



**ASSESSMENT OF THE
FORMULATIONS OF ANTI-ANEMIC
BISCUITS WITH DIFFERENT
CONTENTS OF QUINOA AND
DIFFERENT CONTENTS IN HEMINIC
IRON, BY REDUCTION OF ANEMIA IN
HOLTZMAN RATS**

**EVALUACIÓN DE
FORMULACIONES DE GALLETAS
ANTIANÉMICAS CON DIFERENTES
CONTENIDOS DE QUINUA Y
DIFERENTES CONTENIDOS EN
HIERRO HEMÍNICO, POR REDUCCIÓN
DE ANEMIA EN RATAS HOLTZMAN**

Received 02 29 2020
Accepted 06 22 2020
Published 06 30 2020

Vol. 37, No.2, pp. 74-84, May./Jun.2020
Revista Boliviana de Química

37(2), 74-84, May./Jun. 2020
Bolivian Journal of Chemistry
DOI: 10.34098/2078-3949.37.2.2



Full original article

Peer-reviewed

R. Brita Anaya González^{1,*}, Eusebio De La Cruz Fernández², Reynán Córdor Alarcón¹, Eduardo Espitia Rangel³, Ruth Navarro Torres¹, Jime Rivera Villar¹

¹Unidad de Investigación e Innovación, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Portal Independencia N°57 Plaza de Armas/Huamanga-Ayacucho, Phone: +5166-313434. Apartado Postal 220, Ayacucho – Perú

²Unidad de Investigación e Innovación, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Portal Independencia N°57 Plaza de Armas/Huamanga-Ayacucho, Phone: +5166-313434. Apartado Postal 220, Ayacucho – Perú

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Coatlinchán, Texcoco, México, A.P. 307 Tels.: (595) 92 12657, 9212715, Ext. 134, México

Keywords: *Anemia, Biscuit, Chenopodium quinoa, Bovine blood.*

Palabras clave: *Anemia, Galletas, Chenopodium quinoa, Sangre bovina.*

ABSTRACT

In this investigation, the formulation of antianemic cookies with different contents of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and heme iron was evaluated in the reduction of anemia in Holtzman rats. White quinoa from the INIA-Ayacucho Experimental Station and bovine blood obtained from the slaughterhouse of the Carmen Alto district (Ayacucho, Peru) were used. The methodology included: 1. treatment of the quinoa and bovine blood sample, 2. formulation of the mixture, 3. bromatological, microbiological analysis and organoleptic evaluation of the elaborated product, 4. determination of hemoglobin. The results of the bromatological analysis of the product showed: 346.72 Kcal, 5.2% moisture, 10.25% protein, 20.17% fat, 42.9% carbohydrate, 1.25% ash, 0.09% acidity, 0.15 meq / Kg of oil, 27.6 mg Fe and absence of potassium bromate. The microbiological analysis reported: *Salmonella* sp. absent, *E.*



coli MPN / g <3, *Staphylococcus aureus* coagulase (+) MPN / g <3, *Clostridium perfringens* CFU / g <10 and count of molds CFU / g <10, being suitable for human consumption. The iron-poor diet led to a decrease in hemoglobin levels (11.4 g / dL) and the fortified diet recovered these levels (15.66 g / dL). The formulated antianemic cookies comply with the nutritional requirements required by FAO and the Peruvian Sanitary Standards, proving to be suitable for human consumption, likewise the treatments in Holtzman rats allowed to reaffirm that with adequate levels of *Chenopodium quinoa* Willd and hemic iron, it was reduced anemia.

*Corresponding author: banaya13@hotmail.com

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la formulación de galletas antianémicas con diferentes contenidos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y de hierro hemínico en la reducción de la anemia en ratas Holtzman. Se utilizó quinua blanca de la Estación Experimental INIA-Ayacucho y sangre de bovino obtenida del camal del distrito de Carmen Alto (Ayacucho, Perú). La metodología comprendió: 1. tratamiento de la muestra de quinua y sangre bovina, 2. formulación de la mezcla, 3. análisis bromatológico, microbiológico y evaluación organoléptica del producto elaborado, 4. determinación de hemoglobina. Los resultados del análisis bromatológico del producto mostraron: 346,72 Kcal, 5,2% humedad, 10,25% proteína, 20,17% grasa, 42,9% carbohidrato, 1,25% ceniza, 0,09% acidez, 0,15 meq/Kg de aceite, 27,6 mg Fe y ausencia de bromato de potasio. El análisis microbiológico reportó: *Salmonella* sp. ausente, *E. coli* NMP/g <3, *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) NMP/g <3, *Clostridium perfringens* UFC/g <10 y recuento de mohos UFC/g <10, siendo apta para consumo humano. Con la dieta pobre en hierro se indujo a la disminución de los niveles de hemoglobina (11,4 g/dL) y con la dieta fortificada se recuperaron estos niveles (15,66 g/dL). Las galletas antianémicas formuladas cumplen con los requerimientos nutricionales que exige la FAO y las Normas Sanitarias Peruanas, demostrándose ser aptas para consumo humano, así mismo los tratamientos en ratas Holtzman permitieron reafirmar, que con niveles adecuados de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico, se redujo la anemia.

INTRODUCCIÓN

Los granos andinos como la quinua son recursos alimenticios que poseen excelentes propiedades nutricionales y al ser fortificados, se pueden obtener alimentos integrales como las galletas antianémicas, muy difundidas en los niños en edad preescolar. Tales alimentos sirven también para atenuar la anemia en población vulnerable como ser niños, adolescentes, madres gestantes y ancianos, siendo la razón del presente trabajo de investigación.

La anemia infantil es un problema de salud pública y bienestar social en Perú, alcanzando un gran porcentaje en la región de Ayacucho y es una de las mayores causas de desnutrición en los niños y el consecuente bajo rendimiento escolar. En base a todo ello y siguiendo un modelo animal, se evaluó si las galletas formuladas a base de granos andinos (*Chenopodium quinoa* Willd variedad blanca) con la adición de hierro hemínico, mejoran los niveles de proteínas y hierro, estos últimos componentes nutritivos, en sus niveles adecuados, disminuyen el problema de anemia especialmente de la población infantil. El contenido de proteínas y otros parámetros físicoquímicos en la formulación de las galletas se realiza a través de métodos estandarizados por la AOAC [1] y la influencia del hierro en los niveles de hemoglobina, por el método de la Cianometahemoglobina [2] antes y después del tratamiento en ratas Holtzman. Adicionalmente, este estudio revaloriza la quinua, ancestralmente consagrada como alimento de cultivo sustentable y rico en proteínas..

El flagelo de la anemia en la población infantil y juvenil de nuestra región es muy crítico en particular en la población periurbana y rural, ello nos motivó en la búsqueda de productos innovadores como las galletas antianémicas enriquecidas con granos andinos, y fortificadas con hierro hemínico, con el fin de reducir el mal referido.

En los últimos años con el apoyo de organismos nacionales como el: Ministerio de Agricultura, el Instituto Nacional de Salud, MINSAL, ONGs, entre otros; además de organismos extranjeros especialmente la FAO, brindan apoyo social a fin de aminorar el problema de anemia, pese a ello continúa o va en aumento. Por tanto, con estas materias primas se planteó formular nuevos productos con alto valor nutritivo, rico en hierro asimilable y de acceso a la población. Es contradictorio que disponiendo de estos productos con tales bondades y beneficios existan distintos grados de desnutrición y anemia especialmente en la población infantil. Con el presente estudio a nivel de laboratorio, se proyecta plasmar en humanos como alternativa para contrarrestar esta malnutrición por déficit.



La FAO [3], organismo internacional de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, considera a la quinua como uno de los alimentos más promisorios de la humanidad no solo por sus grandes propiedades benéficas y por sus múltiples usos, sino también por considerarla como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana, sobre todo por su capacidad para crecer en ambientes adversos [4-6].

El producto formulado, básicamente destinado a la población infantil escolar en zonas como Ayacucho (zonas periurbanas y rurales), pretende contribuir a la disminución del problema latente que vive nuestra región como es la anemia, la cual si alcanza el nivel crónico el daño se hace irreversible. Se busca así mismo, revalorizar el consumo de la quinua que en muchas zonas se va perdiendo, también es viable mejorar la presentación de este recurso dándole un valor agregado de beneficio al agricultor. La finalidad del estudio fue obtener una galleta antianémica a base de quinua y hierro hemínico (con ingredientes que permiten propiedades organolépticas agradables) de buena aceptabilidad sensorial con miras a su futura producción en serie. En la investigación se planteó como problema: ¿Cuál será la formulación adecuada de galletas antianémicas, con diferentes niveles de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico en la reducción de la anemia en ratas Holtzman?, cuya hipótesis a contrastar fue: La formulación de galletas antianémicas con niveles mayores de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico reducen la anemia en ratas Holtzman.

El objetivo de este estudio fue evaluar la formulación de galletas antianémicas con diferentes niveles de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico en la reducción de la anemia en ratas Holtzman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboradas las formulaciones 1 y 2, y ser sometidas a la prueba de aceptación (40 jueces), la que obtuvo más aceptación fue la formulación 2 (70%). Dicha formulación fue reajustada y sometida a evaluación mediante una escala hedónica [7], donde se solicitó a los jueces que probaran las muestras y luego respondieran en la cartilla. La preferencia fue para la formulación 2, mediante una marca en los atributos y al efectuar el ANVA ($\alpha = 0,05$). Esta formulación fue sometida a los análisis bromatológicos y microbiológicos, para ser suministrada como alimento fortificado a las ratas.

Los resultados de los análisis bromatológicos y microbiológicos se hicieron con tres repeticiones cada ensayo, cuyos promedios se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla N° 1. Análisis bromatológico de la galleta antianémica por 100 g del producto

Kcal	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Carbohidrato %	Ceniza %	Acidez %	Bromato potasio	Hierro mg
346,72	5,2	10,25	20,17	42,90	1,25	0,09	0,00	27,60

Tabla N° 2. Análisis microbiológico de la galleta antianémica por 100 g del producto

Ensayo	Resultado
Mohos (UFC/g)	<10
<i>Salmonella</i> sp	Ausencia
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<3
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa + (NMP/g)	<3
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)	<10

Tabla N° 3. Análisis de perfil de textura de la galleta antianémica

Dureza (N)	Adhesividad (N)	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad (N)	Masticabilidad (K)
Formulación 1					
76,05±1,32 a	-0,06±0,001 a	0,89±0,006 b	0,78±0,007 a	59,40±1,48 a	5,47±0,11 a
Formulación 2					
69,22±1,90 b	-0,05±0,002 a	0,83±0,01 a	0,76±0,007 a	59,02±2,65 a	5,16±0,08 b

Promedios con letras distintas, en la misma columna, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).



Los resultados del análisis sensorial fueron sometidos a un ANVA para los atributos evaluados, en vista de no existir diferencia significativa no se efectuó la prueba de Tukey. Las galletas de la formulación 2, fueron calificadas como muy preferidas por los jueces.

El contenido en proteínas y hierro más significativo presentó la formulación 2, ya que es la que tiene mayor proporción de harina de quinua y de sangre, que son las materias primas más abundantes y que principalmente aportan dichos nutrientes. Estudios realizados por Benítez et al. [8], en la formulación de galletas, reportan un menor porcentaje de hierro entre 6,53 y 7,31%. Por otro lado, el mayor porcentaje de grasa y la humedad más baja, lo presentó la formulación 1, la cual posee el mayor porcentaje de margarina y menor contenido de leche en las dos formulaciones.

En la tabla 1, se puede observar que la cantidad de proteínas, grasas, carbohidratos y hierro en el producto formulado, presentan niveles adecuados para suplementar una dieta, es decir favorecer el desarrollo y crecimiento en una población con bajos niveles de proteínas y hierro hemínico.

Duarte et al. [9], efectuaron la evaluación de galletas fortificadas con sangre entera de bovino secado por atomización, con el objetivo de evaluar la calidad nutricional, determinaron la composición proximal, contenido de hierro, Índice de Eficiencia Proteica (PER); concluyendo que la fortificación de galletas con sangre bovina incrementa notablemente el contenido proteínico y de hierro. Lo cual concuerda con los resultados de nuestro trabajo respecto al incremento de proteínas hasta 10,25% y de hierro hasta 27,6 mg% (tabla 1).

En la tabla 2, se presenta los resultados del análisis microbiológico realizado con el producto elaborado (galletas antianémicas) que cumple con los requisitos microbiológicos establecidos en la Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA. [10], así como con la "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano",

Pruebas corroboradas por el laboratorio CERTIFICAD SAC, certifican que el producto es apto para el consumo humano por cumplir con lo exigido por la Norma Sanitaria para la Fabricación, Elaboración y Expendio de Productos de Panificación, Galletería y Pastelería [11,4] y está de acuerdo con los Manuales para el control de calidad de los alimentos [12].

En el trabajo de investigación, la incorporación a la mezcla de un pseudocereal como ser la quinua, y sangre bovina permitió asegurar la presencia de una buena cantidad de hierro. El hierro de la quinua y de la hemoglobina bovina son muy considerables en cuanto a la proporción y absorción en el cuerpo humano. Con una asimilación de un 80% - hierro hemínico [13]. El agregado de la hemoglobina bovina para la formulación de las galletas es una gran alternativa para proporcionar una buena fuente de hierro.

Garay [14], formuló y elaboró galletas antianémicas con quinua y hemoglobina bovina que cubrieron los requerimientos nutricionales (hierro, proteína, lípidos y carbohidratos) de los niños en etapa pre escolar: 34 niños de las Instituciones inicial 43212 AAHH Mollepata-distrito Ayacucho y CP Allpachaca-distrito de Chiara. Las galletas denominadas "Súper hierro" (enriquecida y fortificada) representan una buena alternativa para combatir la anemia en los niños de etapa pre escolar (menores de 6 años). La formulación con una sustitución de 50% de harina de trigo por la sangre pre cocida, fue la más aceptable; a pesar de que sabían que contenía hemoglobina bovina, debido a que las galletas son de sabor chocolate y esto hace que sea agradable. Comparado a nuestro trabajo es similar a la formulación 2 con 56,8% de harina de quinua y harina de sangre bovina, la misma que gozó de gran preferencia.

La presencia de sangre en la formulación de la galleta aporta no solo hierro, sino también proteínas de buena calidad, en especial albúminas (2,3 g%), globulinas (1,2 g%), como hemoglobina total 13,8 g% y como proteínas totales 17,3 g% [15,16]; comparado al análisis bromatológico de nuestra galleta los valores obtenidos son menores, dado a que están referidos al producto final como galleta, no de manera particular al componente de la sangre.

Desde el punto de vista del valor nutritivo, la sangre ha sido comparada con las carnes, la leche y los huevos. Ella posee un 18% de proteína y tiene los aminoácidos esenciales que requiere el hombre para su normal funcionamiento [9,17]; sin embargo, en muchas plantas de beneficio es desechada, desperdiándose una importante fuente proteínica, a su vez que se convierte en un efluente altamente contaminante [8].

En las últimas décadas, la sangre de algunas especies animales como la del bovino, porcino y otros, es aprovechada en diversos países para la alimentación humana, incorporándola en los alimentos como fuente de proteína de bajo costo; estas proteínas sanguíneas también pueden utilizarse en la formulación de los alimentos concentrados para consumo animal. Sin embargo, la utilización de la sangre en la formulación de alimentos es limitada debido al fuerte olor y sabor que imparte a los mismos [18]. El futuro de la alimentación en el Perú, y quizás de otros países en desarrollo, va a depender en gran parte de que la tecnología agroalimentaria sea capaz de aprovechar las fuentes



disponibles de alimentos en el país, adaptar y desarrollar nuevos productos que permitan variar y complementar la dieta de la población mayoritaria a bajo costo.

La disponibilidad biológica (biodisponibilidad) del hierro, está determinada por su composición química, define el potencial que tiene el hierro en la dieta para ser absorbido por el organismo [20]. El hierro hemínico, que se encuentra principalmente en la res, el pollo y el pescado como parte de la hemoglobina y la mioglobina, tiene la mayor disponibilidad biológica. Se estima que del 5 al 35 % del hierro hemínico es absorbido por el organismo [19]. Por otro lado, hay menor absorción del hierro no-hemínico, presente en las leguminosas, en los cereales, en ciertas verduras y frutas. Usualmente, la dieta está constituida por aproximadamente 10% de hierro hemínico y 90% de hierro no-hemínico [13].

Evaluación de peso y hemoglobina

Treinta animales de experimentación (ratas Holtzman), luego de la etapa de aclimatación y adecuación, fueron separados en jaulas individuales especialmente confeccionadas para la investigación, dado que su alimentación fue individualizada, con consumo de agua potable a libre demanda. Al inicio se registró el peso de cada uno y se realizó la primera toma de muestra sanguínea para determinar los niveles de hemoglobina basal mediante el método basado en la medición de la mayoría de hemoglobinas presentes en la sangre total humana o de roedores a nivel capilar o venoso (recomendado por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología y por el Procedimiento Operativo Estándar [2]).

Etapa de depleción (inducción a anemia). Consistió en la alimentación a base de maíz (dieta pobre en hierro) y agua a todos los especímenes. Este tratamiento duró cinco semanas. Luego se registró el peso, y se comparó al primer control, observándose la disminución del mismo (fig.1) posiblemente por la dieta pobre en hierro a base de maíz; de manera similar ocurrió con los niveles de hemoglobina, en la Figura 2 se ve claramente la disminución de dichos niveles.



Figura N° 1. Peso corporal medio del grupo control y experimental antes y después del tratamiento

Etapa de repleción (recuperación). Se codificaron jaulas y animales, para su distribución al azar en tres grupos: un primer grupo de control y dos grupos experimentales. Se mantuvo la misma dieta para el grupo de control. Los dos grupos experimentales (cada grupo conformado por 10 especímenes) recibieron dos tipos de dosis, el primer grupo experimental (10 ratas) se alimentó con las galletas de la formulación 1 y el segundo grupo (10 ratas) con las galletas de la formulación 2, por el periodo de cinco semanas. Los resultados demuestran que la formulación 2 fue la mejor, debido a que nutricionalmente tuvo un mayor contenido en hierro y proteína, y un porcentaje intermedio en grasa. Estos atributos se relacionan con el análisis del perfil de textura, pues le confiere a la galleta de sangre mayor suavidad para su mejor aceptabilidad, que se logra cuando el alimento retiene una mayor cantidad de humedad.

Según investigaciones realizadas por el INS [20,21], “la anemia es responsable de la disminución de cinco puntos en el coeficiente intelectual en niños con antecedentes de esta enfermedad en el primer año de vida; siendo la causa principal la deficiencia de hierro, por otro lado la población peruana no consume alimentos que posean ácido fólico, zinc, vitamina A y B₁₂, lo que contribuye a no absorber el poco hierro consumido”. Por ello, es necesario abordar el



problema de manera integral a fin de lograr el desarrollo físico, intelectual y social óptimo; sin embargo, las altas prevalencias indican que existe un problema de biodisponibilidad, agravado por el bajo consumo de los micronutrientes. Con los resultados de las investigaciones con modelos animales se proporciona información necesaria para diseñar pruebas humanas por sus semejanzas anatómicas, fisiológicas, neurológicas, bioquímicas, farmacológicas y de comportamiento [22].

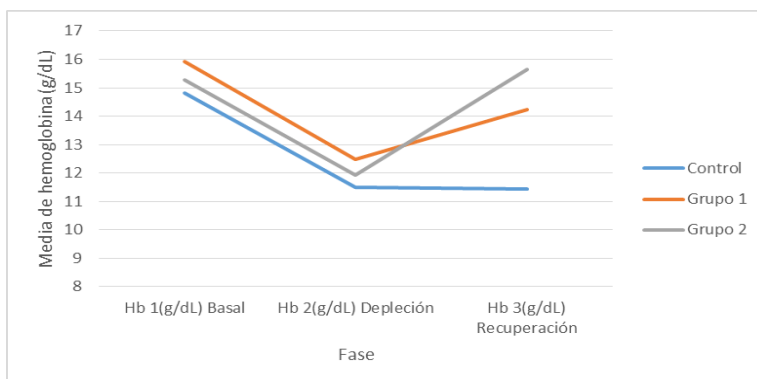


Figura N° 2. Hemoglobina media del grupo control y experimental antes y después del tratamiento

A nivel del mar, la concentración de hemoglobina para diagnosticar anemia en niños de 5 a 11 años refiere: sin anemia $\geq 11,5$, leve 10,9 a 11,5, moderada 8 a 10,8 y grave < 8 g/dL [1]. Rangos muy parecidos a los detectados en animales de experimentación (ratas), cuyo valor normal de hemoglobina es de 11,1 a 18 g/dL, considerándose el rango inferior a 11g/dL como anemia [23].

La tasa de absorción de hierro hem (hemínico, fuente animal) es de 25 % y no hem (fuente vegetal) de 1-5 %, siendo la absorción del hierro total (hem y no hem) de 5 a 15 %. Para que el hierro se absorba debe estar en su estado ferroso (Fe^{2+} que se logra a pH ácido). Sin embargo, en el plasma el hierro vuelve a su estado férrico (Fe^{3+}) uniéndose a la transferrina para ser transportado hasta el hígado (almacenado como hemosiderina o ferritina). Es una metaloenzima, que trabaja como cofactor de la enzima desoxirribonucleasa, arginasa, peroxidasa, catalasa, citocromo oxidasa, cumpliendo la función de óxido-reducción. La absorción se desaprovecha por infestaciones parasitarias (uncinariasis, malaria, etc.) [13].

García y Villar [24] demostraron que una dieta a base de quinua enriquecida con retinol (Arovit- forma comercial), incrementa significativamente la concentración de hemoglobina en ratas albinas con anemia inducida.

La fase de depleción (inducción a anemia) consistió en disminuir la concentración de la hemoglobina por debajo de las cantidades fisiológicas propias de la especie mediante una alimentación basada en una dieta deficitaria en micronutrientes involucrados en la síntesis de hemoglobina, mientras que en la fase de repleción (recuperación) se procedió a elevar nuevamente la concentración de hemoglobina hasta valores fisiológicos normales a través del suministro de diferentes fuentes de los micronutrientes deficitarios [25].

Respecto a la deficiencia de hierro como indicativo de anemia, los autores reportan que la deficiencia de hierro tiene un origen dietético cuando la cantidad que absorbe el organismo humano, de los alimentos, no satisface sus requerimientos fisiológicos [26]. La deficiencia de hierro tiene un espectro que va desde la reducción y agotamiento de las reservas de este nutriente, hasta la reducción de las células rojas y de la concentración de hemoglobina, lo cual no necesariamente representa anemia. La deficiencia de hierro tampoco es una causa necesaria de la anemia, pues ésta, también puede deberse a la deficiencia de otros nutrientes, como el ácido fólico y la vitamina B₆, o por hemoglobinopatías, como la talasemia, o por pérdidas de sangre, y por otros trastornos metabólicos. Sin embargo, la deficiencia de hierro es la causa más común.

Ayala [27], trabajó con ratas albinas de la raza Holtzman machos de un mes de vida con determinación de peso y de hemoglobina, y alimentados con 15 y 20 gramos por día de cada dieta controlada (deficitaria, estándar y fortificada). La dieta deficitaria (fue efectiva con un 80 % de animales anémicos ($\text{Hb} < 11$ g/dL) basada en la concentración de la hemoglobina (Hb promedio: 10,13 g/dL). El tratamiento con yogurt fortificado con vitamina A como palmitato (retinol 0,212 mg), ácido fólico (0,095 mg), sulfato ferroso estabilizado con vitamina C y



microencapsulado (3,49 mg de Fe) y gluconato de zinc estabilizado (3,92 mg de zinc) por 100 g de alimento, tuvo un efecto anti anémico, en base a la concentración de hemoglobina (Hb promedio: 15,04 g/dL).

Respecto al peso corporal, al culminar el periodo de tratamiento con la dieta fortificada, se reportó en bibliografía un incremento significativo del mismo, (p -valor < 0.05) [27]. Similar fue el resultado obtenido en el presente estudio, confirmado por el análisis de varianza significativo ($\alpha = 0,05$) y la prueba de Tukey que muestra que el promedio de peso de las ratas alimentadas con la formulación 2 es mayor y significativamente diferente al del grupo control y al del grupo experimental que recibió la formulación 1 (fig. 3).

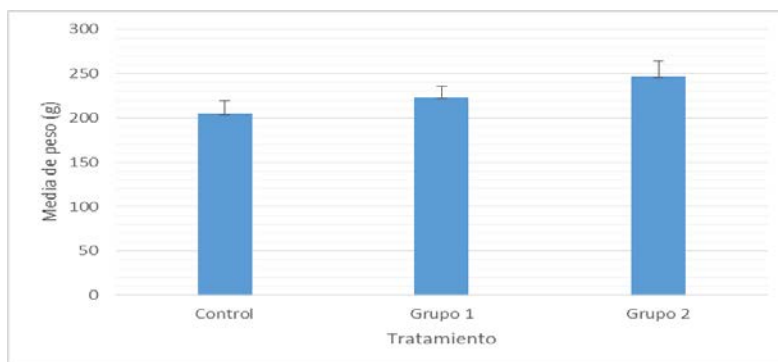


Figura N° 3. Peso corporal medio y desviación típica del grupo control y experimental

Ayala reporta niveles de hemoglobina al final del periodo de depleción de un valor promedio de 10,13 g/dL [25,27], referidos a un valor de 10,73 g/dL, datos que comparados a los de nuestra investigación (11,4 g/dL) son ligeramente inferiores, debido a que la formulación usada no consideró los micronutrientes que participan en la síntesis de hemoglobina y solo se contempló el aporte de proteínas y hierro. Sin embargo, luego del periodo de recuperación el análisis de varianza fue significativo ($\alpha = 0,05\%$) y la prueba de Tukey mostró que el promedio del nivel de hemoglobina de los tres grupos son significativamente diferentes, siendo mayor en las ratas alimentadas con la formulación 2 (15,66 g/dL) (fig. 4) y el grupo de control que no recibió la galleta fortificada mantuvo sus niveles de hemoglobina.

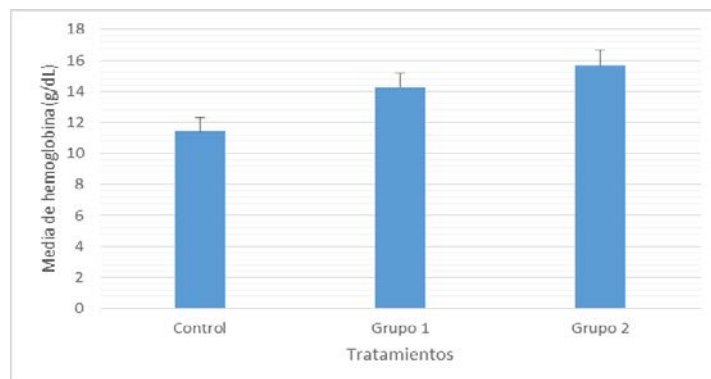


Figura N° 4. Hemoglobina media y desviación típica del grupo control y experimental

El análisis de perfil de textura de las galletas antianémicas reportado en la tabla 4, el ANOVA de las dos formulaciones, exhibió diferencia significativa en la dureza, elasticidad y masticabilidad de las muestras. La mayor elasticidad la presentó la formulación 2 la cual posee el mayor porcentaje de proteína y harina de sangre bovina. La formulación 1 presentó la dureza más elevada ($76,05 \pm 1,32$ N) y una masticabilidad ($5,47 \pm 0,11$ kg) intermedia en comparación con la otra formulación, lo cual puede estar relacionado con su bajo contenido en humedad. Mientras que la masticabilidad



más baja la exhibió la formulación 2 ($5,16 \pm 0,08$ kg) entendiéndose que esta galleta requiere desde el punto de vista sensorial, más tiempo para su deglución en la boca antes de comerla.

Tabla N° 4. Formulación de galletas antianémicas en gramos (%)

Ingredientes	Formulación 1	Formulación 2
Harina de quinua	33.3	36.2
Harina de sangre	33.3	36.2
Margarina	8.3	4.5
Azúcar	16.6	18.1
Leche	4.2	4.5
Polvo para hornear	2.9	0.4
Esencia de vainilla	1.5	0.2
	100.00	100.00

De la experimentación efectuada concluimos que las galletas antianémicas cumplen con los requerimientos nutricionales que exige la FAO [3,28,30] y las Normas Sanitarias Peruanas (CERTIFICAD SAC) demostrando ser aptas para consumo humano, así mismo los tratamientos en ratas Holtzman permitieron reafirmar, que con niveles adecuados de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico, se reducen la anemia.

EXPERIMENTAL

Sobre el material a analizar

Los granos de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” del cultivar blanco, fueron obtenidos de la Estación Experimental INIA-Ayacucho y trasladados al laboratorio de Bioquímica donde fueron seleccionados, lavados y secados y luego transportados al Centro Experimental de Panificación (CEP) de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia (FIQM) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH). Las muestras de sangre bovina fueron obtenidas del Camal de Quicapata - Carmen Alto de animales inspeccionados por el veterinario del establecimiento con la debida asepsia (inocuidad y seguridad) y transportadas al CEP para los tratamientos pertinentes hasta la obtención del puré y elaboración de las formulaciones respectivas (tabla 4) para ser mezcladas con los demás ingredientes para la elaboración de las galletas antianémicas.

El procesamiento de la muestra de quinua, el análisis bromatológico y el análisis microbiológico se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. El procesamiento de la sangre bovina, la formulación de la mezcla y la evaluación sensorial del producto elaborado, se realizó en el CEP de la FIQM-UNSCH.

Definición de población y muestra

Población

Granos de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” y sangre de bovino.

Muestra

5 kg de *Chenopodium quinoa* Willd “quinua” variedad blanca proveniente de la Estación Experimental INIA-Ayacucho. 3 L de sangre de bovino obtenido del camal del distrito de Carmen Alto, provincia de Huamanga.

Diseño metodológico

a. Tratamiento de la muestra de quinua en el laboratorio de Bioquímica - FCB



.Lavado de las semillas, con el propósito de eliminar las saponinas. El primer enjuague se realizó para eliminar los restos de perigonio. Se lavó sucesivamente ≈ 1 kg de semillas con agua potable, hasta que no haya producción de espuma, que asegura la eliminación prácticamente del 100% del contenido de saponina.

Secado de las semillas. Las semillas húmedas se colocaron en la bandeja con espesor no superior a 2 cm, para optimizar el secado, en una estufa a 50°C , hasta alcanzar una humedad del $15\% \pm 2$. Luego se trasladó al CEP de la FIQM, donde se realizó la molienda de la semilla en un molino mixto de martillo/cuchillo, para la obtención de harina, la que se retiró a temperatura que no superó los 40°C .

b. Recolección y tratamiento térmico de sangre bovina

Previamente a la recolección de sangre se limpió el pelaje o piel del animal en el lugar de la incisión evitando el contacto de la vasija recolectora con la misma (inocuidad). Luego se trasladó la sangre coagulada, al CEP y fue sometida a pre-cocción en una cocina semi-industrial a 75°C por 15 a 20 min, con agitación constante y cuidando que no se quemara, con la finalidad de destruir cualquier germen patógeno. Finalmente se realizó un pre-prensado con una gasa, y posteriormente la molienda en el molino de carne.

c. Formulación y elaboración de la mezcla

El registro de peso de los insumos se hizo en una balanza analítica marca ADN. En el amasado se incorporaron la materia prima y el resto de componentes para su mezclado homogéneo en la máquina amasadora, por 20 min. Obtenida la masa, se repasó la misma con el rodillo en la mesa de trabajo hasta lograr un espesor homogéneo de 0,6 cm y luego fue cortada en forma circular formando galletas (5 cm de radio), para luego colocarlas en bandejas y conducir las al horno rotatorio (marca ANLIN), a 160°C por 15 min. Luego se retiró el material y fue enfriado hasta temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, las galletas fueron colocadas a cajas de cartón para ser almacenadas en un lugar limpio y seco alejado de olores extraños. El tiempo de vida máximo fue de 1 mes, debido a la ausencia de conservantes. Las formulaciones empleadas se detallan en la tabla 4.

d. Análisis bromatológico

El análisis bromatológico incluyó la cuantificación de: proteínas (Kjeldhal), lípidos (Soxhlet), carbohidratos (por diferencia), según lo establecido por AOAC [1] así como la determinación de humedad (método gravimétrico por desecación), cenizas por incineración, cada ensayo fue realizado por triplicado.

e. Análisis microbiológico

Se tomó como base 1,0 g de muestra (galleta), se colocó en un frasco homogenizador conteniendo 99 mL de agua peptonada alcalina al 0,1%, se mezcló en una licuadora a mediana revolución por 2 min; a partir de esta dilución (10^{-1}) se preparó 5 diluciones seriadas en tubos con 9 mL de agua peptonada alcalina estéril para su respectiva siembra en los medios. El recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras, se realizó utilizando el contador de colonias.

Los recuentos bacterianos son expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g). Cada procedimiento se realizó por triplicado. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, referidos en su Art. 15. [8,28,29].

f. Adecuación de los animales de experimentación

Antes de iniciar la investigación se realizó la aclimatación y adecuación (siete a diez días) de todos los animales (30 ratas albinas, machos, de raza Holtzman), adquiridos del Instituto Nacional de Salud (INS) (Chorrillos-Lima) de seis meses de nacidos. Luego de la aclimatación se pesó y se realizó el control de peso y la primera determinación de hemoglobina (basal).

Enseguida los animales fueron divididos de manera aleatoria en tres grupos, marcados y colocados en jaulas individuales. Por un periodo de cinco semanas recibieron una dieta pobre en hierro solo a base de maíz 15g/día, sin



ningún suplemento: G1 (control), los grupos G2 y G3 (experimental). Luego, se realizó la determinación de hemoglobina y control de peso (antes del tratamiento). Posteriormente a este periodo, se proporcionó por cinco semanas 20 g/día de galletas fortificadas con quinua y sangre bovina; al G2 la Formulación 1 y al grupo 3, la Formulación 2, al finalizar se midió nuevamente los niveles de hemoglobina con registro de peso (después del tratamiento).

g. Determinación de hemoglobina-Método Cianometahemoglobina (POE) [2]

El ferricianuro de potasio oxida la hemoglobina a metahemoglobina, la cual reacciona con el cianuro de potasio para formar el pigmento estable de cianometahemoglobina (cianuro de hemoglobina), cuya intensidad es proporcional a la cantidad de hemoglobina contenida en la muestra.

Para la determinación de la hemoglobina, la extracción de sangre se realizó con lancetas marca Accu-Chek de 0,04 mm a la altura de la punta de la cola previa higiene con agua destilada y alcohol, descartándose la primera gota de sangre. Se midió en el espectrofotómetro a una longitud de 540 nm la absorbancia de las muestras, para calcular la concentración de la hemoglobina: al inicio del experimento (**basal**); luego de cinco semanas, periodo, de inducción a anemia (suministro de dieta deficitaria-**antes del tratamiento**) y al finalizar la quinta semana de tratamiento (suministro de galletas a base de quinua y sangre bovina-**después del tratamiento**).

h. Evaluación sensorial

-

Esta evaluación se efectuó con panelistas (jueces) semi-entrenados (40 jueces) estudiantes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial-UNSC, empleando sus cinco sentidos como herramienta de medición. Se empleó la metodología afectiva: pruebas de aceptación y la escala hedónica. De las evaluaciones efectuadas, la de mejor aceptación fue reajustada y sometida a evaluación mediante una escala hedónica siendo los atributos sensoriales a evaluar: dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad y gomosidad, en las formulaciones 1 y 2. Se pidió a los jueces que probaran las muestras y que luego respondieran en la cartilla la preferencia mediante una marca en los atributos definidos, basándose en una escala numérica de 9 puntos y con una escala reducida de 7 puntos [8], para ser analizadas mediante un ANVA.

Análisis estadístico

- Análisis estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión, con una base de datos en el software estadístico SPSS 23.
- Diseño completamente al azar (DAC)
- Prueba de Tukey.

CONCLUSIONES

De la experimentación efectuada, se concluye que las galletas antianémicas cumplen con los requerimientos nutricionales que exige la FAO y las Normas Sanitarias Peruanas (CERTIFICACION SAC) demostrando ser aptas para consumo humano, así mismo los tratamientos en ratas Holtzman permitieron reafirmar, que con niveles adecuados de *Chenopodium quinoa* Willd y hierro hemínico, se reduce la anemia.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del presente trabajo a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga a través del acceso a la ayuda financiera a la investigación.

REFERENCIAS

1. AOAC, 1995, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Vol. II, ed by Helrich, K., Association of Official Analytical Chemists, Inc., 16th edition, 1995, Washington, U.S.A.



2. POE: Procedimiento Operativo Estándar. Procedimiento de administración de sustancias y toma de muestras sanguíneas incluyendo rutas y volúmenes en roedores de laboratorio, **2010**. Disponible en: <http://ciencias.javeriana.edu.co/documents/3722984/3758101/PROCEDIMIENTO+DE+ADMINISTRACION+DE+SUSTANCIAS+Y+TOMA+DE+MUES.pdf/f26dd3ba-bb09-4c08-bdc8-6c813d0b7863> . Acceso dic. 2018.
3. FAO, **2014**, Micronutrientes. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s10.htm> . Acceso nov. 2018.
4. FAO, **2013**, Dietary protein quality evaluation in human Nutrition. Report of an FAO Expert Consultation. Roma. 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/quinoa-2013/es/>. <http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/> . Acceso 08-dic. 2018.
5. Bazile, D., Baudron, F. **2014**, Dinámica de expansión mundial del cultivo de la quinua respecto a su alta biodiversidad. Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013. FAO, Santiago de Chile, Chile - Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (CIRAD), Montpellier, Francia, 49-64.
6. Bazile, D. Fuentes, F. Mujica, A., *Historical perspectives and domestication, Part I, Chapter 2*. In: *Quinoa: botany, production and uses*, ed by Barghava, A., Srivastava, S., **2013**, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 16-35.
7. Díaz, S., Raquel, O. Hernández, M.S. **2012**, Propiedades reológicas y de textura de formulaciones para panificación con inclusión de quinua. *Vitae*, 19 (1, Supl.1), 270-272.
8. Benítez, B., Olivares, J., Ortega, M., Barboza, Y., Rangel, L., Romero, Z. **2017**. Formulación y evaluación fisicoquímica, microbiológica y sensorial de galletas enriquecidas con linaza como alimento funcional, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36 (4), 106-113.
9. Duarte, T.R., Carvalho, S.M., Sgarbieri, V.C. **2014**, Bovine Blood components: Fractionation, composition, and nutritive value, *J Agric Food Chem.* 47 (1), 231-236.
10. Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA, **2008**, Diario El Peruano, 2008. Normas Legales N°378827. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/247682-591-2008-minsa>. Acceso enero 2020.
11. RM N° 225-2016/MINSA. **2016**, RESOLUCIÓN MINISTERIAL Modificatoria de RM1020-2010. Norma Legales N°582568-Abril-2016. El Peruano, Lima-Perú.
12. Proyecto de actualización de la RM N° 615-2003 SA/DM. **2003**, Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Disponible en: www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Prov_RM615-2003.pdf. Acceso set. 2018.
13. Blanco, T. Alimentación y nutrición. Edit. Lettera Gráfica S.A.C, **2011**, Lima, Perú.
14. Garay, J.J. **2018**, Formulación y evaluación fisicoquímica y sensorial de galletas antianémicas enriquecidas con quinua (*Chenopodium quinoa*) y sangre bovina, Tesis Ing. Agroindustrial, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga -Ayacucho, Perú.
15. Gallego-Villa, D.Y., Russo, L., Khawla, K., Landi, M., Rastrelli, L. **2014**, Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) and *Chenopodium quinoa* (quinoa) sedes, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(7), 609-615.
16. Valcárcel-Yamani, B., Lannes, S.C. **2012**, Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and amaranth (*Amaranthus* Spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods, *Food and Public Health*. 2(6), 265-275.
17. Campos, M.S., Pallaes, D.I., Moratalla, A., López-Aliaga, I, Gómez-Ayala, A.E., Hartiti, S. **2016**, Bioavailability of Fe, Ca, P and Mg in Fe deficient rats treated with different sources of dietary iron, *Nutr Res.* 16(4), 683-696.
18. Plan Nacional de Reducción y Control de la Anemia en la Población Materno Infantil en el Perú: 2017-2021. MINSA **2018**. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4189.pdf> .
19. Baynes, J., Dominiczak, M. Bioquímica médica, Elsevier, 3ª ed. **2013**, Barcelona, España.
20. Munayco, C.V., Ulloa, M.E., Medina, J., Lozano, C.R., Tejada, V., Castro, C., Munarriz, J., De Bustos, C., Arias, L., **2013**, Evaluación del impacto de los multimicronutrientes en polvo sobre la anemia infantil en tres Regiones Andinas del Perú, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 30(2), 229-234.
21. INS (Instituto Nacional de Salud, PE), **2013**, Anemia afecta el aprendizaje de escolares. Disponible en: www.ins.gob.pe/portal/noticias/noticia/0/894/anemia-afecta-el-aprendizaje-de-escolaresadvierten-especialistas. Acceso nov. 2018.
22. Cardozo, C.A., Mrad, A., Martínez, C., Rodríguez, E., Lolas, F. El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos. Centro interdisciplinario de estudios en bioética (CIEB), Editorial Universitaria Universidad de Chile, **2013**, Santiago, Chile, pp. 228 .
23. Gonzales, E.F., Melgarejo, G.C., Chávez, L.K., Arellán, L.J., Carbajal, E., Cabrera, Y.A., Quiróz, G.M., García, I.N., Llanto, M., Choque, F.G. **2013**, Efecto terapéutico del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* spp. en anemia ferropénica inducida en ratas Holtzman macho. *Anales de la Facultad de Medicina*, 74 (1), 7-10.
24. García, L.M., Villar, F.P. **2014**, Efecto de una dieta a base de *Chenopodium quinoa* "quinua" enriquecida con retinol, sobre la concentración de hemoglobina sérica en *Rattus rattus* variedad albinus con anemia inducida. Tesis Lic. Nutrición: Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú, pp. 56.
25. García, Y., García, A., Angeles, S.C., Carmona, A., Cárdenas, R. **2013**, Evaluación de dieta purificada para la obtención de biomodelo de ratas anémicas, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(3), 312-320.
26. Scruzzi, G., Cebreiro, C., Pou, S., Rodríguez, R., **2014**, Salud escolar: una intervención educativa en nutrición desde un enfoque integral. *Cuadernos.info*, 35, 39-53. <https://dx.doi.org/10.7764/cdi.35.644>
27. Ayala R., M. **2015**, Yogurt fortificado con vitamina a, ácido fólico, hierro y zinc en animales experimentales con anemia inducida. Tesis maestría nutrición pública, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
28. OMS, **2016**, "Concentraciones de hemoglobina para evaluar la anemia y diagnosticar su gravedad". Ginebra. WHO/NMH/NHD/MNM/11.1. Disponible en: http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_es.pdf . Acceso oct. 2019.
29. MINSA (Ministerio de Salud, PE), **2012**, Resolución Ministerial 908-2012/MINSA. Alimentos saludables recomendados para su expendio en los quioscos escolares de las instituciones educativas. Perú.
30. OMS, **2014**, "Deficiencias de micronutrientes". Ginebra, suiza. Disponible en: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/> . Acceso set. 2019.