-in-plant-biochemistry-volume-1/dey/978-0-12-461011-8>
- Dhankher, N., & Chauhan, B. (1987). Effect of Temperature and Fermentation Time on Phytic Acid and Polyphenol Content of Rabadi— A Fermented Pearl Millet Food. *Journal of Food Science*, 52(3), 828–829. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1987.TB06739.X>
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/NU11081806>
- DINGONATURA. (2018). *Food labeling*. <https://www.dingonatura.com/en/food-labeling/>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.04.028>
- Dong, Q., Echigo, K., Raboy, V., & Saneoka, H. (2020). Seedling growth, physiological characteristics, nitrogen fixation, and root and nodule phytase and phosphatase activity of a low-phytate soybean line. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 225–232.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.02.015>
- Du, Y., Dou, S., & Wu, S. (2012). Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice. *Food Chemistry*, 135(2), 580–582.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.04.131>
- Dudley-Cash, W. (2003). *Calidad de la harina de soja*. In: *American Soybean Association. IV Jornadas sobre Control de calidad de la harina de soja y soja integral*.

- Eastwood, M. A., & Morris, E. R. (1992). Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(2), 436–442. <https://doi.org/10.1093/AJCN/55.2.436>
- Elizalde, A., Pismag, Y., & Chaparro, D. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1).
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612009000100007
- El-Naggar, N., Sherief, A., & Hamza, S. (2011). Bioconversion process of rice straw by thermotolerant cellulolytic *Streptomyces viridochromogenes* under solid-state fermentation conditions for bioethanol. *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11998–12011.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.1256>
- FAO, & WFP. (2020). *Los efectos de la COVID-19 en la seguridad alimentaria y la nutrición: elaboración de respuestas eficaces en materia de políticas para abordar la pandemia del hambre y la malnutrición*. <https://www.fao.org/3/cb1000es/cb1000es.pdf>
- FAO/WHO. (1996). Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission. In *Cereals, pulses, legumes and derived products and vegetable proteins* (Vol. 7, p. 38).
www.codexalimentarius.org
- Farro, P. (2008). *Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (Chenopodium quinoa Willdenow) da variedade "Real."* Universidade Estadual de Campinas.
- FDA. (2008). Código de Regulaciones Federales. In S. Silver (Ed.), *Administración de Alimentos y Medicamentos* (Vol. 2). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135649888579584>

- Fenwick, D. E., & Oakenfull, D. (1983). Saponin content of food plants and some prepared foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(2), 186–191.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.2740340212>
- Fernández de la Cámara, C., Salom, D., Sequedo, M. D., Hervás, D., Marín-Lambies, C., Aller, E., Jaijo, T., Díaz-Llopis, M., Millán, J. M., & Rodrigo, R. (2013). Altered Antioxidant-Oxidant Status in the Aqueous Humor and Peripheral Blood of Patients with Retinitis Pigmentosa. *PLOS ONE*, 8(9), e74223. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0074223>
- Fernandez, E. (2017). *Determinación del contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451 y Criollo)*. Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438–450. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.06.007>
- Fernando, V., & Roberts, G. R. (1976). The partial inhibition of soil urease by naturally occurring polyphenols. *Plant and Soil* 1976 44:1, 44(1), 81–86. <https://doi.org/10.1007/BF00016957>
- Filho, A., Pirozi, M., Borges, J., Sant'Ana, H., Chaves, J., & Coimbra, J. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618–1630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>
- Fletcher, R. J. (2015). Overview. *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. In *Pseudocereals* (2a ed., Vols. 1–4). Elsevier Ltd. . <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21604-1>

- Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 15, Issues 3–4, pp. 143–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2003.09.012>
- Gan, R. Y., Li, H. bin, Gunaratne, A., Sui, Z. Q., & Corke, H. (2017). Effects of Fermented Edible Seeds and Their Products on Human Health: Bioactive Components and Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 489–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12257>
- Gandarillas, S., Nieto, C., & Castillo, T. (1989). *Razas de quinua en Ecuador. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Cultivos Andinos. (Boletín Técnico no. 67)*. <http://quinuaecuador.imaginarartes.com/index.php/publicaciones>
- Garcia, C. (2014). *Inhibidores de proteasas en leguminosas* [Tesis de grado, Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia]. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/7486>
- Gee, J. M., Wortley, G. M., Johnson, I. T., Price, K. R., Rutten, A. A. J. J. L., Houben, G. F., & Penninks, A. H. (1996). Effects of saponins and glycoalkaloids on the permeability and viability of mammalian intestinal cells and on the integrity of tissue preparations in vitro. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 10(2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(95\)00113-1](https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00113-1)
- Gestetner, Benjamin., Birk, Yehudith., & Tencer, Yehuda. (1968). Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(6), 1031–1035. <https://doi.org/10.1021/jf60160a025>
- Ghiretti, G. P., Zanardi, E., Novelli, E., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., & Chizzolini, R. (1997). Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella

production. *Meat Science*, 47(1–2), 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00059-4)

Ghosh, B., & Ray, R. R. (2011). Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: A review. *Journal of Applied Sciences*, 11(14), 2470–2486. <https://doi.org/10.3923/JAS.2011.2470.2486>

Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud | Offarm. In *Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud* (6th ed., Vol. 23a). <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>

Göçer, H., & Gülçin, I. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 821–825. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.585963>

Gómez, A., Iafelice, G., Lavini, A., Pulvento, C., Caboni, M. F., & Marconi, E. (2012). Phenolic compounds and saponins in quinoa samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) grown under different saline and nonsaline irrigation regimens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4620–4627. https://doi.org/10.1021/JF3002125/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2012-002125_0003.GIF

Gomez, L., & Aguilar, E. (2016). *Guía de cultivo de la quinua*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Universidad Nacional Agraria La Molina. www.fao.org/publications/es

González, J. A., Roldán, A., Gallardo, M., Escudero, T., & Prado, F. E. (1989). Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* ('quinoa'). *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 39(4), 331–337. <https://doi.org/10.1007/BF01092070>

- Gorinstein, S., Lojek, A., Číž, M., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Medina, O. J., Moreno, M., Salas, I. A., & Goshev, I. (2008). Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 629–637. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2007.01498.X>
- Graffham, A. J., Gordon, M. H., Westby, A., & Owens, J. D. (1995). Nutrition of tempe moulds. *Letters in Applied Microbiology*, 21(4), 223–227. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.1995.TB01046.X>
- Granados, C., Tejada, C., & León, G. (2021). Actividad antioxidante del extracto etanólico de *Capsicum baccatum* L | AVFT – Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. *AVFT-Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 40(1). http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_aavft/article/view/22345
- Griffith, D. (1991). Condensed tannins. *Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry*.
- Grossi, G., Haydee, E., & Michelies, A. (2015). *Determinación de la Fibra Dietética total, soluble e insoluble en hongos comestibles de cultivo Pleurotus ostreatus*. CONICET. <https://inta.gob.ar/documentos/determinacion-de-fibra-dietetica-total-soluble-e-insoluble-en-hongos-comestibles-de-cultivo-pleurotus-ostreatus>
- Guclu-Ustundag, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231–258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0774-2>

- Gutiérrez, J., Mondragón, P., García, L., Hernández, S., Ramírez, S., & Núñez, R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Med Quir*, 19(4), 446–454. <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2014/rmq144h.pdf>
- Hachmeister, K. A., & Fung, D. Y. C. (1993). Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, 19(3), 137–188. <https://doi.org/10.3109/10408419309113527>
- Hamerstrand, G., Black, L., & Glover, J. (1981). Trypsin Inhibitors in Soy Products: Modification of the Standard Analytical Procedure. In *Cereal Chemistry* (1st ed., Vol. 58, pp. 42–45).
- Handajani, Y. S., Turana, Y., Yogiara, Y., Widjaja, N. T., Sani, T. P., Christianto, G. A. M., & Suwanto, A. (2020). Tempeh Consumption and Cognitive Improvement in Mild Cognitive Impairment. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 49(5), 497–502. <https://doi.org/10.1159/000510563>
- Harman, D. (1988). *Free radical theory of aging: current status. Lipofuscin* (1st ed., pp. 3–21). State of the art.
- Hass, M., & Joerger, R. D. (1995). Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: versatile catalysts in nature and the laboratory. In H. Hui & G. Khachatourians (Eds.), *Food Biotechnology* (pp. 549–588).
- He, M., van Dam, R. M., Rimm, E., Hu, F. B., & Qi, L. (2010). Whole-grain, cereal fiber, bran, and germ intake and the risks of all-cause and cardiovascular disease-specific mortality among women with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 121(20), 2162–2168. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907360>

- Heller, S. N., Hackler, L. R., Rivers, J. M., van Soest, P. J., Roe, D. A., Lewis, B. A., & Robertson, J. (1980). Dietary fiber: the effect of particle size of wheat bran on colonic function in young adult men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(8), 1734–1744. <https://doi.org/10.1093/AJCN/33.8.1734>
- Hernández, C., Botín, A., Londoño, P., & Mieres-Pitre, A. (2016). Efecto del acondicionamiento del trigo sobre la calidad de la harina panadera. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*. <http://servicio.bc.uc.edu.ve/ingenieria/revista/IngenieriaYSociedad/a8n1/art02.pdf>
- Hesseltine, C. W., Smith, M., Bradle, B., & Djien, K. S. (1963). Investigations of tempeh, an Indonesian food. *Dev. Ind. Microbiol*, 4, 275–287.
- Hodges, R. E., & Minich, D. M. (2015). Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/760689>
- Hollman, P. C. H., Gaag, M. v.d., Mengelers, M. J. B., van Trijp, J. M. P., de Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(5), 703–707. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00129-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00129-3)
- Humberto, E. (2012). Proceso de Fermentacion Solida con *Rhizopus oligosporus* para la detoxificacion de semillas de Lupino (*Lupinus mutabilis*) [Tesis de Doctorado, Universidad del Valle]. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*. <http://hdl.handle.net/10893/8136>
- Hur, J., Nguyen, T. T. H., Park, N., Kim, J., & Kim, D. (2018). Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) fermented by *Rhizopus oligosporus* and its bioactive properties. *AMB Express*, 8(1), 143. <https://doi.org/10.1186/S13568-018-0675-3>

- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346–356.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.112>
- Huynh, N., van Camp, J., Smagghe, G., & Raes, K. (2014). Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 19369–19388. <https://doi.org/10.3390/IJMS151119369>
- Importa, F., & Kellems, R. (2001). Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to wheat, sorghum or maize based diets on growth and survival of broiler chicks. *Livestock Research for Rural Development*, *13*(1).
<http://www.lrrd.org/lrrd13/1/impr131.htm>
- Improta, F., & Kellems, R. (2001). Comparison of raw, washed and polished quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to wheat, sorghum or maize based diets on growth and survival of broiler chicks. *Livest. Res. Desarrollo Rural*, *13*(1).
<https://lrrd.cipav.org.co/lrrd13/1/impr131.htm>
- INEN. (2012). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1673:2013*.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1673-1R.pdf>
- INIAP. (2012). *INIAP TUNKAHUAN variedad de quinua con amplia aceptación entre los agricultores – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. <https://www.agricultura.gob.ec/iniap-tunkahuan-variedad-de-quinua-con-amplia-aceptacion-entre-los-agricultores/>
- Institute of Medicine; Food and Nutrition Board. (2000). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9810>

- Isam, A., Ahmed, M., al Juhaimi, F., & Özcan, M. M. (2021). Insights into the nutritional value and bioactive properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*): past, present and future prospective. *International Journal of Food Science & Technology*.
<https://doi.org/10.1111/IJFS.15011>
- Issaoui, M., Delgado, A. M., Caruso, G., Micali, M., Barbera, M., Atrous, H., Ouslati, A., & Chammem, N. (2020). Phenols, Flavors, and the Mediterranean Diet. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(4), 915–924. <https://doi.org/10.1093/JAOCINT/QSZ018>
- Iwai, T., Takahashi, M., Oda, K., Terada, Y., & Yoshida, K. T. (2012). Dynamic Changes in the Distribution of Minerals in Relation to Phytic Acid Accumulation during Rice Seed Development. *Plant Physiology*, 160(4), 2007–2014.
<https://doi.org/10.1104/PP.112.206573>
- Jacobsen, S. (2003). The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). In *Taylor & Francis* (Vol. 19, Issue 2, pp. 167–177). <https://doi.org/10.1081/FRI-120018883>
- James, S., Nwabueze, T. U., Ndife, J., Onwuka, G. I., & Ata'Anda Usman, M. (2020). Influence of fermentation and germination on some bioactive components of selected lesser legumes indigenous to Nigeria. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100086.
<https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2020.100086>
- Jancurová, M., Minarovičová, L., & Dandár, A. (2009). Quinoa – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (2009)(No. 2), 71–79. <https://doi.org/10.17221/32/2008-CJFS>
- Johnson, I. T., Gee, J. M., Price, K., Curl, C., & Fenwick, G. R. (1986). Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *The Journal of Nutrition*, 116(11), 2270–2277. <https://doi.org/10.1093/JN/116.11.2270>

- Jurus, A. M., & Sundberg, W. J. (1976). Penetration of *Rhizopus oligosporus* into Soybeans in Tempeh. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(2), 284–287.
<https://doi.org/10.1128/AEM.32.2.284-287.1976>
- Kakade, M., Rackis, J., Meghee, J., & Puski, G. (1984). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. In *Cereal Chemistry* (pp. 376–382).
- Karamać, M. (2009). Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5485–5497.
<https://doi.org/10.3390/IJMS10125485>
- Karovicova, J., Kohajdova, Z., Minarovicova, L., Laujova, M., Greifova, M., Greif, G., & Hojerova, J. (2020). Utilisation of Quinoa for development of fermented beverages. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 465–472. <https://doi.org/10.5219/1323>
- Karyotis, T., Iliadis, C., Noulas, C., & Mitsibonas, T. (2003). Preliminary Research on Seed Production and Nutrient Content for Certain Quinoa Varieties in a Saline–Sodic Soil. *Journal of Agronomy and Crop Science*. <https://doi.org/10.1046/J.0931-2250.2003.00063.X>
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153–161.
<https://doi.org/10.1046/J.1365-2621.2002.00552.X>
- Kaur, D., & Kapoor, A. C. (1992). Nutrient composition and antinutritional factors of rice bean (*Vigna umbellata*). *Food Chemistry*, 43(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90224-P](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90224-P)
- Keenan, H. (2006). Positivity of C-peptide, GADA and IA2 antibodies in type 1 diabetic patients with extreme duration. In S. Beauregard & V. Alexandria (Eds.), *Diabetes* (Vol. 55, pp.

A65–A65). AMER DIABETES ASSOC. <https://professional.diabetes.org/abstract/positivity-c-peptide-gada-and-ia2-antibodies-type-1-diabetic-patients-extreme-duration>

Kennedy, A. (1995). The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *The Journal of Nutrition*, 125(3 Suppl), 604S–615S.
https://doi.org/10.1093/JN/125.3_SUPPL.733S

Kent, N. (1984). Technology of Cereals. In *Experimental Agriculture* (3a ed., Vol. 25, Issue 2, pp. 273–273). Oxford: Pergamon. <https://doi.org/10.1017/S0014479700016823>

Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>

Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S. A., & Khattak, M. S. (2007). Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry*, 104(3), 1074–1079. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.022>

Kiers, J., Nout, R., & Rombouts, F. (2000). In vitro digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1325–1331. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9<1325::AID-JSFA648>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1325::AID-JSFA648>3.0.CO;2-K)

Kim, E. Y., Ham, S. K., Bradke, D., Ma, Q., & Han, O. (2011). Ascorbic acid offsets the inhibitory effect of bioactive dietary polyphenolic compounds on transepithelial iron transport in Caco-2 intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 828–834.
<https://doi.org/10.3945/JN.110.134031>

Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., & Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58(5), 759–765.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00160-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00160-4)

- Kiokias, S., Kiokias, C., & Varzakas, T. (2013). A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 343–354.
<https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Kiriakidis, S., Högemeyer, O., Starcke, S., Dombrowski, F., Hahne, J. C., Pepper, M., Jha, H. C., & Wernert, N. (2005). Novel tempeh (fermented soyabean) isoflavones inhibit in vivo angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane assay. *The British Journal of Nutrition*, 93(3), 317–323. <https://doi.org/10.1079/BJN20041330>
- Knight, F., Mirichnick, N., Momcilovic, P., Orstatik, S., & Pee, S. (2020). *Cerrando la brecha de nutrientes*. 104.
- Koch, W. (2019). Dietary Polyphenols-Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable Diseases. A Systematic Review. *Nutrients*, 11(5).
<https://doi.org/10.3390/NU11051039>
- Konishi, Y., Hirano, S., Tsuboi, H., & Wada, M. (2004). Distribution of minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), 231–234. <https://doi.org/10.1271/BBB.68.231>
- Koziol, M. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35–68.
[https://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90006-6)
- Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2015). Antinutrients. *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*, 211–235. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.CH10>

- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), 945–959.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.11.052>
- Kuroda, Y., Shankel, D., & Waters, M. (2012). *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*.
- Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., & Proestos, C. (2018). Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1852, 57–71.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3
- Lara, D., & Suarez, A. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 16, 87–109.
<https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, 2(12), 1266. <https://doi.org/10.3390/NU2121266>
- Lazarte, C. E., Carlsson, N. G., Almgren, A., Sandberg, A. S., & Granfeldt, Y. (2015). Phytate, zinc, iron and calcium content of common Bolivian food, and implications for mineral bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 111–119.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.015>
- Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. (1997). Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase: State of the Art. *Advances in Applied Microbiology*, 44, 215–260.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70463-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70463-5)
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 Suppl).
<https://doi.org/10.1093/AJCN/78.3.517S>

- Lohr, M. (2009). Carotenoids. In *The Chlamydomonas Sourcebook* (2a ed., Vol. 2, pp. 799–817). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00029-0>
- London, D. S., & Beezhold, B. (2015). A phytochemical-rich diet may explain the absence of age-related decline in visual acuity of Amazonian hunter-gatherers in Ecuador. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 35(2), 107–117.
<https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2014.12.007>
- Lorusso, A., Verni, M., Montemurro, M., Coda, R., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2017). Use of fermented quinoa flour for pasta making and evaluation of the technological and nutritional features. *LWT*, 78, 215–221. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.12.046>
- Lupano, C. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos: Cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/91>
- Macfarlane, B., van der Riet, W., Bothwell, T., Baynes, R., Siegenberg, D., Schmidt, U., Tal, A., Taylor, J., & Mayet, F. (1990). Effect of traditional oriental soy products on iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51(5), 873–880.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/51.5.873>
- Mahan, L. K., & Raymond, J. L. (2010). *Alimentos, Nutricao e Dietoterapia* (12a ed.). Elsevier.
http://www.ava-edu.net/biblioteca/wp-content/uploads/2020/08/Krause_Alimentos_Nutrio_e_Dietoterapia.pdf
- Malavé, A. del C., Méndez, J., & Figuera, Y. (2009). Lípidos, alimentos y sus suplementos en la salud cardiovascular. I. fuentes marinas. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(4), 711–727.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3393572>

- Mallmann, C., Dilkin, P., Giacomini, L. Z., Rauber, R. H., & Pereira, C. E. (2007). Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. *Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva de La Universidad Federal*. http://www.educa-bo.com/pdf/articulos/micotoxinas_en_ingredientes_aves_DR_Mallmann.pdf
- Mamani, D., Gutiérrez, M., Serrudo, J., & Gonzales, E. (2017). Parámetros de calidad de harinas de *Amaranthus caudatus* Linnaeus (amaranto), *Chenopodium quinoa* Willd (quinua), *Chenopodium pallidicaule* Aellen (kañahua), *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi). *Rev.Cs.Farm. y Bioq*, 5(1).
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S231002652017000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Manan, M., & Webb, C. (2017). *Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products* (Biofuel Res J, Ed.; 4a ed., Vol. 4).
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11418-019-01364-X/FIGURES/15>
- Maradini, A., Ribeiro, M., da Silva, D. J., Pinheiro, H., Paes, J., & dos Reis, J. (2015). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618–1630. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>
- Marcus, J. B. (2013). Protein Basics: Animal and Vegetable Proteins in Food and Health: Healthy Protein Choices, Roles and Applications in Nutrition, Food Science and the Culinary Arts. In *Culinary Nutrition* (pp. 189–230). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391882-6.00005-4>
- Márquez, B. (2014). *Cenizas y Grasas: Teoría del muestreo refrigeración y congelación de alimentos: terminología, definiciones y explicaciones* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Sn Agustín]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4188>

Martínez, B., Gómez, I., & Rincón, F. (2002). Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Universidad de Córdoba-Córdoba, España*, 52(3).

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001

Martinez, D., & Suárez, G. z. (2010). Determinación de los inhibidores de tripsina del frijol soya tostado y del subproducto torta de soya para evaluar el control de proveedores de la empresa de alimentos concentrados Contegral S.A [Tesis de Grado, Universidad de La Salle, Bogotá]. In *Contegral S.A*. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/

Masterbroek, H., Limburg, H., Gilles. T, & Marvin, H. (2000). Occurrence of sapogenins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) - Mastebroek - 2000 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library. *Analytical Testing in Winemarking*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000101\)80:1<152::AID-JSFA503>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1<152::AID-JSFA503>3.0.CO;2-P)

Matsuo, M. (2005). In Vivo Antioxidant Activity of Methanol Extract from Quinoa Fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51(6), 449–452. <https://doi.org/10.3177/JNSV.51.449>

Matsuo, M. (2006). Suitability of quinoa fermented with *Rhizopus oligosporus* as an ingredient of biscuit. *J Jpn Soc Food Sci*, 53(1), 62–69. <https://doi.org/10.3136/NSKKK.53.62>

Mazón, N., Murillo, A., & Vega, L. (2017). Evaluación participativa de líneas promisorias de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en fincas de agricultores de dos comunidades en las provincias Imbabura y Cotopaxi, Ecuador. *Ponencia Presentada En VI Congreso Mundial Quinua y III Simposio Internacional de Granos Andinos*.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4337>

- McCue, P., & Shetty, K. (2003). Role of Carbohydrate-Cleaving Enzymes in Phenolic Antioxidant Mobilization from Whole Soybean Fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Good Biotechnology*, 17(1), 27–37. <https://doi.org/10.1081/FBT-120019982>
- McKenzie-Parnell, J., & Davies, N. (1986). Destruction of phytic acid during home breadmaking. *Food Chemistry*, 22(3), 181–192. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(86\)90077-4](https://doi.org/10.1016/0308-8146(86)90077-4)
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., & Krause, D. O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2), 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00232-2)
- Melini, F., & Melini, V. (2021). Impact of Fermentation on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Quinoa. *Fermentation 2021, Vol. 7, Page 20*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7010020>
- Melini, V., & Melini, F. (2021). Functional Components and Anti-Nutritional Factors in Gluten-Free Grains: A Focus on Quinoa Seeds. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/FOODS10020351>
- Mellanby, E. (1949). The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate. *The Journal of Physiology*, 109(3–4), 488. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1949.SP004411>
- Min, B. R., Attwood, G. T., McNabb, W. C., Molan, A. L., & Barry, T. N. (2005). The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1–2), 45–58. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2005.02.007>
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review.

Animal Feed Science and Technology, 106(1–4), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)

Mina, H. (2014). *Evaluación agronómica de líneas F5 de quinua (Chenopodium quinoa Willd.), en dos localidades de la serranía* [Tesis de grado previo la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ingeniería Agronómica].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2560>

Mira, J., & Sucoshañay, D. (2016). Caracterización de la harina de quinua (*Chenopodium Quinoa Willd.*) producida en la provincia de Chimborazo, Ecuador. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 2(16).
<http://ceaa.esPOCH.edu.ec:8080/revista.perfiles/Articuloshtml/Perfiles16Art4/Perfiles16Art4.xhtml>

Miszkiewicz, H., Bizukojc, M., Rozwandowicz, A., & Bielecki, S. (2003). Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentations - PubMed.
Commun Agric Appl Biol Sci ., 2(2), 313–316. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15296185/>

Mitchell, D. A., Luz, L. F. L., & Krieger, N. (2011). *Bioreactors for solid-state fermentation* (Elsevier, Ed.; 2da ed., pp. 347–360). . <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00107-0>

Mitra, S., & Dungan, S. R. (2000). Micellar properties of quillaja saponin. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 17(2), 117–133.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00088-0)

Modolo, L. v, Souza, A. X., Horta, L. P., Araujo, D. P., & Ângelo, F. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2014.09.001>

- Mohammad, B. (2008). *COMPUTATIONAL STUDIES OF NATURAL FLAVONOIDS TOWARDS THE DISCOVERY OF A POTENTIAL XANTHINE OXIDASE INHIBITOR BELAL OMAR MOHAMMAD ALNAJJAR UNIVERSITI SAINS MALAYSIA 2008 COMPUTATIONAL STUDIES OF NATURAL FLAVONOIDS TOWARDS THE DISCOVERY OF A POTENTIAL XANTHINE OXIDASE INHIBITOR* [Master of Science. UNIVERSITI SAINS MALAYSIA]. http://eprints.usm.my/9027/1/COMPUTATIONAL_STUDIES_OF_NATURAL_FLAVONOID_S_TOWARDS.pdf
- Mujica, A., Izquierdo, J., & Marathe, J. (2001). *Quinoa Ancestral Cultivo Andino, Alimento del Presente y Futuro*. Oficina Regional de Producción Vegetal.
- Murata, kiku, Ikehata, hideo, & Miyamoto, teiji. (1967). Studies on the Nutritional Value of Tempeh. *Journal of Food Science*, 32(5), 580–586. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1967.TB00837.X>
- Murillo, A., Peralta, D., Dominguez, D., & Mina, D. (2015). *Desarrollo de líneas promisoras F6 de quinua (Chenopodium quinoa Willd) en Ecuador. Resúmenes del V Congreso Mundial de Quinoa y II Simposio Internacional de Granos Andinos, Jujuy, Argentina*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1915>
- Nahas, E. (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *Journal of General Microbiology*, 134(1), 227–233. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-227/CITE/REFWORKS>
- Navarro, M. (2007). Analisis de Alimentos. In *Manual de Practicas*. <http://www.etpcb.com.ar/DocumentosDconsulta/ALIMENTOS-PROCESOS Y QUÍMICA/Manual de prácticos en alimentos.pdf>
- Nazaretha, R., Pratiwi, D., Widyastu, N., Rustan, N., Anjan, G., & Afifah, D. (2018). Nutritional Composition Changes During Tempeh Gembus Processing. *IOP Conference Series: Earth*

and Environmental Science, 116(1), 012026. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012026>

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2010. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAP024>

Nielsen, S. S. (1994). *Introduction to the Chemical Analysis of Foods* (pp. 209–212). Ed JAones and Bartlet aPublishers.

Nieto, C., Vimos, N., Monteros, J., Caicedo, V., & Rivera, M. (1992). *INIAP-Ingapirca e INIAP-Tunkahuan: Dos variedades de quinua de bajo contenido de saponina. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Cultivos Andinos. (Boletín Divulgativo no. 228)*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/270>

Nout, M. J. R., & Kiers, J. L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789–805. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02471.X>

Nout, M. J. R., & Rombouts, F. M. (1990). Recent developments in tempe research. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(5), 609–633. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1990.TB01555.X>

Nowak, J., & Szebiotko, K. (1992). Some biochemical changes during soybean and pea tempeh fermentation. *Food Microbiology*, 9(1), 37–43. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(92\)80060-H](https://doi.org/10.1016/0740-0020(92)80060-H)

- Nsimba, R., Kikuzaki, H., & Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chemistry*, 106(2), 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.004>
- Oatway, L., Vasanthan, T., & Helm, J. H. (2007). PHYTIC ACID. [Http://Dx.Doi.Org/10.1081/FRI-100108531](http://Dx.Doi.Org/10.1081/FRI-100108531), 17(4), 419–431. <https://doi.org/10.1081/FRI-100108531>
- Oboh, G. (2006). *Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus spp solid media fermentation techniques*. 9(1), 46–49. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582006000100007&script=sci_arttext
- Olguin, M., Zingale, M., Revelant, G., & Vingnale, M. (2001). Actividad ureásica en productos de soja: Propuesta de un nuevo método. *ALAN*, 51(3). http://ve.scielo.org/scielo.phpscript=sci_arttext&pid=S0004-06222001000300011
- Olivares, C. (2005). *Caracterización del grano de quinoa (Chenopodium quinoa Willd) de tres ecotipos de la region VI (Vol. 2, Issue 2) [Memoria para optar al título de Ingeniero en alimentos, Fac. de Ciencias Qcas. y Farmacéuticas, Universidad de Chile]*. <https://doi.org/10.26620/UNIMINUTO.INVENTUM.2.2.2007.89-101>
- Oomah, B. D., & Mazza, G. (1996). Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1746–1750. <https://doi.org/10.1021/JF9508357>
- Palombini, S. (2013). Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XS2021021507>
- Palomo, I., Gutiérrez, M., Astudillo, L., Rivera, Carolina, Torres, Constanza, Guzmán, L., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., & Alarcón, M. (2009). EFECTO ANTIOXIDANTE DE FRUTAS

- Y HORTALIZAS DE LA ZONA CENTRAL DE CHILE. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(2), 152–158. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182009000200007>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1017/JNS.2016.41>
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
- Pandey, G. (2011). Medicinal plants against liver diseases. *Article in International Research Journal of Pharmacy*. <https://www.researchgate.net/publication/270220142>
- Pantoja, L., Prieto-Rosales, G., & Aguirre, E. (2020). Caracterización de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la harina de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) para su industrialización. *Rev. Tayacaja*, 3(1). <https://doi.org/10.46908/RICT.V3I1.72>
- Paredes, J. (2019). *Validación de la adaptación y rendimiento de 10 líneas de quinua (Chenopodium quinoa W.), utilizando manejo orgánico en 3 comunidades de los cantones Colta y Guamote de la provincia de Chimborazo. (Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.* <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/10734>
- Paredes-López, O., & Harry, G. I. (1989). Changes in Selected Chemical and Antinutritional Components during Tempeh Preparation Using Fresh and Hardened Common Beans. *Journal of Food Science*, 54(4), 968–970. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1989.TB07923.X>
- Pariona, P. (2016). *Determinación de la actividad ureásica en la harina de soya* [Tesis pregrado, Universidad Nacional “Daniel Alcides Carrión”, Chanchamayo].

<https://dokumen.site/download/determinacion-de-la-actividad-ureasica-en-harina-de-soyapdf-a5b39ef972f318>

Park, Y. (2016). Determination of moisture and ash contents of foods. In Leo. Nollet (Ed.), *Handbook of Food Analysis* (Issue June). Marcel Dekker, Inc.

Paśko, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M., & Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115(3), 994–998.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.037>

Pastrana, L. (2009). FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y APLICACIÓN A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Ciencia y Tecnología*, 1(3), 4–12.

<https://doi.org/10.1080/11358129609487556>

Paz, P., Janny, R. J., & Håkansson, Å. (2020). Safeguarding of quinoa beverage production by fermentation with *Lactobacillus plantarum* DSM 9843. *International Journal of Food Microbiology*, 324, 108630. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108630>

Pedizzi, C., Lema, J. M., & Carballa, M. (2017). Enhancing thermophilic co-digestion of nitrogen-rich substrates by air side-stream stripping. *Bioresource Technology*, 241, 397–405. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.05.113>

Pellegrini, M., Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández, J., Pérez, J., & Viuda, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, 111, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.006>

- Peralta, I. (2010). *INIAP Tunkahuan: Variedad mejorada de quinua*. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. (Plegable no. 345). <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2639>
- Perdon, A. A., & Holopainen-Mantila, U. (2020). Cereal grains and other ingredients. *Breakfast Cereals and How They Are Made: Raw Materials, Processing, and Production*, 73–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812043-9.00004-7>
- Pérez, L. (1996). *Fermentación en estado sólido del mijo perla (Pennisetum americanum (L.) Leeke) por Rhizopus oligosporus para la obtención de un producto rico en proteína - Repositorio Institucional UANL [Tesis Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León.]*. <http://eprints.uanl.mx/6256/>
- Petroski, W., & Minich, D. M. (2020). Is There Such a Thing as “Anti-Nutrients”? A Narrative Review of Perceived Problematic Plant Compounds. *Nutrients*, 12(10), 1–32. <https://doi.org/10.3390/NU12102929>
- Popova, A., & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1), 68–76. <https://doi.org/10.2174/1874070701913010068>
- Pradhan, S. P., Padhi, S., Dash, M., Heena, Mittu, B., & Behera, A. (2022). Carotenoids. In *Nutraceuticals and Health Care* (pp. 135–157). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00006-5>
- Programa Mundial de Alimentos. (2021). *INFORME DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Evaluacion Remota ECUADOR*. 19, 2–3. https://ecuador.un.org/es/161834-informe-de-seguridad-alimentaria-evaluacion-remota-ecuador%0Ahttps://docs.wfp.org/api/documents/WFP-0000022499/download/?_ga=2.91738141.605404406.1634221749-473809917.1628868736

- Puerta, Q. (2013). La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. *Digital Repository of the National Coffee Research Centre - CENICAFE*.
<https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/418>
- Quesada, D., & Gómez, G. (2019). ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*, 2(1), 79–86. <https://doi.org/10.35454/rncm.v2n1.063>
- Quicazán, M., & Caicedo, L. (2012). Inactivation of trypsin inhibitor during heat treatment of soymilk. *Vitae*, 19(1), 337–339. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914105.pdf>
- Raboy, V. (2003). myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*, 64(6), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00446-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00446-1)
- Raboy, V. (2020). Low phytic acid Crops: Observations Based On Four Decades of Research. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/PLANTS9020140>
- Rahardjo, Y. (2005). Fungal mats in solid-state fermentation [Thesis internal PhD, WU]. In G. Balint, B. Antal, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova (Eds.), *Uniwersytet śląski*. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Ramesh, M. v., & Lonsane, B. K. (1990). Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990 33:5, 33(5), 501–505.
<https://doi.org/10.1007/BF00172541>
- Ranhotra, G. (1973). Factors affecting hydrolysis during breadmaking of phytic acid in wheat protein concentrate. *Cereal Chem*, 50, 355–360. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303262423>

- Ranjan, A., Sahu, N. P., Deo, A. D., & Kumar, S. (2019). Solid state fermentation of de-oiled rice bran: Effect on in vitro protein digestibility, fatty acid profile and anti-nutritional factors. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 119, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.054>
- Rao, A. v., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2007.01.012>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reddy, N. R., & Pierson, M. D. (1994). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Research International*, 27(3), 281–290.
[https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90096-5)
- Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1985). Dry bean tannins: A review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1985 62:3, 62(3), 541–549. <https://doi.org/10.1007/BF02542329>
- Repo- Carrasco, & Astuhuaman, L. (2011). Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Food Science and Technology*, 31(1), 225–230. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100035>
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J. M., & Mattila, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>

- Reyes, A. (2006). COMPONENTE NUTRICIONAL DE DIFERENTES VARIEDADES DE QUINUA DE LA REGIÓN ANDINA. *Desarrollo Sostenible y Tecnología* , 5.
http://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/Quinoa_ComposicionNutricionalVariedadesAndina_2006_r5_art10.pdf
- Reyes, N., & Mendieta, B. (2000). *Determinación del valor nutritivo de los alimentos* [Tesis, Universidad Nacional Agraria]. <https://core.ac.uk/download/pdf/35166784.pdf>
- Risi, J. (1997, November 21). La quinua: actualidad y perspectivas. . *Taller Sobre Desarrollo Sostenible de La Quinoa. Instituto Interamericano de Cooperación Para La Agricultura.*
- Rodríguez, N., Araque, M., & Perdomo, F. (2006). INCUBACIÓN DE HONGOS COMESTIBLES Y MEDICINALES PÁGINA 2 PRESENTACIÓN. In *Proyecto: “Adaptación e implementación de cinco cepas de hongos comestibles en diferentes subproductos agrícolas para mejorar la productividad y competitividad de ASOFUNGICOL en el Huila”* .
[http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/852/1/Hongos comestibles medicinales Incubación.pdf](http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/852/1/Hongos%20comestibles%20medicinales%20Incubaci3n.pdf)
- Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. International Food Policy Research.
- Rodríguez-León, J., Carvalho, J., Pandey, A., Soccol, C. R., & Rodríguez-Fernández, D. (2018). Kinetics of the Solid-State Fermentation Process. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 57–82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00004-9>
- Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., Blajos, J., & Santivañez, T. (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO*, 37, 66. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010>

- Rojas, W., Pinto, M., Alanoca, C., Gomez, L., Leon, P., Alercia, A., Diulgheroff, S., Padulosi, S., & Bazile, D. (2014). Estado de la conservación ex situ de los recursos genéticos de quinua. *CIRAD*, 724. <https://doi.org/14042>
- Rojas, W., Pinto, M., Soto, J., & Alcocer, E. (2010). Valor nutricional, agroindustrial y funcional de los granos andinos. In W. Rojas, M. Pinto, J. Soto, M. Jagger, & S. Padulosi (Eds.), *Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia* (pp. 24–38). Bioversity International. <http://www.iica.int>
- Rosique, M. (2013). *Bioadsorción de cadmio por biomasa de Opuntia* [Tesis de grado, Universidad Politécnica de Cartagena].
<https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/3768/pfc5624.pdf;sequence=1>
- Rowles, J. L., & Erdman, J. W. (2020). Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11).
<https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2020.158613>
- Ruales, J., & Nair, B. (1994). Properties of starch and dietary fibre in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(3), 223–246.
<https://doi.org/10.1007/BF01094092>
- Ruales, J., & Nair, B. M. (1993a). Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Food Chemistry*, 48(2), 131–136. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90047-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90047-J)
- Ruales, J., & Nair, B. M. (1993b). Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Food Chemistry*, 48(2), 137–143.
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90048-K](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90048-K)

- Rui, X., Wang, M., Zhang, Y., Chen, X., Li, L., Liu, Y., & Dong, M. (2017). Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(6), e13290. <https://doi.org/10.1111/JFPP.13290>
- Ruiz, B., & Calvo, R. (2015). Beneficios para la salud digestiva del salvado de trigo; evidencias científicas. *Nutricion Hospitalaria*, *32*, 41–45. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.sup1.9478>
- Ruiz-Terán, F., & Owens, D. (1996). Chemical and Enzymic Changes During the Fermentation of Bacteria-Free Soya Bean Tempe - Ruiz-Terán - 1996 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199608\)71:4%3C523::AID-JSFA613%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199608)71:4%3C523::AID-JSFA613%3E3.0.CO;2-R)
- Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R., & Melchers, K. (2005). Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*, *20*(6), 429–438. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00032.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/Y0032-5-04.JPEG>
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221/TABLES/4>
- Saini, R. K., Keum, Y. S., Daglia, M., & Rengasamy, K. R. (2020). Dietary carotenoids in cancer chemoprevention and chemotherapy: A review of emerging evidence. *Pharmacological Research*, *157*, 104830. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104830>
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, *76*, 735–750. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.07.047>

- Salunkhe, D., Chavan, J. K., & Kadam, S. S. (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. *CRC Press*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9031202>
- Sandberg, A. (1990). *Effekt av olika havrefraktioner med avseende pgt fytinsyranedbrytning och mineralabsorption*.
https://www.academia.edu/47363174/Saponins_phytic_acid_tannins_and_protease_inhibitors_in_quinoa_Chenopodium_quinoa_Willd_seeds
- Sargantanis, J., Karim, M. N., Murphy, V. G., Ryoo, D., & Tengerdy, R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(2), 149–158. <https://doi.org/10.1002/BIT.260420202>
- Sathe, S. K., & Deshpande, S. S. (2003). BEANS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 403–412. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00083-3>
- Savage, G. P., & Morrison, S. C. (2003). TRYPSIN INHIBITORS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 5878–5884. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00934-2>
- Sawyer, R., & Kirk, R. (1999). *Composición y análisis de alimentos de pearson*. Editorial Continental México.
- Schaller, D. (1978). Fiber content and structure in foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31(10 Suppl). <https://doi.org/10.1093/AJCN/31.10.S99>
- Schlegel, H. (1979). *Microbiologia*. Omega.
- Schlemmer, U. (1989). Studies of the binding of copper, zinc and calcium to pectin, alginate, carrageenan and guar in HCO₃ - CO₂ buffer. In *Food Chem* (32nd ed., pp. 223–224).
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role

and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 Suppl 2(SUPPL. 2), S330–S375.

<https://doi.org/10.1002/MNFR.200900099>

Schlenker, E., & Gilbert, J. (2003). *Williams' essentials of nutrition and diet therapy* (12th ed.).

Schlick, G., & Bubenheim, D. (1993). *Quinoa: An emerging new crop with potential for CELSS -*

NASA Technical Reports Server (NTRS). <https://ntrs.nasa.gov/citations/19940015664>

Scott, K. A., Cox, P. B., & Njardarson, J. T. (2022). Phenols in Pharmaceuticals: Analysis of a

Recurring Motif. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(10), 7044–7072.

<https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C00223>

Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor*

Perspectives in Medicine, 5(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006098>

Sezgin, A., & Sanlier, N. (2019). A new generation plant for the conventional cuisine: Quinoa

(*Chenopodium quinoa* Willd.). In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 86, pp. 51–

58). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039>

Sharma, K., Bindal, G., Rathour, R., & Rana, J. C. (2012). β -carotene and mineral content of

different *Chenopodium* species and the effect of cooking on micronutrient retention.

International Journal of Food Sciences and Nutrition, 63(3), 290–295.

<https://doi.org/10.3109/09637486.2011.624493>

Shekib, L. A. (1994). Nutritional improvement of lentils, chick pea, rice and wheat by natural

fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 1994 46:3, 46(3), 201–205.

<https://doi.org/10.1007/BF01088991>

Shitan, N., & Yazaki, K. (2013). New Insights into the Transport Mechanisms in Plant Vacuoles.

International Review of Cell and Molecular Biology, 305, 383–433.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407695-2.00009-3>

- Shurtleff, W., & Aoyagi, Akiko. (1979). *The book of tempeh* (Vol. 1). Harper & Row.
- Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, 199–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X>
- Singh, U., & Eggum, B. O. (1984). Factors affecting the protein quality of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* 1984 34:4, 34(4), 273–283. <https://doi.org/10.1007/BF01126556>
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244–1262. <https://doi.org/10.1111/BPH.13630>
- Southon, S., Wright, A. J. A., Price, K. R., Fairweather-Tait, S. J., & Fenwick, G. R. (1988). The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *The British Journal of Nutrition*, 59(3), 389–396. <https://doi.org/10.1079/BJN19880048>
- Spehar, C. (2006). Adaptação da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) para incrementar a diversidade agrícola e alimentação no Brasil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 23, 41–62. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/125099/adaptacao-da-quinoa-chenopodium-quinoa-willd-para-incrementar-a-diversidade-agricola-e-alimentacao-no-brasil>
- Steinkraus, K. H. (1983). Indonesian tempeh and related fermentations. In Steinkraus. In M. Dekker (Ed.), *Handbook of Indigenous Fermented Foods* (Vol. 9, pp. 1–94).
- Steinkraus, K. H., Hwa, Y., van buren, M., Provvidenti, D., & Hand, D. (1960). STUDIES ON TEMPEH AN INDONESIAN FERMENTED SOYBEAN FOODa. *Journal of Food Science*, 25(6), 777–788. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1960.TB00026.X>

- Steinkraus, K. H., van Buren, Hackler, L. R., & Hand, D. B. (1965). A pilot-plant process for the production of dehydrated tempeh. *Food Technology*, 19(1), 63–68.
<https://eurekamag.com/research/029/746/029746282.php>
- Stingl, K., Altendorf, K., & Bakker, E. P. (2002). Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends in Microbiology*, 10(2), 70–74.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02287-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02287-9)
- Story, J. A., Furumoto, E. J., & Buhman, K. K. (1997). Dietary fiber and bile acid metabolism--an update. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427, 259–266.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5967-2_27
- Strack, D. (1997). Chapter 10. Phenolic Metabolism. In P. M. Dey & J. B. Harborne (Eds.), *Plant Biochemistry* (12th ed., Vol. 31, pp. 2187–2193). Biol. Pharm. Bull.
https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/112803/CONICET_Digital_Nro.e259c68c-8b9e-472f-a1d4-0281856594ea_Q.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Stuardo, M., & San Martín, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2007.11.003>
- Suparmo, & Markakis, P. (1987). Tempeh Prepared from Germinated Soybeans. *Journal of Food Science*, 52(6), 1736–1737. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1987.TB05919.X>
- Tang, Y., Li, X., Chen, P. X., Zhang, B., Hernandez, M., Zhang, H., Marcone, M. F., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterisation of fatty acid, carotenoid, tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chemistry*, 174, 502–508.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.11.040>

- Tapia, M. (1997). *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación* (2a ed.). FAO.
<https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/3020>
- Tawali, A., Hain, J., & Schwedt, G. (1998). Determination of phytic acid content of soybeans during tempeh production using capillary electrophoresis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 94, 28–30. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE1998O11311>
- Taylor, J. R. N., & Parker, M. L. (2002). Quinoa. *Pseudocereals and Less Common Cereals*, 93–122. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09544-7_3
- Terefe, N. (2016). *Food fermentation*.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Food+Fermentation&author=Terefe,+N.S.&publication_year=2016#d=gs_cit&t=1659398064077&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3AkFzoWQzVk_kJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Des
- Tibe, O., & Amarteifio, J. (2007). Trypsin Inhibitor Activity and Condensed Tannin Content in Bambara Groundnut (*Vigna Subterranea* (L.) Verdc) Grown in Southern Africa. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 11(2).
<https://doi.org/10.4314/jasem.v11i2.55021>
- Toor, B. S., Kaur, A., Sahota, P. P., & Kaur, J. (2021). Antioxidant Potential, Antinutrients, Mineral Composition and FTIR Spectra of Legumes Fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Technology and Biotechnology*, 59(4), 530–542.
<https://doi.org/10.17113/FTB.59.04.21.7319>
- Torres, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican

mango seed: A promising source of natural antioxidants. *LWT*, 112.

<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.06.003>

Trevan, M., Boffey, S., Goulding, K., & Stanbury, P. (1990). *Biotechnología: principios biológicos*. Acribia.

Trudy, M., & James, M. (2020). *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida (7a ed.)*.

Publisher, Medical Content.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2971>

Tucker, L. A., & Thomas, K. S. (2009). Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *The Journal of Nutrition*, 139(3), 576–581.

<https://doi.org/10.3945/JN.108.096685>

VAIDEHI, M. P., SUMANGALA, S. G., & VIJAYAKUMARI, J. (1996). Tempe-based ready-to-prepare food mixes of high nutritional value. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 33(6), 506–509. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2562208>

Vandewater, K., & Vickers, Z. (1996). Higher-protein foods produce greater sensory-specific satiety. *Physiology & Behavior*, 59(3), 579–583. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02113-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02113-2)

Varzakas, T. H., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1997). Pénétration du mycélium et diffusion enzymatique dans les graines de soja au cours de la fermentation tempe. *Advances in Solid State Fermentation*, 59–70. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0661-2_6

Vats, P., Bhattacharyya, M. S., & Banerjee, U. C. (2007). Use of Phytases (myo-Inositolhexakisphosphate Phosphohydrolases) for Combatting Environmental Pollution: A

Biological Approach. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10643380590966190](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10643380590966190), 35(5), 469–486.

<https://doi.org/10.1080/10643380590966190>

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010).

Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2541–2547. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4158>

Vijay, K., Sowmya, P. R. R., Arathi, B. P., Shilpa, S., Shwetha, H. J., Raju, M., Baskaran, V., &

Lakshminarayana, R. (2018). Low-dose doxorubicin with carotenoids selectively alters redox status and upregulates oxidative stress-mediated apoptosis in breast cancer cells.

Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 118, 675–690. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.06.027>

Villacrés, E., Quelal, M. B., Fernández, E., García, G., Cueva, G., & Rosell, C. M. (2020).

Impact of debittering and fermentation processes on the antinutritional and antioxidant compounds in *Lupinus mutabilis* sweet. *LWT*, 131, 109745.

<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109745>

Villanueva, R. (2014). *El gluten del trigo y su rol en la industria de la panificación*. 32, 231–246.

https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/view/123

Viña, S. (2013). Productos Naturales Vegetales. In *Compuestos Fenólicos* (pp. 91–150).

Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/112803>

von Poser, G. (2007). Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y

Procesos. In E. Cassel & R. M. Figueiró Vargas (Eds.), *Taninos: actividades biológicas*.

Programa CYTED - Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. EDIPUCRS.

- Wang, L., Liu, Y., & Chen, H.-Z. (2018). Advances in Porous Characteristics of the Solid Matrix in Solid-State Fermentation. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 19–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00002-5>
- Wang, R., & Guo, S. (2021). Phytic acid and its interactions: Contributions to protein functionality, food processing, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2081–2105. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12714>
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), I1.1.1-I1.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.FAI0101S06>
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. H. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *The Journal of Nutrition*, 138(3), 439–442. <https://doi.org/10.1093/JN/138.3.439>
- Westernbrink, S., Oseredczk, M., Castanheira, I., & Roe, M. (2009). Food composition databases: The EuroFIR approach to develop tools to assure the quality of the data compilation process. In *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.013> (3):759-767.
- Wilseman, A. (1991). *Manual de biotecnología de las enzimas*. Acibian.
- Wilson, H. (1981). Genetic variation among South America populations of tetraploid *Chenopodium* sect. *Chenopodium* subsect. *Cellulata* Syst. (1ra ed., Issue 6, pp. 380–398.). <https://doi.org/10.2307/24184501>
- Wilson, H. (1988). Quinoa biosystematics I: Domesticated populations. *Economic Botany* 1988 42:4, 42(4), 461–477. <https://doi.org/10.1007/BF02862791>
- Wilson, M. S. C., Bulley, S. J., Pisani, F., Irvine, R. F., & Saiardi, A. (2015). A novel method for the purification of inositol phosphates from biological samples reveals that no phytate is

present in human plasma or urine. *Open Biology*, 5(3).

<https://doi.org/10.1098/RSOB.150014>

Wong, J. M. W., & Jenkins, D. J. A. (2007). Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *The Journal of Nutrition*, 137(11 Suppl). <https://doi.org/10.1093/JN/137.11.2539S>

Wood, S., Lawson, L., Fairbanks, D., Robison, L., & Andersen, W. (1993). Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis. Journal of Food Composition and Analysis*, 6(1), 41–44.

<https://doi.org/10.1006/JFCA.1993.1005>

Xiao, Y., Rui, X., Xing, G., Wu, H., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 enhanced antioxidant capacity and DNA damage protective effect of oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Functional Foods*, 16, 58–73.

<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.04.032>

Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Functional Foods*, 10, 210–222. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.06.008>

Yadav, N., Kaur, D., Malaviya, R., Singh, M., Fatima, M., & Singh, L. (2018). Effect of thermal and non-thermal processing on antioxidant potential of cowpea seeds.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431659>, 21(1), 437–451.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1431659>

Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

- Yang, J., Lu, H., Li, M., Liu, J., Zhang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2017). Development of chitosan-sodium phytate nanoparticles as a potent antibacterial agent. *Carbohydrate Polymers*, 178, 311–321. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.09.053>
- Yeshajahu, P., & Meloan, C. E. (1987). *Food Analysis. Theory and Practice* (2a ed AVI).
- Young, G. P., Hu, Y., le Leu, R. K., & Nyskohus, L. (2005). Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment--gene interactions. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(6), 84. <https://doi.org/10.1002/MNFR.200500026>
- Yubero, F. (2013). Semillas de Moringa oleífera cultivadas en el chaco central como fuente de enzimas para alimentacion animal. *Copendio de Ciencias Veterinarias* , 3(1). http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2226-17612013000100004
- Zaid, A., & Wani, S. H. (2019). Reactive oxygen species generation, scavenging and signaling in plant defense responses. *Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress*, 111–132. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27165-7_7/COVER/
- Zalles, J., & de Lucca, M. (2006). *Utasan utjir qollanaka medicinas junto a nuestra casa, descripción y uso de cien plantas medicinales del altiplano boliviano*. <https://www.bivica.org/file/view/id/1397>
- Zambelli, B., Berardi, A., Martin-Diaconescu, V., Mazzei, L., Musiani, F., Maroney, M. J., & Ciurli, S. (2014). Nickel binding properties of Helicobacter pylori UreF, an accessory protein in the nickel-based activation of urease. *Journal of Biological Inorganic Chemistry : JBIC : A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 19(3), 319–334. <https://doi.org/10.1007/S00775-013-1068-3>

- Zengin, G., Aktumsek, A., Guler, G. O., & Zengin, G. (2011). *Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty Acid Composition of Centaurea urvillei DC. subsp. hayekiana Wagenitz* .
- Zevallos, V. F., Herencia, L. I., Chang, F., Donnelly, S., Ellis, H. J., & Ciclitira, P. J. (2014). Gastrointestinal effects of eating Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in celiac patients. *American Journal of Gastroenterology*, 109(2), 270–278.
<https://doi.org/10.1038/ajg.2013.431>
- Zikankuba, V., & James, A. (2017). Quinoa: A potential crop for food and nutritional security in Tanzania | ECHOcommunity.org. *American Journal of Research Communication*, 4–28.
<https://www.echocommunity.org/resources/696fc355-7afe-4952-84c0-92f76419ad73>
- Zimmer, M. (2012). Molecular Mechanics Evaluation of the Proposed Mechanisms for the Degradation of Urea by Urease. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/07391102.2000.10506568*, 17(5), 787–797. <https://doi.org/10.1080/07391102.2000.10506568>