

**Universidad Central de Venezuela**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Química**



---

Evaluación nutricional de harina proteica de  
*Erythrina edulis*

---

Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela por la Br. Carla  
D'Amore para optar al título de  
Licenciado en Química

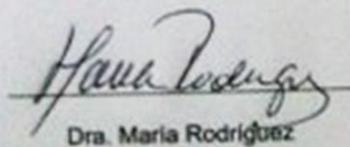
Caracas, 2016

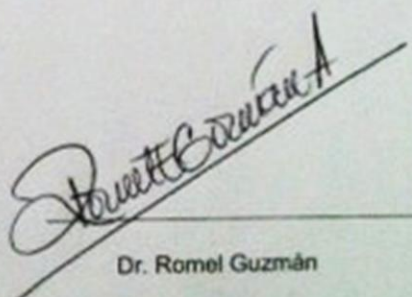
Yo, Profesora María Rodríguez, investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Romel Guzmán, investigador del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela. Certificamos que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

*"Evaluación nutricional de harina proteica de Erythrina edulis"*

Que presenta la Br. Carla D'Amore, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Laboratorio de Investigación y soporte analítico de Empresas Polar, bajo nuestra dirección, durante los años 2015 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 26 de mayo de 2016

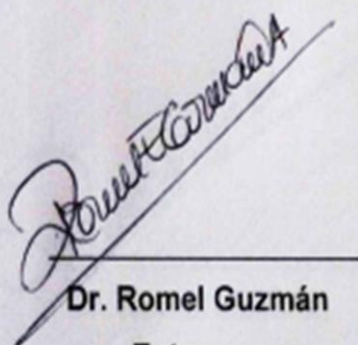
  
Dra. María Rodríguez

  
Dr. Romel Guzmán

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela como jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

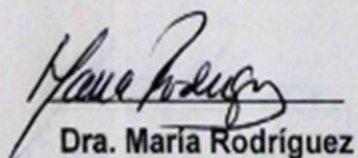
**“ Evaluación nutricional de harina proteica de *Erythrina edulis* ”**

Presentado por la Br. Carla D'Amore, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



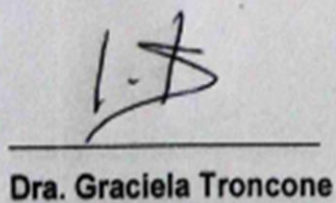
Dr. Romel Guzmán

Tutor



Dra. María Rodríguez

Tutor



Dra. Graciela Troncone

Jurado



Dr. Gustavo Cabrera

Jurado

## Resumen

Las características nutricionales de las harinas de dos morfotipos (rojo y amarillo) de la leguminosa *Erythrina edulis* fueron estudiadas y comparadas. Se realizó el análisis proximal de la harina de ambos morfotipos de esta leguminosa según los métodos correspondientes de la AOAC, también se determinó su contenido de almidón total mediante un método enzimático (Chiang y col. 1977). Posteriormente se elaboró una harina proteica a partir de una mezcla 50:50 de ambas harinas, empleando el método de extracción alcalina a pH 11 y precipitación en el punto isoeléctrico de la proteína a pH 4,5. La digestibilidad proteica de la harina resultante fue determinada por un método multienzimático (Hsu y col. 1977). El contenido de polifenoles en las tres harinas fue determinado por absorción UV-visible a 280nm. Por su parte el perfil de aminoácidos, también de las tres harinas, fue analizado por HPLC con derivatización precolumna empleando Fenilisotiocinato.

El contenido nutricional de ambos morfotipos resultó ser significativamente distinto. Los análisis arrojaron valores de 25,9% de proteína, 3,4% de cenizas, 1,5% de grasa cruda, 42,5% de almidón y 2,7mg de polifenoles totales por gramo de muestra para el *Erythrina edulis* rojo, mientras que para el morfotipo amarillo se encontró 18% de proteína, 2,6% de cenizas, 0,7% de grasa cruda, 45,7% de almidón y 1,97mg de polifenoles por gramo de muestra. En cuanto al perfil de aminoácidos, también se encontró un mayor contenido general de aminoácidos por gramo de proteína, y de muestra, en el morfotipo rojo comparado con el morfotipo amarillo, siendo ambos carentes de cistina y metionina, característico de las leguminosas.

La harina proteica mostró un contenido de proteína de 52%, con un contenido de aminoácidos por gramo de muestra bastante alto en comparación a las harinas de los morfotipos, que logra cubrir los requerimientos diarios tanto de niños como adultos que consuman 100g de este producto. La digestibilidad proteica fue de 70%, valor que se estima esté sujeto al contenido de polifenoles el cual fue de 5mg/gmuestra, tomando en cuenta las interacciones polifenol-proteína que inhiben la digestibilidad de la misma.

*Palabras clave: Erythrina edulis, chachafruto, proteínas, perfil de aminoácidos, digestibilidad proteica.*

## Agradecimientos

Tengo la creencia que todas las personas que pasan por nuestra vida lo hacen con el propósito de enseñarnos algo, sea bueno o malo, siempre hay algo que aprender de cada ser humano, es por ello que quisiera agradecerle a todas aquellas personas que pasaron por mi vida en el transcurso de mi carrera universitaria porque estoy segura de que me impulsaron para llegar hasta este punto.

Tengo un especial sentimiento de gratitud hacia mi madre, Carla María D'Amore y mi abuela, Mercedes Coello, por su esfuerzo, apoyo, paciencia y fé en que lograría ser Licenciada en Química. Gracias miles!

Gracias a Jorge Mariña, que ha compartido conmigo este último año en el cual he hecho mi tesis, por su incondicional apoyo, por alentarme cada día a seguir adelante y hacerme ver que no hay nada imposible.

Quiero darle las gracias a mi tutor de tesis y mi amigo, el profesor Romel Guzmán, por haberme acogido en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por darme la oportunidad de trabajar con él y enseñarme tantas cosas, reafirmando así mi vocación hacia la química de alimentos. Romel, gracias totales!

Gracias a mi tutora, la profesora María Rodríguez, por darme todo su apoyo en este proyecto y por ser un ejemplo a seguir como mujer y como profesional.

Mis agradecimientos a todos los profesores de la carrera que fueron una motivación y modelo a seguir.

Gracias al profesor Gustavo Cabrera, mi jurado de tesis, quien fue también mi profesor de química orgánica, por hacerme entender la orgánica y después de todo, hacer que me gustara.

No podría dejar de lado, por supuesto, al equipo de la Gerencia de Investigación y Soporte Analítico de Empresas Polar. Gracias a Graciela Troncone, jurado de tesis, por darme la oportunidad de trabajar en las instalaciones del Centro Tecnológico Polar, por todo su apoyo y confianza en mí. Gracias a Marcia Hernández y Lusmary Márquez por recibirme y entrenarme con mucha paciencia en el método de aminoácidos. Gracias a ellas, a Blanca Jaimes, y a Luis Canelón por todo su apoyo. Pero especialmente quiero dar mil gracias a Lisbeth Gil, quien se portó como mi madrina durante todo el tiempo que estuve en Empresas Polar, siempre pendiente de mí y siempre apoyándome en lo que necesitara. Gracias Lis

## Indice

1. Introducción .....	1
1. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1. <i>Erythrina edulis</i> (Chachafruto).....	3
2.1.1. Origen y distribución. ....	3
2.1.2. Ecología y Botánica. ....	3
2.1.3. Características nutricionales generales. ....	5
2.1.4. Usos y aplicaciones del <i>Erythrina edulis</i> .....	6
2.2. Leguminosas como fuente de proteína vegetal.....	7
2.2.1. Macronutrientes de las leguminosas.....	7
2.2.2. Antinutrientes presentes en las leguminosas.....	11
2.3. Proteína Vegetal como sustituto de la proteína animal.....	17
2.4. <i>Erythrina edulis</i> como fuente de proteína vegetal. ....	17
2.5 Aplicaciones Productos proteicos de origen vegetal.....	20
3. Objetivos.....	22
4. Metodología .....	23
4.1. Lugar de investigación .....	23
4.2. Materia prima .....	23
4.3. Análisis estadístico.....	25
4.4. Reactivos y equipos .....	25
4.4.1. Reactivos. ....	25
4.4.2. Equipos.....	26
4.5. Caracterización de los frutos de <i>Erythrina edulis</i> . ....	26
4.6. Obtención de harinas .....	27
4.7. Análisis proximal de las harinas.....	30
4.7.1. Humedad. ....	30
4.7.2. Cenizas.....	30
4.7.3. Grasa cruda. ....	30
4.7.4. Proteínas .....	31
4.8. Análisis físicos de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .....	31
4.9. Análisis fisicoquímicos .....	32

4.10. Obtención harina proteica a partir de la harina de <i>Erythrina edulis</i> (Chachafruto).	32
4.10.1. Extracción a diferentes pH alcalinos y la precipitación a pH 3.	33
4.10.2. Extracción a pH 11 y precipitación a diferentes pH.	33
4.11. Obtención de harina proteínica a macro escala.	41
4.12. Caracterización de la harina proteínica.	43
4.13. Cuantificación de polifenoles en las harinas de los morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y en la harina proteica.	43
4.14. Cuantificación de almidón en las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .	45
4.15. Cuantificación de aminoácidos de las harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y de la harina proteica.	46
4.15.1. Hidrólisis de los enlaces peptídicos de la proteína.	46
4.15.2. Curva de calibración.	47
4.15.3. Derivatización de los aminoácidos.	49
4.15.4. Análisis de las muestras en el equipo de HPLC.	49
4.16. Digestibilidad in Vitro de la harina proteica.	51
5. Resultados y discusión	53
5.1. Caracterización física de los frutos de <i>Erythrina edulis</i> .	53
5.2. Elaboración de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .	54
5.3. Caracterización de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .	58
5.3.1. Análisis proximal de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .	58
5.3.2. Análisis físicos.	59
5.3.3. Análisis fisicoquímicos.	61
5.4. Elaboración de harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> .	62
5.5. Caracterización de la harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> .	65
5.5.1. Análisis proximal de la harina proteica.	65
5.5.2. Análisis físicos de la harina proteica.	68
5.6. Determinación de la concentración de polifenoles en las harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y en la harina proteica.	69
5.7. Perfil de Aminoácidos de las harinas de los morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y de la harina proteica.	71
5.8. Digestibilidad proteica in vitro de harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> .	73
6. Conclusiones	77

7. Recomendaciones .....	78
8. Referencias bibliográficas.....	79
9. Anexos.....	84



## Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido de macronutrientes en la semilla del <i>Erythrina edulis</i> .....	5
Tabla 2. Distribución del contenido de carbohidratos en diferentes leguminosas. ....	10
Tabla 3. Contenido lipídico de distintas leguminosas. ....	11
Tabla 4. Influencia del tratamiento sobre el contenido de polifenoles en las leguminosas. ....	14
Tabla 5. Gradiente de fases móviles del método "Aminoácidos 2015" .....	50
Tabla 6. Caracterización física de los frutos de los morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> : ...	53
Tabla 7. Comparación de dimensiones y peso de los granos de ambos morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> . ....	54
Tabla 8. Cálculo del rendimiento del proceso de deshidratación .....	57
Tabla 9. Granulometría de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> . ....	57
Tabla 10. Rendimiento global del proceso de elaboración de harinas. ....	58
Tabla 11. Valor nutricional de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> . ....	58
Tabla 12. Parámetros colorimétricos de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .....	59
Tabla 13. Actividad de agua de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> .....	61
Tabla 14. pH y acidez titulable de harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> . ....	61
Tabla 15. Contenido de humedad y proteína en la mezcla 50:50 de harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> .....	62
Tabla 16. Macronutrientes presentes en la harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> .....	65
Tabla 17. Comparación de métodos Lowry y Kjeldahl en la cuantificación de la proteína de extracto proteico de <i>Erythrina edulis</i> . ....	66
Tabla 18. Parámetros colorimétricos de la harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> . ....	68
Tabla 19. Contenido de polifenoles totales en las harinas de <i>Erythrina edulis</i> y en la harina proteica: .....	70
Tabla 20. Requerimientos diarios de proteínas y aminoácidos reportados por OMS/FAO/ONU (2013) .....	74

## Indice de figuras

Figura 1. Frutos y flores del árbol de <i>Erythrina edulis</i> .....	4
Figura 2. Vaina y granos de morfotipos rojo y amarillo de <i>Erythrina edulis</i> .....	4
Figura 3. Semilla de morfotipo amarillo de <i>Erythrina edulis</i> .....	5
Figura 4.Estructura secundaria del complejo vicilina-legumina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (caraota).....	8
Figura 5.Estructura del ácido fítico.	
Figura 6.Interacciones del ácido fítico con proteínas y minerales .....	12
Figura 7.Interacción proteína-polifenoles .....	13
Figura 8.Enlazamiento de lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> a azúcares y metales .....	15
Figura 9.Núcleo de genina triterpénica derivada del ácido oleanólico (R=H) .....	15
Figura 10.Ubicación de la Azulita, Edo. Mérida.....	23
Figura 11. Frutos y flores de <i>Erythrina edulis</i> . La Azulita, Edo. Mérida.....	24
Figura 12. Árbol de <i>Erythrina edulis</i> ubicado en La Azulita. Edo. Mérida.....	24
Figura 13.Esquema de obtención de harina a partir de los granos de <i>Erythrina edulis</i> . .....	28
Figura 14. Esquema ilustrado de la elaboración de la harina de <i>Erythrina edulis</i> .....	29
Figura 15.Sólido de colores del sistema CIE L*b*a* .....	32
Figura 16.Liofilizador Labconco con muestras acopladas.....	33
Figura 17.Color desarrollado durante la reacción del método de Lowry. ....	35
Figura 18.Esquema ilustrado de las reacciones que ocurren en el método de Lowry. .....	35
Figura 19.Correlación del método de Lowry con el método de Kjeldahl.....	36
Figura 20.Comparación de curvas de calibración para los métodos de Lowry y Bradford empleando proteína animal (BSA) y proteína vegetal (Con-A).....	36
Figura 21.Esquema general de estandarización de extracción alcalina de las proteínas de <i>Erythrina edulis</i> .....	39
Figura 22.Esquema de estandarización de punto isoeléctrico de las proteínas de <i>Erythrina edulis</i> .....	40
Figura 23.Esquema ilustrativo para la elaboración de harina proteínica a escala macro. ....	42

Figura 24. Esquema de obtención de harina proteínica a macro escala a partir de harina de <i>Erythrina edulis</i> .....	44
Figura 25. Reacción de la glucosa con la o-toluidina en medio ácido .....	45
Figura 26. Proceso de secado y resecado en desecador acoplado al vacío.....	47
Figura 27. Reacción de derivatización de aminoácidos empleando Fenilisotiocianato en presencia de trietilamina.....	49
Figura 28. Equipo HPLC Waters Alliance modelo 2695. ....	51
Figura 29. Granos de <i>Erythrina edulis</i> rojo.....	54
Figura 30. Curva de secado de <i>Erythrina edulis</i> rojo.....	55
Figura 31. Curva de secado de <i>Erythrina edulis</i> amarillo. ....	55
Figura 32. Plano colorimétrico de las harinas de <i>Erythrina edulis</i> . ....	60
Figura 33. a. Harina de <i>Erythrina edulis</i> rojo; b. Harina de <i>Erythrina edulis</i> amarillo. ....	60
Figura 34. Estandarización del pH óptimo de extracción de las proteínas de <i>Erythrina edulis</i> .....	63
Figura 35. Estandarización del punto isoeléctrico de la proteína de <i>Erythrina edulis</i> . .....	63
Figura 36. Comparación de proteína extraída a 1 hora y 24 horas. ....	64
Figura 37. Harina proteica de <i>Erythrina edulis</i> . ....	68
Figura 38. Plano colorimétrico de la harina proteica. ....	69
Figura 39. Comparación del contenido de aminoácidos por gramo de proteína de las harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y harina proteica.....	71
Figura 40. Comparación del contenido de aminoácidos por gramo de muestra total de las harinas de morfotipos de <i>Erythrina edulis</i> y harina proteica. ....	72

## 1. Introducción

*Erythrina edulis*, también llamado Chachafruto, es una leguminosa de la familia *Fabaceae* originaria de la región subandina de Latinoamérica. En Venezuela se encuentra ampliamente distribuida en el Edo. Mérida, ya que esta región cubre los requerimientos de altitud y humedad de esta leguminosa para poder desarrollarse [1]. Esta leguminosa se caracteriza nutricionalmente por su alto contenido de proteínas (18-22%) y carbohidratos (70-80%) y por ende un alto valor calórico, lo que la hace ventajosa para comunidades que tengan acceso limitado a las fuentes de proteína animal y que además requieran ingerir un alto contenido calórico diario. Países como Colombia, Perú y Bolivia han realizado extensos estudios de esta leguminosa, asociándola con la seguridad alimentaria y formando parte de la alimentación común de las comunidades de estos países. En Venezuela, los estudios sobre *Erythrina edulis* apenas comienzan; se ha fomentado la utilización de la harina de sus granos como complemento de otras harinas para así desarrollar productos con mayor valor nutricional, como es el caso de la combinación de harina de chachafruto con harina de maíz para la elaboración de arepa para consumo humano [2], y por otra parte se ha planteado emplear harina de chachafruto como alimento para algunas especies animales, como por ejemplo la trucha arcoíris que se encuentra en el Edo. Mérida [3].

El gran contenido de proteínas y carbohidratos del *Erythrina edulis* puede emplearse como materia prima para elaborar otros productos a partir de sus macronutrientes, extrayendo su almidón y sus proteínas por separado, para así innovar productos funcionales. Esto incrementaría el valor agregado del *Erythrina edulis* tal como se ha hecho con otras leguminosas como es el caso de la soya, la cual, en este caso, por ser una oleaginosa alta en proteína se ha aprovechado para hacer aislados y concentrados proteicos y además en la producción de aceite de soya.

La extracción alcalina es comúnmente empleada para separar las proteínas del resto de la matriz alimenticia ya que permite la solubilización éstas para su posterior precipitación mediante la disminución del pH hasta su punto isoeléctrico seguida de su neutralización. De esta manera se pueden obtener productos proteínicos que

pueden ser empleados como complemento para enriquecer el valor nutricional de alimentos con bajo contenido de proteínas. Su correcta combinación con otras fuentes proteicas vegetales puede lograr un balance completo de aminoácidos requeridos diariamente. Además, lograr una extracción eficiente de la proteína vegetal proveniente de leguminosas, en este caso del *Erythrina edulis*, podría favorecer el aumento de la digestibilidad de la misma ya que los factores antinutricionales tales como saponinas, inhibidores de tripsina, lectinas y polifenoles, no deberían permanecer luego de la extracción o al menos se verían reducidos al mínimo.

## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1. *Erythrina edulis* (Chachafruto)

#### 2.1.1. Origen y distribución.

*Erythrina edulis*, conocida comúnmente como: Triana, chachafruto, balú, basul, pallar, sachaporoto o frijol de árbol, es un árbol leguminoso de la familia *Fabaceae*, originario de la zona subandina (Suramérica) y se encuentra usualmente como sombra de los cafetales.

*Erythrina edulis* es una especie que se encuentra de forma natural y cultivada en la cordillera de los Andes. Se reporta en Mérida, Venezuela; en Panamá; en Colombia es sus tres cordilleras (y en la Sierra Nevada de Santa Marta); Ecuador; Perú y Bolivia, lugares en donde recibe diferentes nombres.

En Colombia, los niveles de producción de este árbol se ubican en 36 toneladas de frijol por hectárea, para ejemplares de 6 años de sembrados con una densidad de 400 árboles por hectárea. Este árbol puede usarse como acompañante para el cultivo del café. Se usa actualmente en Colombia para "bancos de proteínas" pues produce 80 toneladas de forraje proteico por hectárea (23% de proteínas).<sup>[4]</sup>

#### 2.1.2. Ecología y Botánica.

*Erythrina edulis* es un árbol que crece a libre exposición y acepta sombra en los primeros estadios de su desarrollo. Prospera entre los 1.200 y los 2.600 m sobre el nivel del mar, una temperatura óptima entre 15 y 20 °C y requiere entre 1.500 a 2.000 mm de lluvia al año.

Es un árbol con ramas espinosas, pubescentes, que alcanza hasta 14 m de altura; 7 m de diámetro de follaje y 40 cm de diámetro del tronco en árboles de más de 20 años. Hojas alternas pinnadas con tres folíolos, el terminal más grande que los laterales, caducas en las ramas en floración. Inflorescencias con 2 ó 3 racimos terminales o axilares largamente pedunculados de 30-45 cm de longitud, soportando muchas flores rojo anaranjadas (Figura 1). Vainas verde oscuras sub-leñosas de 8 a 30 cm de largo, con constricciones poco profundas. <sup>[5]</sup>

Su semilla es arriñonada con dos cotiledones, blancos verdosos de 3,5 a 7cm de longitud por 2 a 3 cm de diámetro. Testa pardo-rojiza o algunos morfo tipos amarillos o negros (Figura 2).<sup>[4]</sup>



Figura 1. Frutos y flores del árbol de *Erythrina edulis*.<sup>[6]</sup>



Figura 2. Vaina y granos de morfotipos rojo y amarillo de *Erythrina edulis*.<sup>[7]</sup>



Figura 3. Semilla de morfotipo amarillo de *Erythrina edulis*.<sup>[7]</sup>

### 2.1.3. Características nutricionales generales.

*Erythrina edulis* es un alimento con alto contenido nutricional, siendo rico en proteínas y carbohidratos, bajo en grasas y con alto contenido de fósforo, calcio y vitamina C según reportan los resultados mostrados por Barrera (1994) (Tabla 1):

Tabla 1. Contenido de macronutrientes en la semilla del *Erythrina edulis*.<sup>[4]</sup>

Nutriente	Contenido en base fresca (por 100g)	Contenido en base seca (por 100g)
Agua	80,50	-
Proteína	4,00	20,50
Grasa	0,10	0,51
Carbohidratos	13,30	68,20
Fibra	1,00	5,13
Cenizas	1	5,64

Como se puede apreciar en la tabla 1, el contenido de proteína se encuentra alrededor de 20 % en base seca, lo que concuerda bastante bien con estudios realizados por Pérez y col., quienes aseguran que el porcentaje proteico de la *Erythrina edulis* varia de 18 a 21%. <sup>[8]</sup>



#### **2.1.4. Usos y aplicaciones del *Erythrina edulis*.**

*Erythrina edulis* (Chachafruto) es una de las más versátiles especies de las *Erythrina*. Es una leguminosa multipropósito con un amplio espectro de usos, que van desde la alimentación humana (la semilla) y animal (el forraje) hasta la recuperación de suelos degradados (dada su capacidad de fijar nitrógeno). Además de los anteriores usos, se le han identificado propiedades medicinales por ejemplo, como diurético. El chachafruto es un árbol multipropósito, cuya principal función está relacionada con la seguridad alimentaria. [9]

El sabor, color, textura y manejo de la cocción del *Erythrina edulis* lo hace comparable al maíz y la papa y los puede sustituir por completo o complementar, por lo cual el campesino los usa y acoge con facilidad. Los granos (cocidos) y luego molidos pueden usarse como el maíz o combinado con este y otras harinas en la elaboración de tortas, purés, colados y varios platos con sal o dulce. La semilla sin tegumentos se usa para comer cocida con sal, en conservas, encurtidas o fritas. La harina obtenida de los cotiledones cortados en hojas delgadas secadas al sol o a 40°C y tratadas con antioxidantes, puede ser utilizada en la agroindustria para elaborar panes, tortas croquetas, fuentes de sólidos para yogurt y aglutinante para helados. [4]

Estudios realizados por la Universidad de Antioquia en Colombia aseguran que las harinas simples provenientes de leguminosas como el chachafruto y la soya contienen más proteínas que la harina de trigo, convirtiéndose en potenciales sustitutos parciales de la carne (extensor cárnico) de origen vegetal.

## **2.2. Leguminosas como fuente de proteína vegetal.**

Cuando se habla de leguminosas, se refiere a los granos maduros y secos contenidos dentro de la vaina que constituye el fruto llamado legumbre. Dentro de ellas podemos diferenciar dos grupos claramente definidos dependiendo de su contenido lipídico: así aquellas que tienen alto contenido lipídico se le denominan leguminosas oleaginosas, como es el caso de la soya (*Glycine max*) la cual contiene alrededor de 20% de grasa, mientras que aquellas cuyo contenido en grasa es muy inferior la cual conocemos como luminosas grano, como es el caso de la caraota (*Phaseolus vulgaris*).<sup>[10]</sup>

Los granos de leguminosas ocupan un lugar importante en la nutrición humana, especialmente en el patrón dietético de los grupos de personas de con bajo ingreso en los países en desarrollo. Las leguminosas, consideradas la carne del pobre, son generalmente buenas fuentes de carbohidratos de liberación lenta y son ricas en proteínas. Estas son normalmente consumidas después de someterlas a algún tipo de proceso de cocción, lo cual no solo mejorada la palatabilidad de las comidas sino que también incrementa la biodisponibilidad de nutrientes ya que se inactivan los inhibidores de enzimas y las hemagluteninas.<sup>[11]</sup>

### **2.2.1. Macronutrientes de las leguminosas.**

#### **2.2.1.1. Proteínas.**

Las leguminosas son fuente relativamente rica de proteína ya que contienen entre 20-25% de proteína, con algunas excepciones como la soya que puede llegar a tener hasta 40% de proteína.

Las proteínas de las leguminosas están compuestas por miles de proteínas específicas. Alrededor de 70 al 80% de la proteína cruda de los granos de leguminosas, son proteínas de almacenamiento. La cantidad restante son enzimas, inhibidores de enzimas, hormonas, proteínas transportadoras, estructurales y de reconocimiento.

Las fracciones principales de las proteínas de las leguminosas (según su clasificación por solubilidad) son las albúminas (solubles en agua) y las glubulinas (solubles en soluciones salinas), estas últimas pueden ser separadas en dos fracciones mayores: Vicilina y Legumina (figura 4)

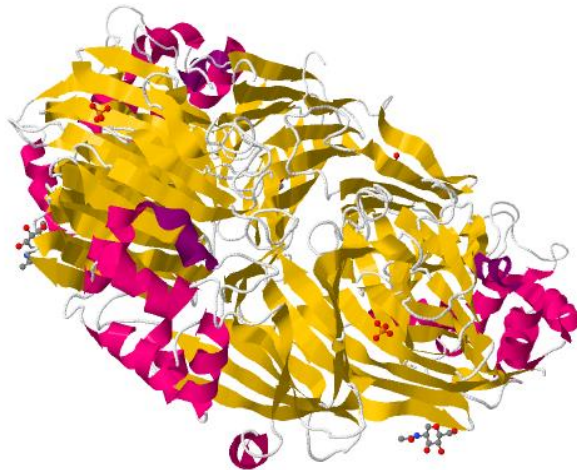


Figura 4. Estructura secundaria del complejo vicilina-legumina de *Phaseolus vulgaris* (caraota). [12]

La proporción relativa entre la vicilina y la legumina varía con el genotipo de la planta, pero en general la vicilina es la mayor fracción proteica contenida en todas las leguminosas excepto en *Vicia faba* (haba).

Las albuminas de las leguminosas son generalmente altas en cisteína y metionina y por su parte las leguminas generalmente también tienen cantidades mayores de los aminoácidos azufrados limitantes comparados con la fracción de vicilina. Se ha reportado una relación albumina:globulina de 1:3, 1:6.3, 1:>3 y 1:4 para la lenteja, frijol negro, frijól francés y garbanzo, respectivamente. Variaciones similares se reportaron en la relación legumina: vicilina: 10.5:1, 1:6-9, 1:9, 1-3:1 y 4-6:1 para la lenteja, frijól pico negro, guisante y garbanzo, respectivamente. Además, el contenido de aminoácidos azufrados varía para las albuminas y globulinas para diferentes leguminosas. [13]

En cuanto al balance general de aminoácidos contenidos en las proteínas, las leguminosas son ricas en lisina pero pobres en aminoácidos azufrados como la metionina y la cistina, lo cual hace que se complementen muy bien con los cereales, los cuales son carentes de lisina pero ricos en metionina y cistina. [14]

#### 2.2.1.2. Carbohidratos.

De acuerdo a su rol en las plantas, los carbohidratos pueden ser separados en tres grupos, los mono- y disacáridos son una fuente de energía para el crecimiento de

éstas, los oligosacáridos y el almidón son carbohidratos de almacenamiento mientras que los polisacáridos no celulosos, pectinas, hemicelulosa y celulosa comprenden los componentes estructurales de la pared celular. Desde el punto de vista de nutrición humana, los carbohidratos pueden clasificarse en dos grupos: carbohidratos disponibles, los cuales son digeridos enzimáticamente en el intestino delgado, y los carbohidratos no disponibles los cuales son fermentados por la microflora del intestino grueso. Los carbohidratos disponibles comprenden los mono- y disacáridos y el almidón mientras que los no disponibles engloban los oligosacáridos y componentes estructurales.

Estudios realizados por Ermetice y col. reportaron que el contenido de carbohidratos en 4 tipos de leguminosas crudas como guisante, frijol negro, garbanzo y lenteja, oscila en un rango de 52 a 56 %, el mayor valor corresponde a la lenteja con 56,4%, seguidos del frijol negro con 54,3% y el garbanzo con 54,0%, siendo el menor valor el del guisante con 52,5%. [15]

Por su parte, la bibliografía ha recopilado el contenido de varios carbohidratos de importancia en diferentes leguminosas, como lo son los  $\alpha$ -galactósidos (oligosacáridos responsables de la flatulencia), almidón, almidón resistente y fibra dietética (tabla 2):

Tabla 2. Distribución del contenido de carbohidratos en diferentes leguminosas. [16]

Leguminosa	Contenido promedio (g/100g)*			
	$\alpha$ -galactósidos	Almidón	Almidón resistente	Fibra dietética
<b>Frijoles</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	3,68	54,93	8,24	19,33
<b>Guisantes</b> ( <i>Pisum sativum</i> )	4,94	47,50	7,23	18,79
<b>Lentejas</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	2,84	46,18	6,93	21,4
<b>Garbanzos</b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	4,70	52,6	7,89	24,55

\*Los errores de estos valores no han sido reportados en la bibliografía.

Como se puede observar en la tabla anterior (Tabla 2), el carbohidrato predominante en las especies de leguminosas citadas, es el almidón, seguido de la fibra dietética.

Tharanathan y Mahadevamma, aseguran que el almidón es el mayor constituyente biopolimérico de las plantas, granos, semillas y tubérculos. Este se presenta en gránulos característicos de varias formas y tamaños. El almidón provee la mayor fuente de energía física en la dieta humana, y según su clasificación, como se dijo anteriormente, es un carbohidrato disponible.<sup>[11]</sup>

### 2.2.1.3. Lípidos.

El contenido total de lípidos en todas las leguminosas, exceptuando el maní, la soya y el frijol alado, varía de 1,00 a 7,20% dependiendo de la especie, variedad, origen, localización, clima, estación y condiciones ambientales, y tipo de suelo en el que

crecen, pero en todo caso, con algunas excepciones, la mayoría de las leguminosas poseen un contenido de lípidos bajo, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido lipídico de distintas leguminosas. [17]

<b>Leguminosa</b>	<b>Contenido lipídico (g/100g)*</b>
<b>Maní</b> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	49,7
<b>Soya</b> ( <i>Glycine max L.</i> )	21,3
<b>Frijól alado</b> ( <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> )	15,0 – 16,8
<b>Garbanzo</b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	4,99
<b>Frijol blanco</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	3,00
<b>Guisante</b> ( <i>Pisum sativum</i> )	2,40
<b>Quinchoncho</b> ( <i>Cajanus cajan</i> )	2,19
<b>Frijól pico negro</b> ( <i>Vigna unguiculata</i> )	2,05
<b>Frijol rojo</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	1,90
<b>Lenteja</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	1,17
<b>Arveja</b> ( <i>Lathyrus sativus</i> )	1,00

\*Los errores de estos valores no han sido reportados en la bibliografía

Los lípidos contenidos en las leguminosas comprenden: lípidos neutrales (predominante en la mayoría de las leguminosas), fosfolípidos y glicolípidos los cuales se encuentran presentes en cantidades apreciables. Su distribución en la semilla también cambia con la especie y la variedad. Los ácidos grasos principales de estos tres grupos de lípidos en diferentes tipos de leguminosas son los ácidos palmítico, oleico, linoleico y linolénico. [14]

Sin embargo, como consecuencia del bajo contenido general de lípidos en los granos de leguminosas, el interés en la composición de sus aceites no ha sido tan profundo como para otras familias de plantas que tienen granos ricos en aceites, como la soya y el maní. [18]

### **2.2.2. Antinutrientes presentes en las leguminosas.**

Los granos de leguminosas contienen una amplia variedad de componentes que poseen efectos adversos en la actividad de las enzimas, digestibilidad, nutrición y

salud, por lo que son llamados antinutrientes. Algunos de estos compuestos son utilizados por la planta como mecanismos de defensa como es el caso del ácido fítico y los polifenoles. Otros compuestos comprenden inhibidores de enzimas, lectinas y saponinas.

El ácido fítico (figura 5) (myoinositol hexafosfato) es la principal fuente de fósforo en los granos secos. La interacción del fitato con las proteínas, vitaminas y varios minerales (figura 6) es considerada uno de los factores limitantes del valor nutricional de los granos. Numerosos estudios sugieren que el fitato reduce la disponibilidad biológica del cobre y el manganeso. <sup>[19]</sup>

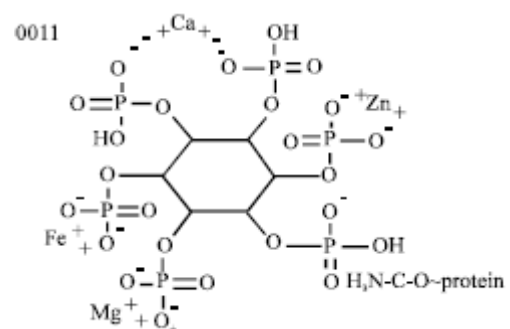
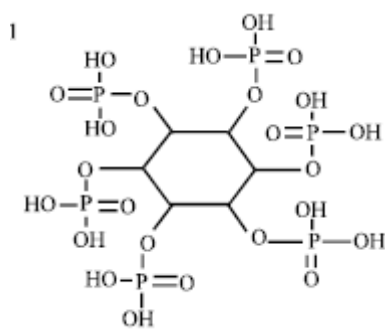


Figura 5. Estructura del ácido fítico. <sup>[20]</sup>

Figura 6. Interacciones del ácido fítico con minerales y residuos de proteína. <sup>[20]</sup>

Por otra parte, es conocido que en los alimentos de origen vegetal hay más de 2000 compuestos polifenólicos, entre ellos los ácidos fenólicos, los antocianos, las flavonas, los taninos, y los derivados del ácido cinámico, como el ácido caféico y el ácido clorogénico. En presencia de oxígeno estos compuestos polifenólicos se oxidan en medio alcalino o próximo a la neutralidad, por acción de la polifenoloxidasas, dando como producto ortoquinonas, que luego se polimerizan a polímeros pardos (pardeamiento enzimático), o bien reaccionan con grupos amino terminales, aminoácidos libres como lisina y cisteína, o con los mismos residuos aminoácidos de proteína (Figura 7). Los residuos de metionina se pueden oxidar a metionina sulfóxido. Esto se produce en la purificación tecnológica de proteínas a partir de hojas o de ciertos granos ricos en polifenoles, como el girasol, obteniendo productos pardos. Las consecuencias nutricionales del contacto de las proteínas con polifenoles oxidados se deben fundamentalmente a la disminución de la disponibilidad de lisina, y en menor

grado de otros aminoácidos como la metionina. Los complejos lisina-polifenol no son absorbidos a nivel intestinal por las ratas experimentales. [21]

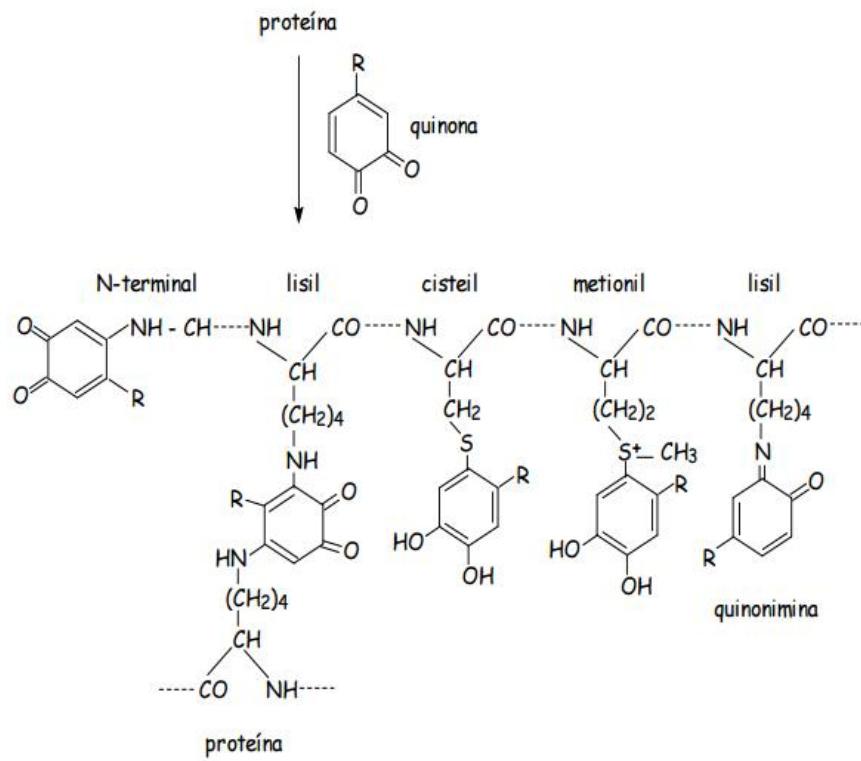


Figura 7. Interacción proteína-polifenoles oxidados. [21]

Martín-Cabrejas y col. estudiaron el impacto de los tratamientos térmicos sobre los antinutrientes de algunas leguminosas. En el caso de los polifenoles totales obtuvieron los siguientes resultados (tabla 4) [22]:



Tabla 4. Influencia del tratamiento sobre el contenido de polifenoles en las leguminosas. [22]

Tratamiento	Cruda	Remojado	Remojado + cocción	Remojado +Cocción+Des hidratación
Leguminosa	Polifenoles totales (mg/g)			
<b>Garbazo Castellano</b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	3,04 ± 0,23	3,05 ± 0,14	1,74 ± 0,06	1,69 ± 0,01
<b>Garbazo Sinaloa</b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	2,79 ± 0,11	2,56 ± 0,15	1,83 ± 0,18	1,84 ± 0,03
<b>Lenteja</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	5,58 ± 0,06	1,35 ± 0,13	2,79 ± 0,05	2,19 ± 0,02
<b>Frijol blanco</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	2,08 ± 0,01	2,11 ± 0,01	1,64 ± 0,04	2,13 ± 0,03
<b>Frijol manchado</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L)	5,38 ± 0,06	4,71 ± 0,12	2,84 ± 0,18	2,95 ± 0,03

Los inhibidores de enzimas digestivas, como la tripsina, quimotripsina y  $\alpha$ -amilasa, son constituyentes comunes de leguminosas y podrían reducir la digestibilidad tanto de la proteína como del almidón y hasta causar hipertrofia pancreática [23].

Por su parte, las lectinas, son un tipo de proteínas que enlazan azúcares específicas y reversiblemente además de aglutinar células. En plantas leguminosas, las lectinas han sido detectadas en más de 600 especies y variedades. La fuente principal de lectinas leguminosas son los granos maduros, de las cuales constituyen como mucho el 10% de la proteína total. [24]

Las lectinas son glicoproteínas que tienen la capacidad de enlazarse a superficies celulares mediante oligosacáridos específicos o glicopeptidos (Figura 8) y tienen una afinidad enlazante relativamente alta con el epitelio del intestino delgado. Además, las lectinas pueden producir cambios estructurales en el epitelio intestinal y resistir a la proteólisis. [25]

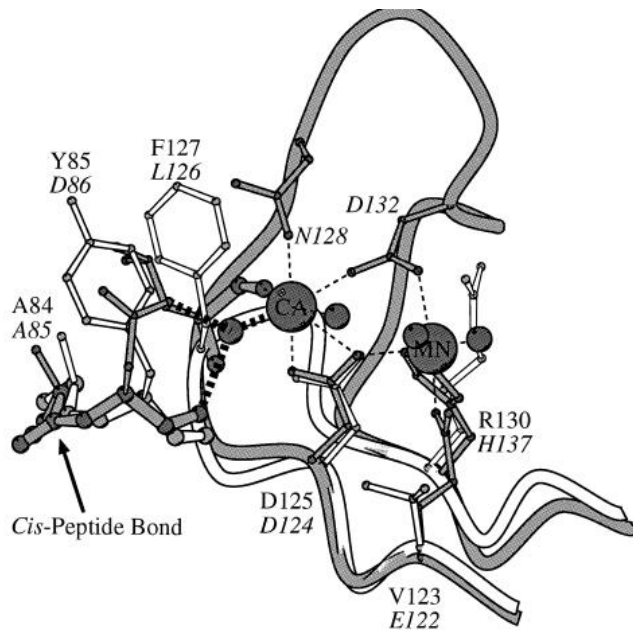


Figura 8. Enlazamiento de lectina de *Phaseolus vulgaris* a azúcares y metales.<sup>[25]</sup>

Por último, las saponinas son glicósidos, es decir, están compuestas por una porción de carbohidrato y otra no-carbohidrato llamada aglicona (sapogenina) (Figura 9). Las saponinas poseen una superficie activa o propiedades detergentes debido a que su porción de carbohidrato es soluble en agua, mientras que las sapogeninas son solubles en aceites. Esta propiedad detergente permite la formación considerable de espuma en soluciones acuosas de saponinas.

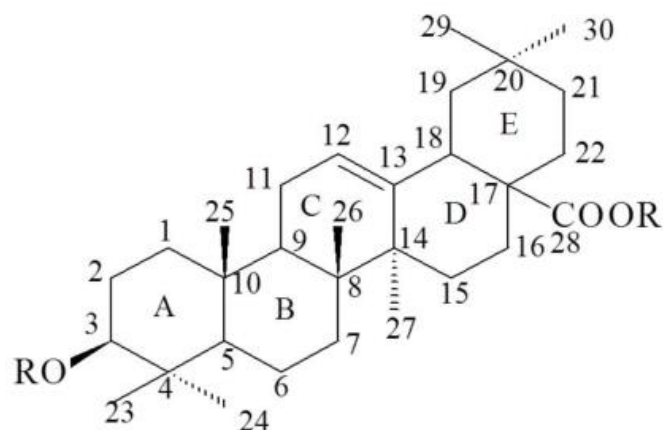


Figura 9. Núcleo de genina triterpénica derivada del ácido oleanólico (R=H).<sup>[26]</sup>

Se ha observado que la ingestión de saponinas puede influenciar el rendimiento y el metabolismo animal de varias maneras. Entre las respuestas que han sido atribuidas a las saponinas están:

- Hemolisis de los eritrocitos
- Efectos en los niveles de colesterol en hígado y sangre (descenso).
- Efectos en el crecimiento (depresión del crecimiento).
- Inhibición de la actividad del musculo liso.
- Hinchazón en rumiantes.

Muchos de los factores anti nutricionales de las leguminosas pueden ser eliminados o inactivados en gran proporción mediante procesamientos y tratamientos térmicos adecuados. [23]

### **2.3. Proteína vegetal como sustituto de la proteína animal.**

Desde hace aproximadamente dos millones de años, el humano ha aumentado el consumo de carne. Durante este tiempo, la selección natural ha permitido la adaptación de nuestra fisiología a una dieta rica en proteínas, baja en grasas totales, saturadas y relativamente rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Sin embargo es contradictorio pensar que si la evolución ha permitido la selección de seres humanos preparados para el consumo de alto contenido de alimentos de origen animal, la evidencia muestre que la morbi-mortalidad total, principalmente por cardiopatía coronaria, sea significativamente menor en vegetarianos comparado con los no vegetarianos. El aumento de la mortalidad cardiovascular en el último tiempo está fuertemente asociado a cambios en los hábitos de alimentación. La dieta occidental, caracterizada por una alta ingesta de alimentos de origen animal, presenta mayor riesgo de diabetes tipo 2 (DM 2), hipertensión arterial (HTA), aumento de marcadores de disfunción endotelial y factores protrombóticos. La evidencia apoya que la disminución en el consumo de carnes rojas, grasas saturadas y grasas trans, así como el aumento en el consumo de cereales integrales, frutas, vegetales y pescado, disminuye la morbi-mortalidad global y cardiovascular. [27]

Así mismo, Tharanathan y Mahadevamma<sup>[11]</sup> señalan varios reportes asegurando que la inclusión de legumbres en la dieta diaria conlleva a muchos efectos fisiológicos positivos en el control y prevención de varias enfermedades metabólicas como a diabetes mellitus, enfermedad coronaria del corazón y cáncer de colon. Las leguminosas pertenecen a un grupo de alimentos que provoca la disminución de la respuesta de glucosa en sangre, ésto debido a su alto contenido de carbohidratos de liberación lenta, como lo son el almidón resistente y la fibra dietética.

### **2.4. *Erythrina edulis* como fuente de proteína vegetal.**

Cada vez son más los avances que buscan incrementar la utilización extensiva de leguminosas no convencionales mediante el desarrollo de productos que alarguen la vida útil de las leguminosas mientras conservan las propiedades nutricionales, especialmente, su contenido proteico. Entre los productos desarrollados se encuentran harinas, concentrados y aislados proteicos.

En las secciones anteriores se habló del alto contenido de proteínas que posee el *Erythrina edulis* (chachafruto). Arango y col.<sup>[9]</sup> determinaron el contenido de proteína en la harina de *Erythrina edulis*, encontrando un valor de 18,1%; a partir de allí emplearon distintos solventes para extraer las fracciones proteicas (globulinas, albúminas, glutelinas y prolaminas) (Tabla 5), del *Erythrina edulis* obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Fracciones proteicas de *Erythrina edulis*. <sup>[9]</sup>

<b>Solvente</b>	<b>Tipo de proteína</b>	<b>Proteína extraída (%)</b>
<b>NaOH</b>	Glutelinas	13,29 ± 0,36
<b>NaCl</b>	Globulinas	8,83 ± 0,45
<b>Agua</b>	Albúminas	11,52 ± 0,22
<b>Etanol</b>	Prolaminas	0,01 ± 0,03

Como se puede apreciar en la Tabla 5, según este trabajo, la fracción predominante en las proteínas de *Erythrina edulis* son las glutelinas, seguidas de las albúminas, globulinas y las prolaminas presentes son prácticamente despreciables. El hecho de que la mayor fracción proteica haya resultado ser las glutelinas en este trabajo, se contradice con todos los resultados reportados por la bibliografía en los cuales se reporta que las globulinas son la mayor fracción proteica de las leguminosas.

Por su parte el perfil de aminoácidos de *Erythrina edulis* fue evaluado y comparado con los de huevo, el frijol y las arvejas (Tabla 6):

Tabla 6. Comparación del perfil de aminoácidos de *Erythrina edulis* con otros alimentos. (mg A.A/g muestra) <sup>[4]</sup>

Producto	Lis	His	Tre	Val	Met	Ile	Leu	Tir	Phe	Trp
Huevo	6,97	2,43	5,12	6,85	3,36	6,29	8,50	4,16	5,33	1,49
Chachafruto E.edulis	6,91	5,84	5,84	5,57	1,31	5,20	8,24	5,50	4,99	0,66
Frijol P. vulgaris	6,24	-	3,87	4,22	1,17	3,73	6,51	2,70	4,72	0,56
Arveja P. sativum	<b>6,9</b>	-	<b>3,58</b>	<b>4,08</b>	<b>0,88</b>	<b>3,20</b>	<b>6,37</b>	<b>3,34</b>	<b>4,22</b>	0,74

Lis: lisina; His: histidina; Tre: treonina; Val: valina; Met: metionina; Ile: isoleucina; Leu: Leucina; Tir: tirosina; Phe: fenilalanina; Trp: triptófano.

En la Tabla 6, se observa que no hay diferencias significativas entre el contenido de lisina, treonina, leucina presentes en el *Erythrina edulis* y en el huevo (proteína de referencia). Los valores de histidina y tirosina en el chachafruto se encuentran por encima de los valores mostrados para el huevo. Por su parte, el contenido de metionina es menor, lo cual es de esperarse ya que siendo el chachafruto una leguminosa, carece de aminoácidos azufrados. El contenido de triptófano también es considerablemente bajo cuando se compara con el huevo, sin embargo colocándolo frente al resto de las leguminosas mostradas en la Tabla 6, el contenido de cada aminoácido es mayor en el *Erythrina edulis*, sugiriendo que su proteína es de mayor valor biológico que las otras leguminosas citadas.

La calidad o el valor biológico de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidades de aminoácidos, lo que representa una medida de la eficacia de como el organismo puede utilizar esa proteína. Los aminoácidos presentes en las proteínas no están siempre “disponibles en forma total”, porque la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos puede ser incompleta. Generalmente, la calidad de la proteína se mide en función a su índice de aminoácidos esenciales (IAE) el cual se determina sobre la base de su contenido en aminoácidos indispensables con relación a las necesidades humanas de los mismos:

$$IAE = \frac{mg \text{ A.A limitante por g de proteína}}{mg \text{ A.A por g de proteína de referencia}} \times 100 \text{ (ec. 1)}$$

Por su parte, los ensayos biológicos también son de gran importancia para definir la calidad proteica de un alimento. El coeficiente de eficiencia proteica neta (CEPN) es la ganancia en peso (gramos) obtenido por las ratas por gramo de proteína consumida incluyendo en el cálculo la pérdida de peso en un grupo de ratas alimentadas con un régimen exento de proteínas [28]:

$$CEPN = \frac{\text{ganancia de peso} + \text{pérdida de peso en regimen exento de proteínas}}{\text{proteínas ingeridas}} \quad (\text{ec. 2})$$

A partir de los valores de la tabla 6, se puede deducir que el índice de aminoácidos esenciales (IAE) en la *Erythrina edulis* es de 90%, mientras que para la arveja y el frijol son 59 y 61 % respectivamente. El conjunto de estos resultados indica que el chachafruto, *in vitro*, posee una mejor calidad proteica que el frijol y la arveja. Sin embargo, ensayos *in vivo*, realizados por Pérez G y col.[8], demuestran que el coeficiente de eficiencia proteica (CEPN) del *Erythrina edulis* cocido es bajo (1,15) en comparación a la soya (2,32), arvejas (1,57), maní (1,58). Estos autores sugieren complementar esta proteína con metionina y triptófano para aumentar su calidad.

### **2.5 Aplicaciones Productos proteicos de origen vegetal.**

Los llamados productos proteínicos vegetales o PPV según el Codex Alimentarius (2007) para cereales, legumbres y leguminosas, son aquellos productos elaborados a partir de materia prima vegetal que contienen más de 40% de proteína. La norma planteada en este Codex es específica para la soya, y dicta que estos productos proteínicos pueden clasificarse dependiendo de su porcentaje en proteína: harinas proteínicas (50-65%), concentrados proteicos (65-90%) y aislados proteicos (>90%). Esta norma aplicaría para cualquier leguminosa. [29]

Colocando aparte las consideraciones nutricionales, las proteínas son usadas como ingredientes de las comidas por sus propiedades funcionales para proveer una cierta función o característica en el producto. Varios ejemplos de propiedades funcionales han sido listados, pero algunos de los más importantes están relacionados a la habilidad de la proteína para estabilizar emulsiones y espumas o impartir atributos sensoriales. Esto aplica no solo para proteínas animales, sino para proteínicas de origen vegetal, especialmente de las leguminosas.[30]

El interés en el uso de leguminosas y sus constituyentes en la formulación de alimentos está creciendo en muchos países desarrollados. Los factores que contribuyen a esto incluyen sus beneficios nutricionales y para la salud, cambios en la preferencia del consumidor, incremento en la demanda de variedad/balance, cambios demográficos, crecimiento en la incidencia de alergias a ciertos alimentos y la continua investigación de las tecnologías de producción y procesamiento.

Una desventaja de la utilización de leguminosas, tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo, es el tiempo que se demora prepararlas. Con excepción de algunas lentejas, la mayoría de las leguminosas requieren remojo durante la noche previa a su consumo, seguido de al menos una hora de preparación. Los consumidores de hoy en día buscan tener una mayor variedad y productos más saludables en una dieta con una conveniencia de “listo para consumir”. Las harinas proteínicas de leguminosas, así como sus concentrados y aislados pueden, por lo tanto, ofrecer oportunidades para el desarrollo de un producto novedoso. Estos pueden ser implementados en: alimentos para bebés, imitaciones de leches, extensores cárnicos, productos horneados, glaceados, frosting y cremas, productos extruídos, pastas y noodles y productos extruídos inflados.<sup>[13]</sup>



### 3. Objetivos

#### a. Objetivo General

Determinar el valor nutricional de harina proteica de *Erythrina edulis*.

#### b. Objetivos específicos

- Obtener mediante secado convencional harinas de dos morfotipos de *Erythrina edulis* (Chachafruto).
- Caracterizar fisicoquímicamente las harinas obtenidas de ambos morfotipos para el estudio.
- Estandarizar los parámetros óptimos (pH, relación harina:solvente, tiempo de extracción y temperatura) de extracción de las proteínas *Erythrina edulis* (Chachafruto), estimando la cantidad de proteína extraída en cada caso por el método de Lowry.
- Determinar el pH del punto isoeléctrico de la proteína del *Erythrina edulis* (Chachafruto) en el cual se obtiene un mejor rendimiento de la precipitación.
- Caracterizar la harina proteica resultante de las condiciones óptimas de extracción y precipitación seleccionadas previamente.
- Evaluar el perfil de aminoácidos de la harina proteica de *Erythrina edulis* (Chachafruto) mediante cuantificación por la técnica de HPLC en fase reversa de los aminoácidos derivatizados con *fenilisotiocianato* (PITC).
- Determinar la digestibilidad *in Vitro* de la harina proteica de *Erythrina edulis*.

## 4. Metodología

### 4.1. Lugar de investigación

Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Facultad de Ciencias-UCV y Laboratorio de Investigación y Soporte Analítico del Centro Tecnológico de Empresas Polar.

### 4.2. Materia prima

Los árboles de chachafruto cosechados para este estudio fueron escogidos de acuerdo a un modelo estadístico completamente aleatorizado. Entre las variables consideradas para la escogencia de los árboles estuvieron: frutos o vainas en estado de madurez fisiológica, altura de las vainas a cosechar en el árbol, largo de las vainas. La plantación escogida se ubica específicamente en la Latitud: 8,66839 (8° 40' 6,21" N)

Longitud: -71,45638 (71° 27' 22,98" W) o lo que es igual en la localidad de la Azulita Estado Mérida, Venezuela (Figura 10).



Figura 10. Ubicación de la Azulita, Edo. Mérida [31].



Figura 12. Árbol de *Erythrina edulis* ubicado en La Azulita. Edo. Mérida.<sup>[32]</sup>



Figura 11. Frutos y flores de *Erythrina edulis*. La Azulita, Edo. Mérida <sup>[32]</sup>

### **4.3. Análisis estadístico**

Los resultados de las determinaciones evaluadas fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 5%, y las medias con diferencias significativas se sometieron a la prueba de comparación de medias por el método de Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17, para Windows 2007.

### **4.4. Reactivos y equipos**

#### 4.4.1. Reactivos.

- ✓ Hidróxido de sodio en grageas. Grado reactivo.  $\geq 98\%$  de pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Carbonato de sodio anhídrido, 99,5% de pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. 99% de pureza Sigma-Aldrich.
- ✓ Acetato de sodio trihidratado. Grado reactivo.  $\geq 99\%$  de pureza. Sigma- Aldrich.
- ✓ Fosfato ácido de disodio. Grado reactivo.  $\geq 99\%$  de pureza. Sigma-Aldrich
- ✓ Sulfato de cobre pentahidratado 99% de pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Acido clorhídrico fumante.  $\geq 37\%$  v/v. Sigma-Aldrich.
- ✓ Acido acético glacial. Grado reactivo.  $\geq 99.7\%$  v/v. Sigma- Aldrich.
- ✓ Acido sulfúrico concentrado. Grado reactivo. 98% v/v. Sigma-Aldrich
- ✓ Acido fosfórico 85% de pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu. Sigma.
- ✓ Etanol Absoluto.  $\geq 99.8\%$  de pureza. Sigma Aldrich.
- ✓ Acetonitrilo.  $\geq 99.9\%$  de pureza. Grado HPLC. Sigma-Aldrich.
- ✓ Eter de petróleo puriss p.a. Sigma-Aldrich.
- ✓ Trietilamina  $\geq 99,5\%$  de pureza. Marca Sigma.
- ✓ Fenilisotiocianato.  $\geq 99\%$  de pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Ampolla patrón de aminoácidos. Grado analítico. Sigma.
- ✓ Albúmina sérica bovina.
- ✓ O-Toluidina 99% de pureza. Sigma.
- ✓ Glucosa anhídrida. 99% pureza. Sigma-Aldrich.
- ✓ Amilogluosidasa AMG 300. (300U/mL)
- ✓ Quimotripsina pancreática bovina tipo II 52U/mg sólido. Sigma

- ✓ Tripsina pancreática porcina tipo IV. 17.600BAEE U/mg proteína. Sigma.
- ✓ Peptidasa intestinal porcina grado III. 102U/g sólido. Sigma.
- ✓ Agua destilada y agua deionizada Milli-Q.

#### 4.4.2. Equipos.

- ✓ Estufa
- ✓ Mufla
- ✓ Deshidratador de aire forzado Mitchell-Dryers.
- ✓ Rebanadora Metvisa.
- ✓ Molino de martillo Fitz-mill modelo D.
- ✓ Colorímetro triestímulo HunterLab, Reston, D-25.
- ✓ Equipo psicrométrico de determinación de actividad de agua AquaLab, CX2.
- ✓ Equipo Buchi para método de Kjeldahl para determinación de proteínas.
- ✓ Centrífuga Sigma.
- ✓ Agitador mecánico.
- ✓ Baño termostático.
- ✓ Liofilizador Labconco modelo Freezone 4.5.
- ✓ Espectrofotómetro UV-visible Agilent.
- ✓ HPLC Waters Alliance System modelo 2695 en fase reversa con detector UV-Visible, bomba cuaternaria y columna Nova-Pak C18 (Waters p/N WAT011695) 3,9 x 300 mm.

#### **4.5. Caracterización de los frutos de *Erythrina edulis*.**

Se tomó una muestra significativa de frutos de *chachafruto* y se procedió a registrar el peso (masa) de cada vaina; seguidamente se procedió a medir longitud, ancho, y espesor de cada vaina. Luego se procedió a abrir cada uno de las vainas (desvainado) y se realizaron las mediciones antes mencionadas para cada uno de los granos contenidos en las vainas. Una vez obtenidos los granos, éstos se clasificaron en función a su morfotipo, entre los cuales se tuvo rojo y amarillo. El rendimiento en función a granos de chachafruto se obtuvo de acuerdo a la ecuación 3.

$$R = \frac{(\text{peso vaina} + \text{granos}) - \text{peso vaina}}{(\text{Peso vaina} + \text{granos})} \times 100 \text{ (ec. 3)}$$

#### **4.6. Obtención de harinas**

Tomando en cuenta que se cosecharon dos morfotipos de *E. edulis* (amarillo y rojo), los granos de cada morfotipo se trataron y se analizaron de la misma manera pero por separado.

Para la elaboración de las harinas se procedió según la metodología utilizada por Arango y col. <sup>[9]</sup> con algunas modificaciones, el procedimiento general se muestra en la Figura 13 y el esquema ilustrado en la Figura 14:

- Haciendo uso de una rebanadora automática Metvisa, se realizó la reducción de tamaño de los granos del chachafruto, seguidamente éstos se escaldaron (blanching) en agua hirviendo durante 1 minuto.
- Se determinó la humedad de los granos rebanados y escaldados de cada morfotipo y se procedió a realizar una curva de secado para analizar cómo se desarrollaba la remoción de agua de cada fruto bajo en las mismas condiciones en las que luego se realizaría la harina: en un deshidratador de aire forzado Mitchell-Dryers con un flujo de aire de 300m<sup>3</sup>/h, a 45°C.
- Se pesaron varias cápsulas con una cantidad significativa de muestra dispuesta de manera uniforme y se colocaron dentro del deshidratador. Las cápsulas se fueron retirando del equipo en intervalos de tiempo de 20 minutos durante las primeras 3 horas, luego 30 minutos las siguientes 3 horas y luego a las 24 horas, se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron. De esta manera se conoce la velocidad en la que pierde agua el producto.
- Posterior a la curva de secado, el resto de los granos rebanados y escaldados fueron colocados en bandejas para introducirlos al deshidratador Mitchell-Dryers, manteniendo las condiciones de secado antes descritas.
- Una vez deshidratados los granos, se realizó la molienda de los mismos en un molino de martillo Fitz-Mill, modelo D.
- Posterior a la molienda, se tamizaron las harinas obtenidas, en función de trabajar con las retenidas en el tamiz de 60 y 80 mesh.

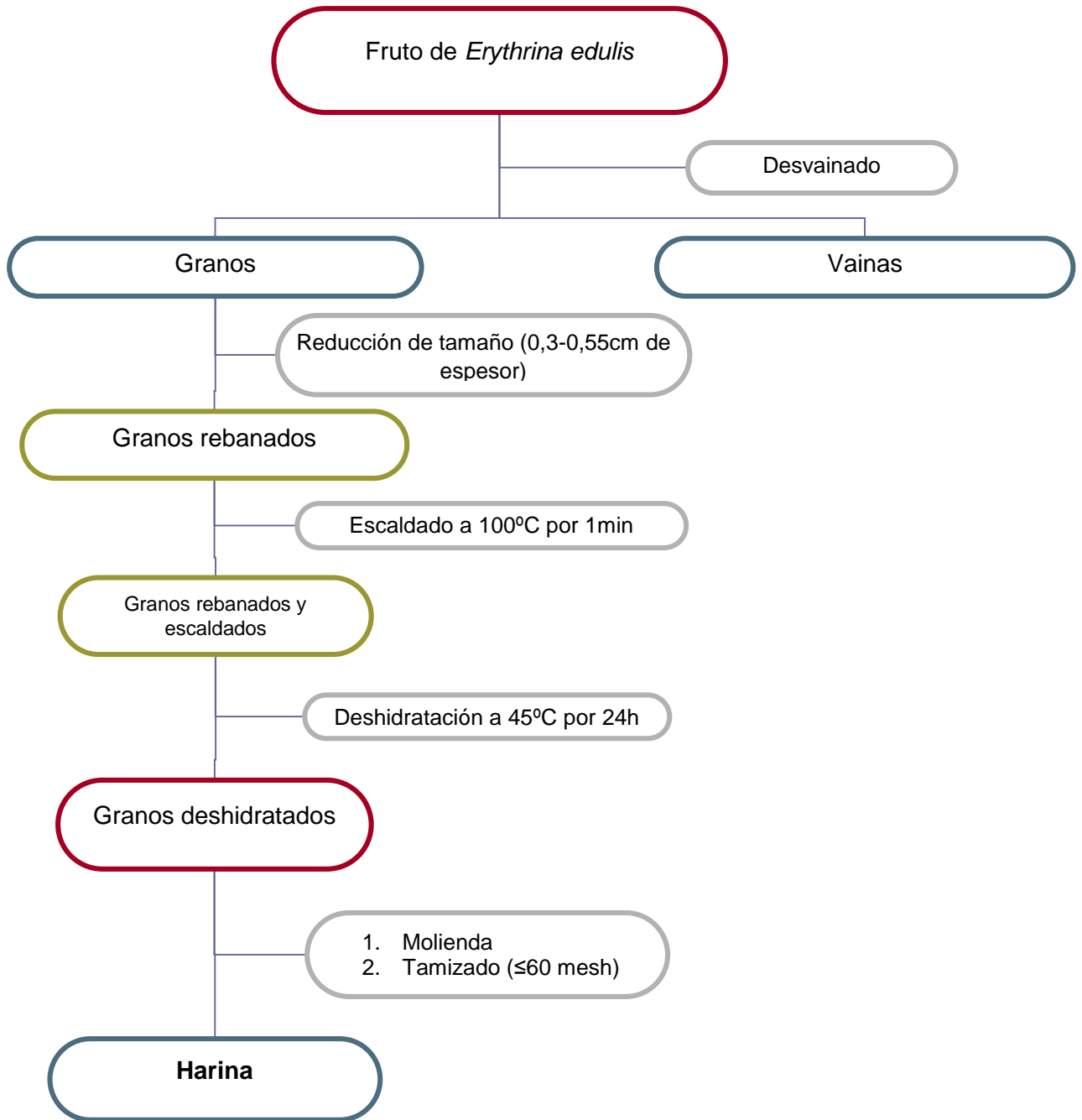


Figura 13. Esquema de obtención de harina a partir de los granos de *Erythrina edulis*.

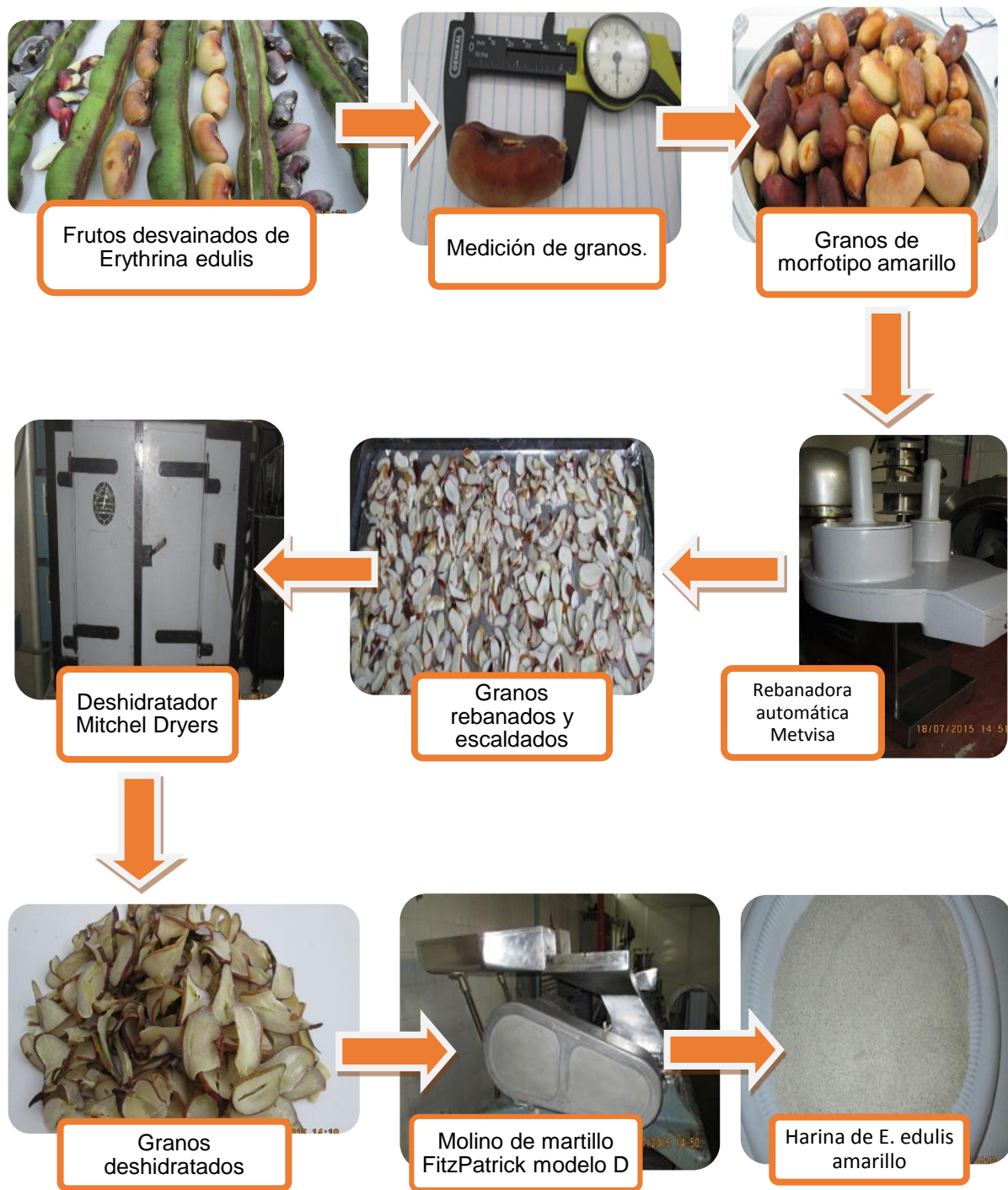


Figura 14. Esquema ilustrado de la elaboración de la harina de *Erythrina edulis*



## **4.7. Análisis proximal de las harinas.**

### **4.7.1. Humedad.**

La humedad de la harina de *Erythrina edulis* se determinó según el método 925.10 de la AOAC 2005 , el cual es un método gravimétrico que implica el secado de la muestra en una estufa a  $130 \pm 3$  °C hasta peso constante y la comparación de los pesos antes y después de la deshidratación para el cálculo del contenido de agua libre.<sup>[33]</sup>

$$\%H = \frac{(g_{\text{harina}} - g_{\text{harina desh}})}{g_{\text{harina}}} \times 100 \text{ (ec. 4)}$$

### **4.7.2. Cenizas.**

El contenido de ceniza presente en la harina se cuantificó por el método gravimétrico 923.03 expuesto en la AOAC 2005, en el cual se incinera la muestra en la mufla a 550°C para eliminar toda la materia orgánica hasta llegar a peso constante. <sup>[33]</sup>

$$\%C = \frac{g_{\text{cenizas}}}{g_{\text{harina}}} \times 100 \text{ (ec. 5)}$$

### **4.7.3. Grasa cruda.**

La grasa cruda contenida en las harinas de *Erythrina edulis* se determinó mediante el método de Schoch (1942) <sup>[34]</sup> empleado generalmente para almidones los cuales poseen muy poco contenido de grasa. Este método consiste en hidrolizar la muestra utilizando etanol y ácido clorhídrico 8M en un baño de agua a 70°C. Posteriormente se realizaron extracciones sucesivas del hidrolizado empleando éter de petróleo y dietil éter. Las fracciones etéreas se recolectan en fiolas previamente taradas y se deja evaporar el solvente de manera de obtener sólo la grasa, el peso de ésta se calculó por diferencia.

$$\%Grasa\ cruda = \frac{g_{\text{grasa}}}{g_{\text{harina}}} \times 100 \text{ (ec. 6)}$$

#### 4.7.4. Proteínas

El cálculo del porcentaje de proteína en las harinas se realizó por el método Kjeldahl (979.09 AOAC 2005) [33] :

- Se pesó alrededor de 1g de muestra y se colocó en el tubo digestor añadiéndole 15mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc más 1g de catalizador (CuSO<sub>4</sub> +K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:9)
- Se colocó en el digestor hasta que la muestra tomó un color verde tenue.
- Se dejó enfriar y se le agregaron 80mL de agua destilada, agitando vigorosamente, y luego se añadieron 45mL de NaOH 50% sin agitar.
- Se colocó en el destilador y el destilado se recibió en una fiola que contenía 25 mL de ácido bórico al 4% (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) y 4 gotas de indicador (rojo de metilo+azul de metileno).
- El contenido de la fiola se tituló con HCl 0,1M previamente estandarizado.
- El cálculo del porcentaje de proteínas se realizó del siguiente modo:

$$\%Proteína = \frac{[HCl] \times mLHCl \times 14 \frac{g}{mol} \times 6,25}{gmuestra} \times 100 \text{ (ec. 5)}$$

#### 4.7.5. Carbohidratos totales.

Los carbohidratos totales se calcularon empleando la fórmula propuesta por el Instituto Nacional de Nutrición (INN, 1999), donde:

$$CHO = 100 - humedad - cenizas - grasa - proteina \text{ (ec. 6)}$$

#### 4.8. Análisis físicos de las harinas de *Erythrina edulis*.

##### 4.8.1. Color.

El color se determinó por medio del colorímetro triestímulo de Hunter (HunterLab, Reston, D-25). Los parámetros de color se expresaron en el espacio de color CIE L\*a\*b\* (figura 15). En este sistema, el color es definido por tres coordenadas rectangulares L\*, a\* y b\*, siendo L\* la luminosidad con valores de 0 (totalmente negro) a 100 (totalmente blanco). El matiz (tonalidad) es dado por dos caracteres cromáticos, uno de ellos codificado por a\* con valores de -60 (verde) y +60 (rojo), y el segundo carácter de matiz b\* el cual varía entre valores de -60 (azul) y +60 (amarillo).

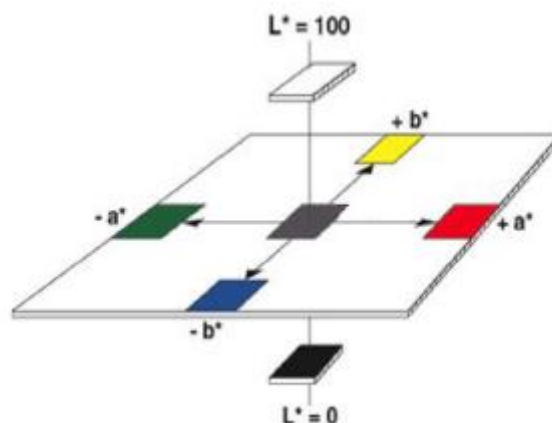


Figura 15. Sólido de colores del sistema CIE  $L^*a^*b^*$

#### 4.8.2. Actividad de Agua.

La actividad de agua ( $a_w$ ) se midió en el equipo psicrométrico de determinación de actividad de agua (AquaLab, CX2).

#### 4.9. Análisis físicoquímicos

La acidez titulable de las harinas se determinó por el método 02-31 de la AACC [35], el cual consistió en realizar una suspensión de la harina en agua destilada previamente descarbonatada en una relación 1:10 y en agitar por una hora. Posteriormente se filtró y se tomaron alícuotas del filtrado, titulando con NaOH 0,0005N. El pH por su parte se midió según método el 943.02 de la AOAC 2005 mediante un potenciómetro.

#### 4.10. Obtención harina proteica a partir de la harina de *Erythrina edulis* (Chachafruto).

Para elaborar la harina proteica, en primer lugar, se realizó una mezcla 50:50 de las harinas de los morfotipos de *Erythrina edulis* debido a la poca disponibilidad de materia prima. Una vez mezcladas, se evaluaron diferentes pH de extracción y de precipitación tomando como referencia el trabajo de Martínez y Añón, (1996) [36], con ligeras modificaciones.

#### 4.10.1. Extracción a diferentes pH alcalinos y la precipitación a pH 3.

Las proteínas se extrajeron a pH 8, 9, 10 y 11. Para este fin, a cada nivel de pH, la harina chachafruto se suspendió en agua destilada (1/10, p/v) y el pH se ajustó al valor requerido por adición de NaOH 2M, cada nivel se realizó por duplicado. Se agitó por un periodo de 24h a temperatura ambiente. Las suspensiones se centrifugaron a 3000 rpm por 20min. Posteriormente, se ajustó pH se llevó a pH 3 con adición de HCl 2M para precipitar la proteína; luego se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos. El sólido centrifugado se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 0.1M para posteriormente ser liofilizadas en un liofilizador Labconco (Figura 16). El esquema se ilustra en la figura 21.

#### 4.10.2. Extracción a pH 11 y precipitación a diferentes pH.

Se realizaron 8 extracciones al mejor pH de extracción determinado en el apartado anterior (pH 11), bajo las mismas condiciones. Debido a las observaciones experimentales de la sección anterior, se tomó un rango de pH más reducido para determinar el punto isoeléctrico de la proteína, siendo así, cada extracción se ajustó a pH de 3,5; 4; 4,5 y 5 con HCl 2M, cada nivel por duplicado. Los sobrenadantes así tratados se centrifugaron a 3.000 rpm por 20 minutos. Cada centrifugado se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 0.1M para luego ser liofilizado (Figura 22).



Figura 16. Liofilizador Labconco con muestras acopladas.

A los precipitados obtenidos en las secciones 4.10.1 y 4.10.2 se les estimó el contenido de proteína por el método de Lowry para establecer cuáles eran las condiciones que favorecen un mayor aislamiento de las proteínas presentes en la harina de *Erythrina edulis*.

El método de Lowry<sup>[37]</sup> está basado en el reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyo constituyente activo es una mezcla de ácidos fosfomolibdénico y fosfotungstícico. La mezcla de ácidos en la preparación de Folin-Ciocalteu es el cromóforo final e involucra las siguientes especies:



Y



Las proteínas efectúan una reducción de la mezcla de ácidos perdiendo 1,2 o 3 átomos de oxígeno del tungstato y/o molibdato, produciendo una o más especies reducidas con un color característico azul ( $\lambda_{\text{max}}$  745-750nm) (Figura 17). El cobre aparentemente forma un quelato con la estructura peptídica (Figura 18) y facilita la transferencia de electrones, particularmente en las cercanías de los grupos funcionales de aminoácidos y por lo tanto incrementando la sensibilidad hacia la proteína. Los principales aminoácidos cromóforos a los cuales el método de Lowry es sensible son la tirosina y el triptófano y menor extensión a la cistina, cisteína e histidina. <sup>[38]</sup>

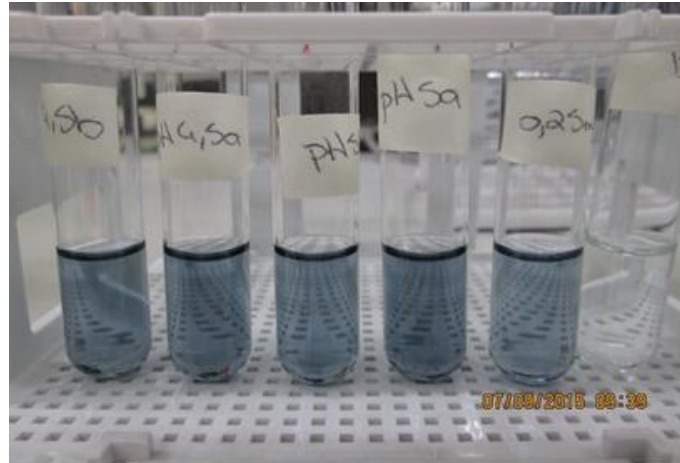


Figura 17. Color desarrollado durante la reacción del método de Lowry.

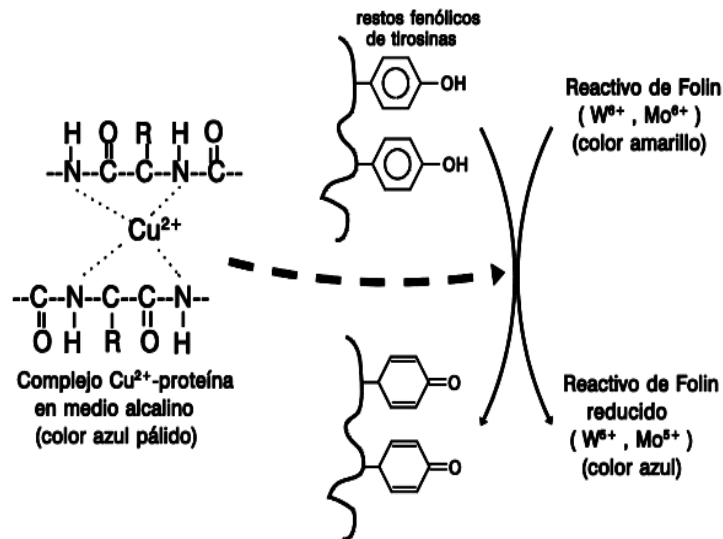


Figura 18. Esquema ilustrado de las reacciones que ocurren en el método de Lowry.<sup>[39]</sup>

Según experimentos relacionados con el uso de estos dos métodos para la determinación del contenido de proteína realizados por Roffé, la correlación entre los resultados obtenidos por Kjeldahl y por Lowry es bastante buena (Figura 19). Además Roffé compara curvas de calibración de Seroalbúmina bovina (BSA) y lectina de leguminosas del género Canavalia (Concanavalia A) (Figura 20). Los resultados sugieren que este método no posee diferencias en cuanto al uso de proteína animal o vegetal.<sup>[40]</sup>

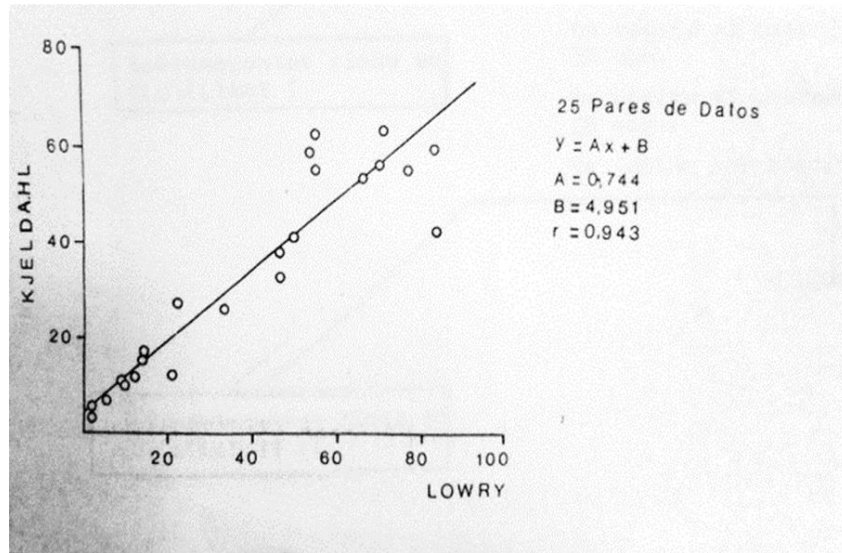


Figura 19. Correlación del método de Lowry con el método de Kjeldahl [40].

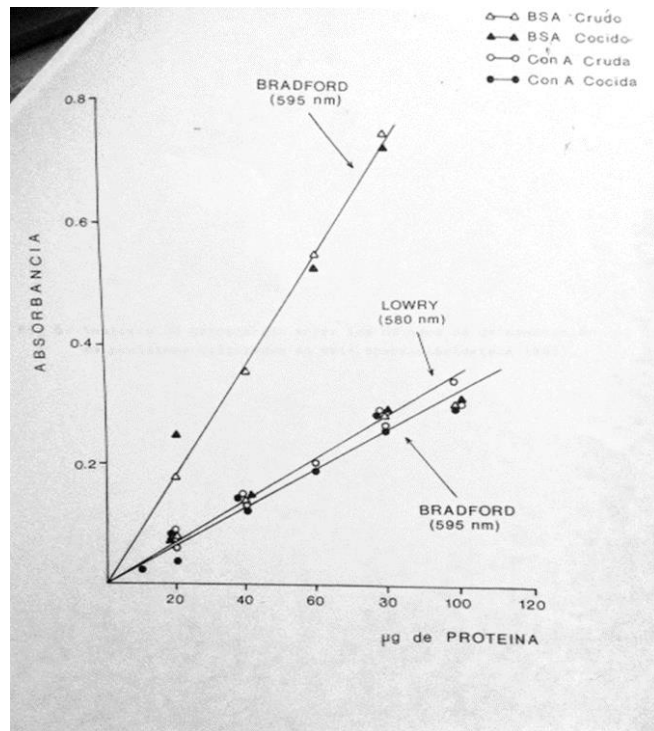


Figura 20. Comparación de curvas de calibración para los métodos de Lowry y Bradford empleando proteína animal (BSA) y proteína vegetal (Con-A) [40]

El método de Lowry se caracteriza por su alta sensibilidad y su rapidez, por lo que se puede emplear para el análisis de varias muestras utilizando pequeñas cantidades de la misma, lo cual es muy conveniente, tomando en cuenta el bajo rendimiento de los extractos. Por ello, se propone como método para cuantificación rápida y rutinaria de

las proteínas presentes en los precipitados obtenidos en la estandarización del método de obtención la harina proteica.

- **Soluciones:**

- CuSO<sub>4</sub> 1%
- Tartrato de Sodio y Potasio al 2%
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% disuelto en NaOH 0,1N.
- Reactivo de Folin.Ciocalteu.
- NaOH 0,1N.
- Seroalbúmina bovina (BSA).

- **Curva de calibración.**

- A partir de una solución madre de 0.5mg/mL de BSA se prepararon patrones desde 0,05-0,50 mg/mL.
- A 0,5mL de cada patrón se le añadieron 2,5mL una solución preparada a partir de 0,5mL de CuSO<sub>4</sub> 1%, 0,5mL de tartrato de sodio y potasio al 2% y Carbonato de sodio al 2% disuelto en NaOH 1M. Se dejó reaccionar por 10 min.
- Mientras la mezcla anterior reaccionaba se preparó una mezcla 1:1 de agua y reactivo de Folin-Ciocalteu, la cual debía estar fresca para cada análisis. Pasados los 10min se añadieron 0,25mL de esta mezcla a la reacción anterior y se dejó reaccionar por 30min más.
- La absorbancia se midió a 580nm.

Para cuantificar la cantidad de proteína presente en los extractos liofilizados realizados para la estandarización, se prepararon soluciones de 0,5mg/mL de extracto disuelto en NaOH 0,1N. Posteriormente se realizó el procedimiento tal como se describió para la curva de calibración.

La curva de calibración (Anexo I) arrojó la siguiente ecuación lineal:

$$\frac{mg}{mL} Proteina = 1,4178 * Abs + 0,0095 (ec. 7)$$



A partir de la cual se realizaron los cálculos pertinentes para conocer el contenido proteico en los extractos.

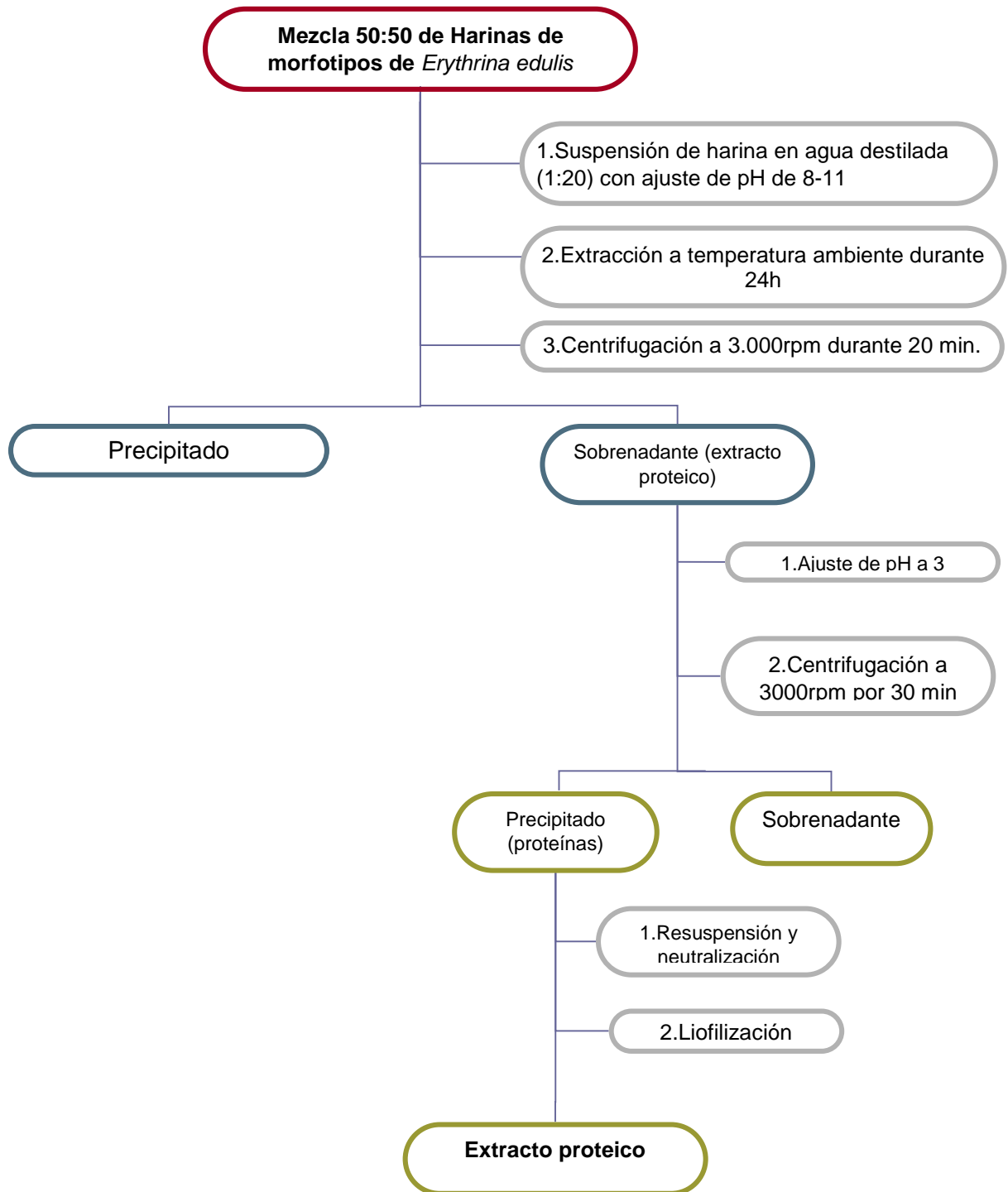


Figura 21. Esquema general de estandarización de extracción alcalina de las proteínas de *Erythrina edulis*.

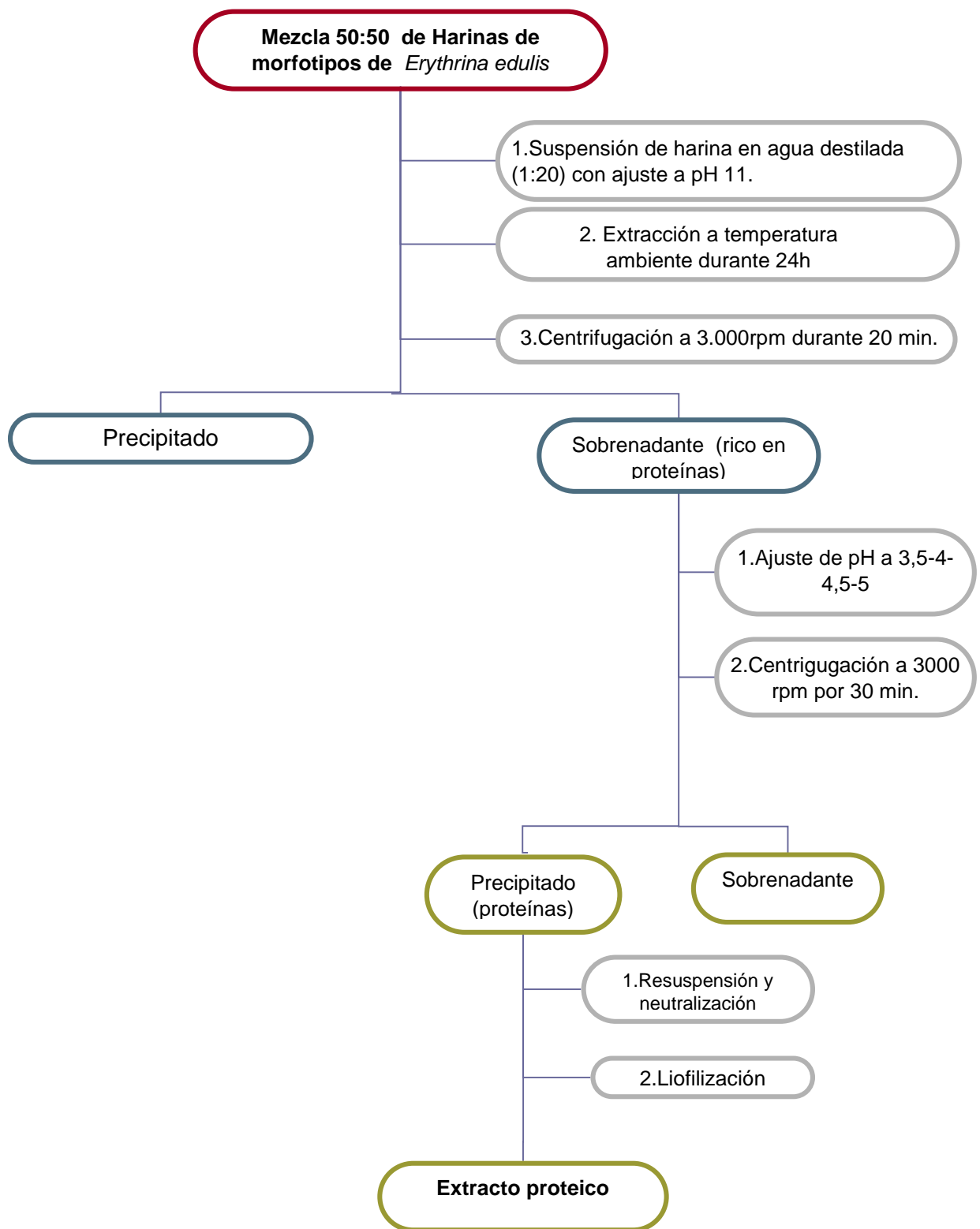


Figura 22. Esquema de estandarización de punto isoeléctrico de las proteínas de *Erythrina edulis*.

#### **4.11. Obtención de harina proteínica a macro escala.**

Una vez evaluados los parámetros óptimos de extracción y precipitación de las proteínas de *Erythrina edulis* a escala de laboratorio, se recurrió a un proceso que permitió mayor rendimiento del aislado para así disponer de la cantidad suficiente para los análisis posteriores.

La obtención del aislado proteico a macro escala (Figura 24) se realizó tomando una cantidad de 200g de harina resultante de la mezcla de ambas harinas de *Erythrina edulis* en una proporción 50:50, ésta se dispersó en 4 litros de agua destilada (1/20, p/v), el pH de la dispersión se ajustó a pH 11 empleando NaOH 2M. El volumen de extracción se dividió en dos partes y se realizó en un beacker de 2L con agitación constante, a temperatura ambiente, por un periodo de 1h. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se recolectó y se ajustó su pH a 4,5 para precipitar la proteína (Figura 23). Se repitió el proceso de centrifugación a 3000rpm esta vez por 30 minutos, se decantó y el precipitado se resuspendió y neutralizó empleando NaOH 0,1N para luego ser liofilizado.



Suspensión de mezcla de harinas de *E. edulis* en agua destilada



Extracción de proteínas a pH 11

1. Agitación por 20min.
2. Centrifugación a 3000rpm por 20min.
3. Decantación.
4. Neutralización
5. Liofilización



1. Agitación por 1h.
2. Centrifugación a 3000rpm por 20 min.
3. Decantación



Harina proteína de *Erythrina edulis* liofilizada



Precipitación de proteínas a pH 4,5

Figura 23. Esquema ilustrativo para la elaboración de harina proteica a escala macro.

#### **4.12. Caracterización de la harina proteínica.**

Los análisis físicos proximal se determinaron siguiendo la misma metodología citada para la caracterización de la harina en los apartados 7 y 8 de esta sección.

#### **4.13. Cuantificación de polifenoles en las harinas de los morfitpos de *Erythrina edulis* y en la harina proteica.**

El contenido de polifenoles en las harinas de *Erythrina edulis* se determinó mediante la metodología empleada por el laboratorio de Empresas Polar, la cual se basa en la capacidad de absorción de la radiación por los anillos aromáticos de los polifenoles en el UV, a una longitud de onda de 280nm.

En primer lugar se procedió a la extracción de los polifenoles de la harina. Para ello se pesaron 100mg de harina proteínica por triplicado. A cada réplica se le añadieron 10mL de metanol se dejó en agitación por 24h y posteriormente se centrifugó.

Luego se procedió según el método Mazza y col. <sup>[41]</sup>. Se tomaron 0,5mL de los extractos metanólicos de cada réplica y se le añadieron 0,5mL de HCl al 0,1% y 9,1mL de HCl al 2% (ambas soluciones del ácido preparadas en etanol absoluto). Se homogenizó y se dejó reaccionar por 15 minutos. Pasado este tiempo se midió su absorbancia a 280nm para determinar el contenido de polifenoles totales.

El patrón empleado para realizar la curva de calibración fue el ácido gálico (Anexo II) siendo la ecuación de la recta:

$$\frac{mg}{mL} ac. Gal = 399,12 \frac{mg}{mL} \times Abs \text{ (ec. 8)}$$

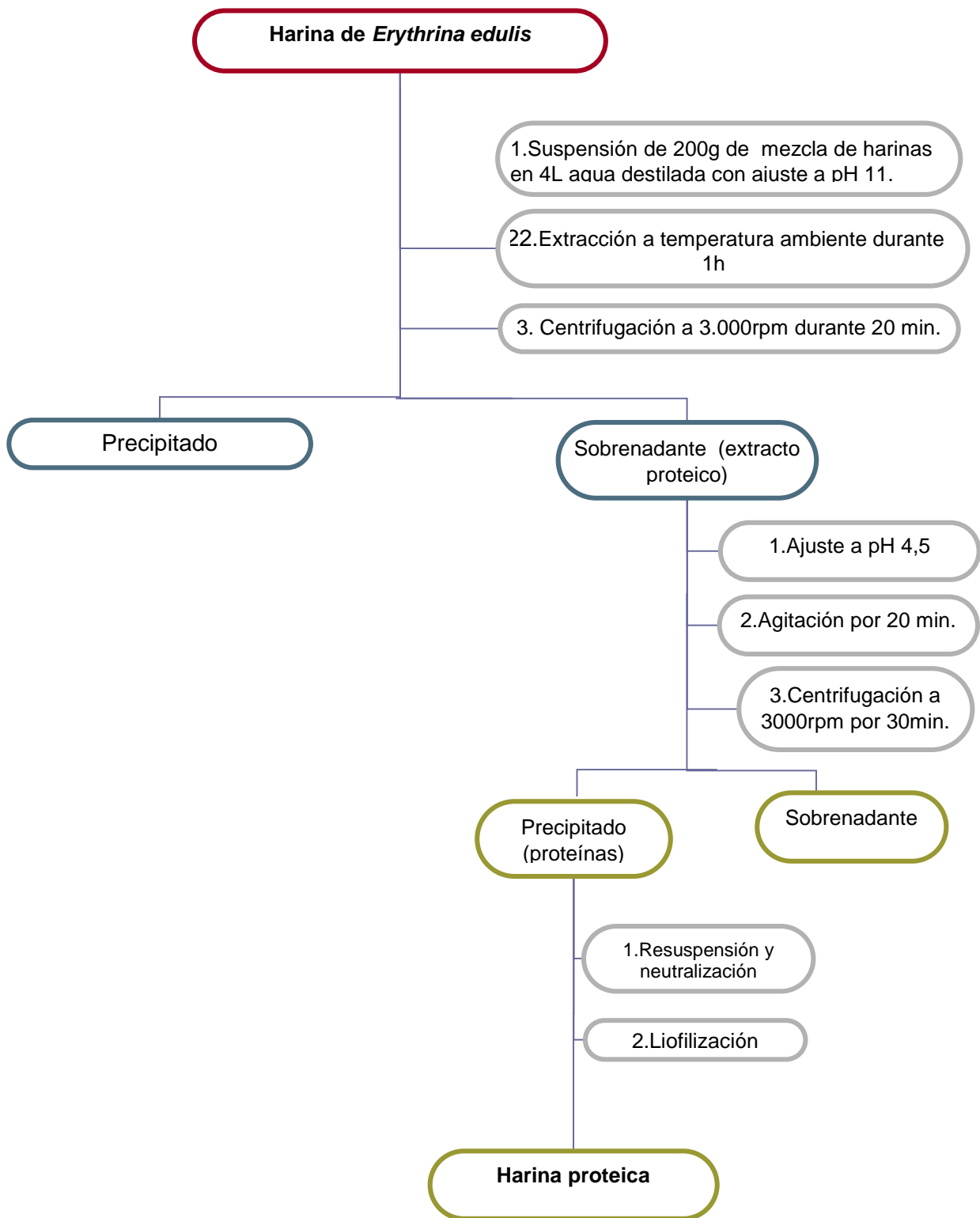


Figura 24. Esquema de obtención de harina proteínica a macro escala a partir de harina de *Erythrina edulis*.

#### 4.14. Cuantificación de almidón en las harinas de *Erythrina edulis*.

Se procedió a cuantificarlo siguiendo la metodología de Chiang y Johnson (1977) sugerida para muestras con bajo contenido de azúcares reductores, como es el caso de los cereales y leguminosas. Este método está basado en la conversión del almidón en glucosa mediante la acción de la enzima amiloglucosidasa, para posteriormente hacer reaccionar la glucosa resultante con *o*-toluidina en medio ácido formando una imina coloreada (Figura 25) a la cual se le mide la absorbancia a 630nm. [42]

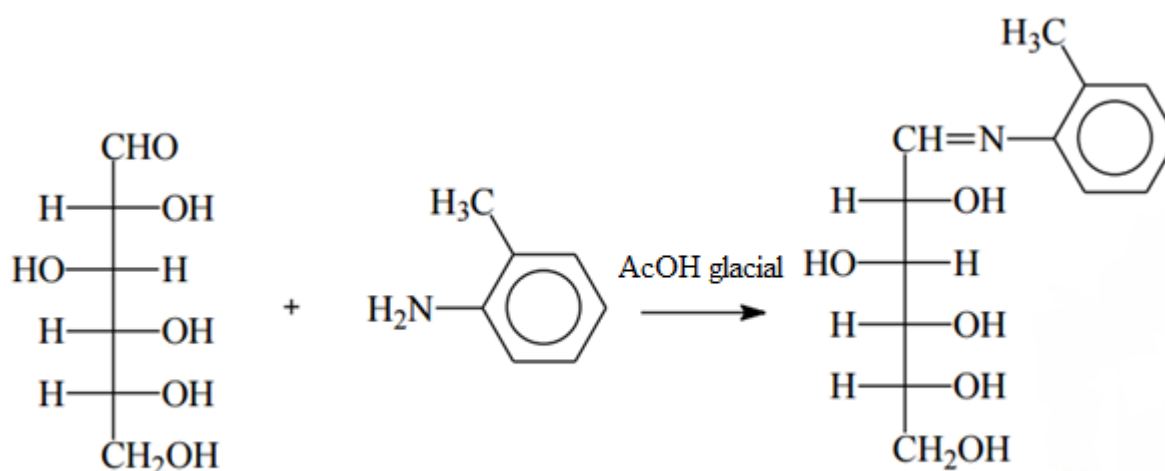


Figura 25. Reacción de la glucosa con la *o*-toluidina en medio ácido. [43]

Se realizó la curva de calibración empleando glucosa anhidra como patrón (Anexo III), se tomaron 0,5mL de cada patrón y se colocaron en un tubo de ensayo para hacerlos reaccionar con 4,5mL del reactivo de *o*-toluidina en un baño de agua hirviente por 10 minutos. Se enfrió con agua fría y por último se añadieron 5mL de ácido acético glacial para medir su absorbancia a 630nm.

En el caso de las muestras, se pesaron 20mg de muestra, los cuales se dispersaron en 3mL de agua destilada y 1mL de NaOH 1N en un tubo de centrifuga de 50mL. Pasados 5 minutos se le agregó 1mL de HCl 1N. Una vez gelatinizado el almidón se procedió a añadir 25mL de solución de amiloglucosidasa AMG 300, previamente preparada en un buffer de acetato, y se incubó a 40°C por un periodo de 60 minutos. Una vez cumplido el tiempo de incubación se añadió 2mL de ácido tricloroacético para



inactivar la enzima y precipitar las proteínas. Esta solución se centrifugó y se le realizó el mismo tratamiento que la curva de calibración para determinar la concentración de glucosa. La relación entre la glucosa y almidón empleada por los autores del método, es la siguiente:

$$\%Almidon\ total = \frac{mg\ Glucosa\ x\ 0,90}{mgmuestra\ seca} x 100\ (ec. 9)$$

#### **4.15. Cuantificación de aminoácidos de las harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y de la harina proteica.**

El perfil de aminoácidos esenciales (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, metionina, treonina, histidina, lisina y arginina) y no esenciales (glicina, prolina, serina, cisteína, tirosina, aspargina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico) se determinó a la harina de cada morfotipo (amarillo y rojo) de *Erythrina edulis* así como a la harina proteínica obtenida como producto final. Para ello, se empleó el método propuesto por Henrikson and Meredith <sup>[44]</sup>, desarrollado por Waters y modificado por Empresas Polar. Cada muestra se analizó por triplicado.

El análisis de la composición de aminoácidos de las proteínas tiene dos pasos: el primero, y más crítico, es la hidrólisis de los enlaces peptídicos para liberar los aminoácidos. Se llevaron a cabo dos tipos de hidrólisis: ácida y básica, ésto debido a que la hidrólisis ácida destruye el triptófano y por ello éste se obtiene mediante hidrólisis básica.

##### 4.15.1. Hidrólisis de los enlaces peptídicos de la proteína.

La hidrólisis ácida se realizó agregando 15mL HCl 6M a determinada cantidad de muestra según sea el contenido de proteínas, de manera de disponer de 40mg de proteína. Luego de agregar el ácido se le burbujeó nitrógeno por unos cuantos segundos de manera de desplazar el oxígeno y así evitar la oxidación de la tirosina. Los tubos conteniendo la muestra y el ácido se colocaron en la estufa a  $110 \pm 1$  °C por un periodo de 24 horas. Luego de este período se dejaron enfriar y los hidrolizados se transfirieron cuantitativamente a balones de 50mL con agua Milli-Q para ser enrazados.

La hidrólisis básica se llevó a cabo con NaOH 4,6M siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección anterior, con la excepción de que, al retirar la muestra de la

estufa y dejarla reposar, el pH del hidrolizado se ajustó a 4,2 empleando HCl concentrado.

En el caso de la hidrólisis ácida, cada réplica se filtró a través de filtros millipore de 45micras. Por su parte, las réplicas de hidrólisis básica debieron ser centrifugadas en eppendorf para obtener una solución transparente, ya que este tipo de hidrólisis no logró penetrar el filtro de 45micras por su densidad. . Posteriormente se tomaron 30  $\mu$ L de cada filtrado y se colocaron en pequeños tubos de reacción de 6 x 50 mm. Se colocaron en un desecador al vacío hasta que el líquido se hubiera secado (Figura 26)

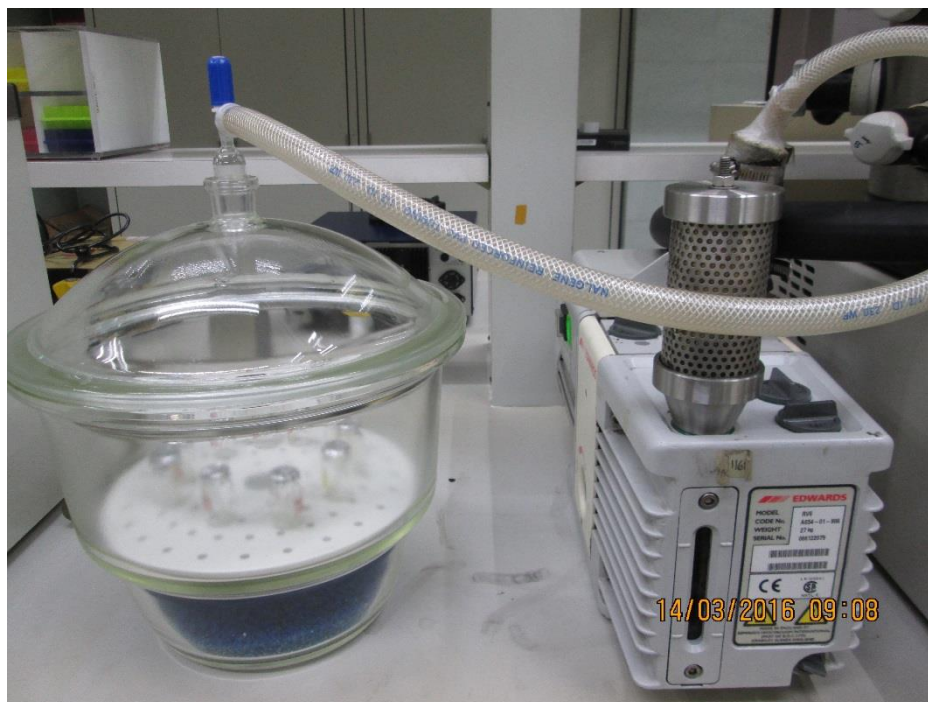


Figura 26. Proceso de secado y resecado en desecador acoplado al vacío.

#### 4.15.2. Curva de calibración.

Se realizaron dos curvas de calibración: la primera curva se realizó con un estándar de aminoácidos, el cual contiene todos los aminoácidos menos el triptófano. Los niveles de la curva correspondían a la siguiente concentración dentro del rango dinámico lineal del método:

Tabla 7. Concentración de aminoácidos en los niveles de la curva de calibración.

<b>Nivel</b>	<b>Volumen de estándar</b>	<b>Concentración de aminoácidos (excepto la cistina) [<math>\mu\text{L}/\text{mL}</math>]</b>	<b>Concentración de Cistina [<math>\mu\text{L}/\text{mL}</math>]</b>
1	1	0,0125	0,00625
2	3	0,0375	0,01875
3	5	0,0625	0,03125
4	10	0,125	0,0625
5	20	0,25	0,125

Se construyó una segunda curva de calibración correspondiente al triptófano con las mismas concentraciones mostradas en la tabla anterior (Tabla 7). Para ello se preparó una solución patrón de triptófano de 2,5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  en ácido clorhídrico 0,1N. Al igual que la curva anterior cada nivel se realizó por triplicado. Luego de colocar el volumen correspondiente en cada tubo de reacción, estos se colocaron en un desecador al vacío para secarlos al igual que los hidrolizados descritos en el apartado anterior.

(a) Resecado de los hidrolizados de la muestra y los patrones

Las muestras y los patrones de la curva de calibración se resecaron agregando 10  $\mu\text{L}$  de una solución de etanol:agua:trietilamina en una relación 2:2:1, agitando en un vortex. Estos se colocaron de nuevo en el desecador al vacío hasta sequedad.

#### 4.15.3. Derivatización de los aminoácidos.

La derivatización de los aminoácidos se realizó utilizando Fenilisotiocianato (PITC) para producir Feniltiocarbamil Aminoácido (figura 27) ya que estos aminoácidos poseen una máxima absorbancia cerca de 269nm. La reacción procede como se muestra a continuación:

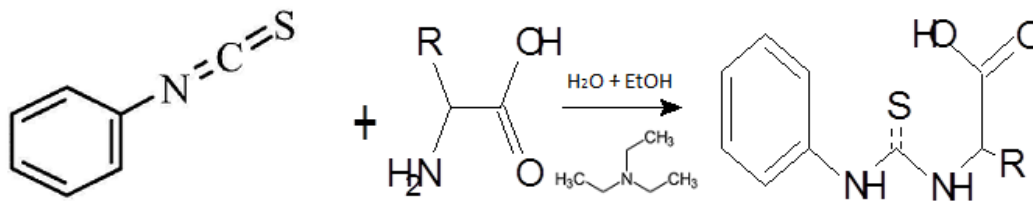


Figura 27. Reacción de derivatización de aminoácidos empleando Fenilisotiocianato en presencia de trietilamina [28].

Para llevar a cabo la derivatización se agregaron, a los hidrolizados resecados, 20  $\mu$ L de solución derivatizante (etanol:triethylamina:agua:PITC 7:1:1:1) agitando en un vortex para su homogenización y se dejó reaccionar por 20 minutos dentro del desecador, luego de esto se le aplicó vacío en el desecador para obtener los derivados secos y poderlos almacenar refrigerados.

#### 4.15.4. Análisis de las muestras en el equipo de HPLC.

El equipo utilizado fue un HPLC Waters Alliance (Figura 28) en fase reversa con detector UV-Visible, bomba cuaternaria y columna Nova-Pak C18 (Waters p/N WAT011695) 3,9 x 300 mm.

Los derivados de los aminoácidos secos se resuspendieron en una solución buffer de fosfato ácido de disodio ( $Na_2HPO_4$ ) llevada a pH 7,4 con ácido fosfórico al 10%, a la cual se le agregó una pequeña cantidad de acetonitrilo. Estas muestras son estables sólo por 60 horas en refrigeración y 10 horas a temperatura ambiente.

Especificaciones de la corrida:

- Flujo: 0,6mL/min.
- Temperatura: 40°C

- Fase móvil:

A: Acetato de sodio 0,14M- trietilamina 0,05% pH= 5,70

B: Acetonitrilo-agua 6:4

C: Agua Milli-Q

D: Acetonitrilo

- Volumen de inyección: 4  $\mu$ L

- Tiempo de corrida 47 minutos, delay: 30 min

- Detección: UV-visible  $\lambda$  = 254nm

La columna se debe equilibrar con las fases móviles cuatro horas previas al análisis con el flujo correspondiente a la corrida y un gradiente de 95% A y 5% B.

Una vez iniciado el análisis el gradiente del método fue el ilustrado en la tabla 4.2:

Tabla 5. Gradiente de fases móviles del método "Aminoácidos 2015"

Tiempo	Flujo (mL/min)	%A	%B	%C	%D	eventos
0	0,60	95	5	0	0	
20		68	32	0	0	
30		52	48	0	0	
35		0	100	0	0	
47		0	100	0	0	
57		95	5	0	0	
77		95	5	0	0	
82		95	5	0	0	
95		0	0	95	5	
140		0	0	95	5	
150	0,7	0	100	0	0	
180	0,7	0	100	0	0	
183	0	0	100	0	0	Sparge

Una vez corridos los estándares y las muestras, se realizó la integración de los picos de los cromatogramas (Anexo IV) y con estas áreas se construyeron las curvas de calibración (Anexo V y VI) para cada aminoácido. Para ello se empleó el software Empower de la compañía Waters.

La concentración de los analitos se determinó por interpolación en las curvas de calibración, tomando en cuenta las diluciones.



Figura 28. Equipo HPLC Waters Alliance modelo 2695.

#### **4.16. Digestibilidad *in Vitro* de la harina proteica.**

La digestibilidad *in vitro* se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta de Hsu y col. [45]:

Con un sistema multienzimático [(8 mg tripsina + 15.5 mg quimotripsina + 6.5 mg peptidasa) / 5 mL de agua destilada] constituido por tripsina pancreática porcina tipo

IX, quimotripsina pancreática bovina tipo II y peptidasa intestinal porcina grado III. Una cantidad específica de cada muestra se utilizó para preparar 50mL de una suspensión acuosa de proteína (6.25 mg proteína/mL); el pH de la suspensión se ajustó a 8.0, mientras se agitaba en un baño de agua a 37°C. A cada suspensión proteínica, mantenida a 37°C y en agitación constante, se le añadió 5mL de solución multienzimática; Pasados 10 minutos se registró el pH.

La Digestibilidad Proteica (DP) se calculó con la ecuación de Hsu y col.

$$D.P = 210,46 - 18,10x \text{ (ec. 10)}$$

Donde X = pH registrado 10 min después de añadir el sistema multienzimático a la solución proteínica. <sup>[45]</sup>

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Caracterización física de los frutos de *Erythrina edulis*.

Se encontró una particularidad al momento de desvainar el fruto y ésta fue que, a pesar de que las vainas lucían iguales en su exterior y fueron recolectadas al azar de los árboles de *E. edulis* (chachafruto), se encontraron dos coloraciones de granos, unos eran amarillos y otros rojos. Esto coincide con lo que cita Barrero [4] de que se pueden encontrar varios morfotipos de *Erythrina edulis*, algunos amarillos, rojos y negros. Esta coincidencia llevó a que cada morfotipo se caracterizara por separado.

Siendo así, la caracterización física de los frutos de *Erythrina edulis* arrojó los siguientes resultados (Tabla 6):

Tabla 6. Caracterización física de los frutos de los morfotipos de *Erythrina edulis*:

	<b>Rojo</b>	<b>Amarillo</b>
<b>Largo (cm)</b>	39,4 ± 5,4a	40,2 ± 4,9a
<b>Ancho (cm)</b>	3,0 ± 0,4a	3,2 ± 0,3a
<b>Espesor (cm)</b>	2,8 ± 0,4a	2,9 ± 0,4a
<b>Peso entero (g)</b>	151,1 ± 41,6a	184,9 ± 55,7a
<b>Peso vaina (g)</b>	71,4 ± 15,8a	72,6 ± 14,5a
<b># granos</b>	7 ± 2a	6 ± 1a
<b>Peso granos (g)</b>	79,7 ± 27,2a	112,2 ± 42,9a
<b>Rendimiento (%)</b>	51,6 ± 6,1a	58,1 ± 11,9a

Valores promedio ± desviación estándar, n=18 y m=7. Valores en la fila con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Cabe destacar que el morfotipo con el tegumento rojo en los granos representó la mayoría de la población total, por lo que se tuvo la oportunidad de analizar una mayor cantidad, mientras que el morfotipo de tegumento amarillo solo se pudieron analizar 7 frutos (vainas). Los análisis estadísticos muestran que no hay diferencias significativas entre los frutos de ambos morfotipos en cuanto a las variables analizadas. Es importante recalcar que el fruto y granos de *Erythrina edulis* se caracterizan por sus grandes dimensiones (figura 29) comparado las demás leguminosas. Comparándolo con otras leguminosas, como por ejemplo *Phaseolus vulgaris*, éste representa una ventaja debido a que los frutos cosechados son más grandes y poseen granos de mayor tamaño, por lo cual se necesita cosechar menos



frutos para completar una porción de granos del mismo peso de *P. Vulgaris*, cuyos frutos y granos son mucho más pequeños.



Figura 29. Granos de *Erythrina edulis* rojo.

En cuanto a la caracterización física de los granos de ambos morfotipos, se encontraron los siguientes resultados (Tabla 7):

Tabla 7. Caracterización física de los granos de ambos morfotipos de *E. edulis*.

	<b>Rojo</b>	<b>Amarillo</b>
<b>Largo(cm)</b>	4,4 ± 0,6a	4,7 ± 0,5a
<b>Ancho(cm)</b>	2,4 ± 0,4a	2,5 ± 0,3a
<b>Espesor(cm)</b>	3,2 ± 0,2a	2,4 ± 0,2b
<b>Peso (g)</b>	13,4 ± 4,6a	16,8 ± 4,6b

Valores promedio ± desviación estándar, n=25. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Las pruebas estadísticas indican que no hay diferencias significativas en cuanto al largo y ancho de los granos, sin embargo, si existen diferencias significativas en el espesor y peso de estas, siendo mayor el espesor de los granos rojos y en cuanto el peso los granos amarillos.

### **5.2. Elaboración de las harinas de *Erythrina edulis*.**

Durante la operación de escaldado de los granos rebanados se observó formación excesiva de espuma, correspondiente a las saponinas contenidas en los granos, muy característica en el caso de las leguminosas.

La curva de secado (Figuras 28 y 29) obtenida para cada morfotipo se ilustra a continuación:

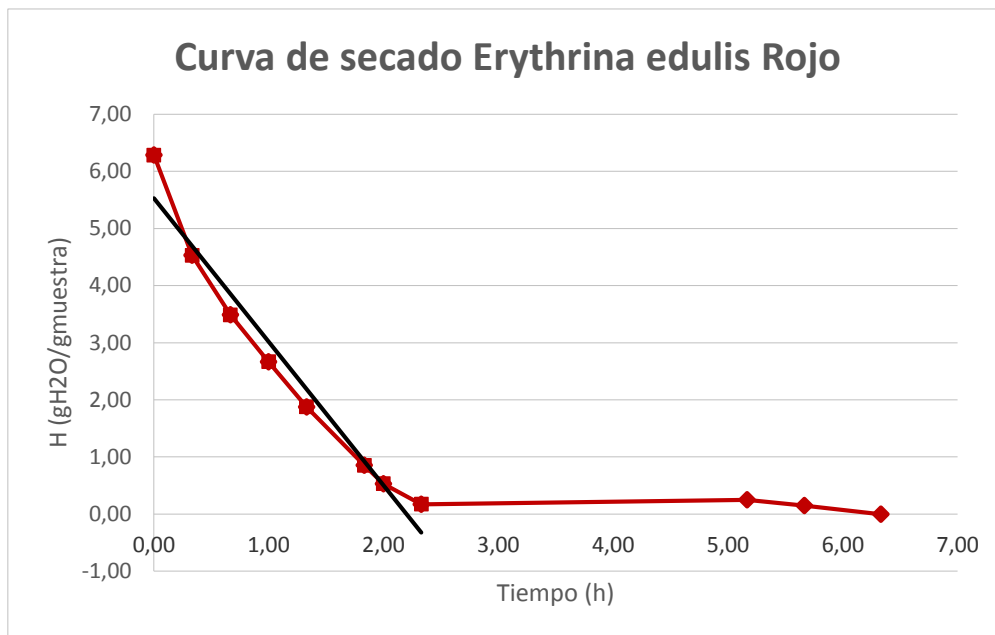


Figura 30. Curva de secado de *Erythrina edulis* rojo.

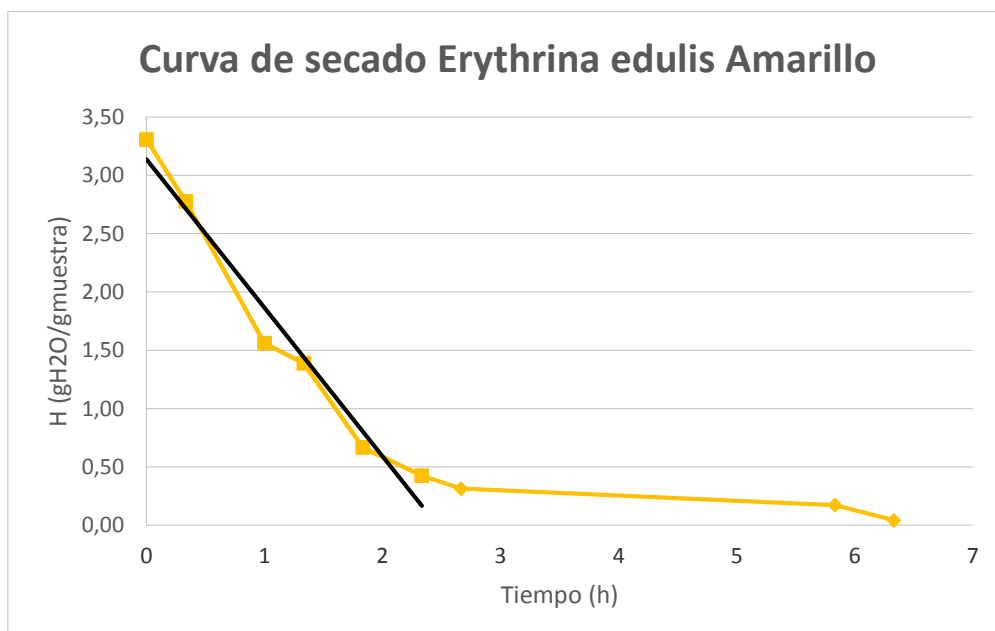


Figura 31. Curva de secado de *Erythrina edulis* amarillo.

En las figuras anteriores se puede observar que la humedad inicial de los granos del morfotipo rojo es mayor que la del morfotipo amarillo, esto se puede deber a que en

la población de granos rojos, había más presencia de granos inmaduros que seguramente contenían mayor humedad e incidieron en el valor de ésta. También se puede apreciar una ligera diferencia entre el patrón de pérdida de agua. Al aplicar una línea de tendencia lineal para la primera etapa de pérdida drástica de agua, se deduce que la velocidad de pérdida de agua (pendiente de la recta) para el morfotipo rojo es aproximadamente de  $-2,5\text{gH}_2\text{O/gmuestra/h}$  y para el morfotipo amarillo  $-1,3\text{gH}_2\text{O/gmuestra/h}$ . En el caso del morfotipo rojo (mayor humedad inicial) el contenido de agua decreció de manera constante y rápida, lo que indica que la mayoría del agua presente era agua no ligada. Pasadas dos horas se llegó al valor crítico de humedad, donde el agua que aún permanece forma parte del agua ligada que interacciona con los componentes de la matriz y por ello resulta más difícil su remoción.

En el caso del *Erythrina edulis* amarillo (figura 31), se muestra una curva de secado similar a la anterior, pero con una pérdida de agua más lenta, debido a que su contenido de humedad inicial era menor que el del morfotipo rojo, y su contenido de agua seguramente se encontraba formando interacciones con la matriz, también tomando en cuenta que este morfotipo posee más contenido de carbohidratos.

La velocidad de pérdida de agua se ve afectada por la composición química de las muestras y por la morfología del tejido celular, además de la superficie de contacto de la muestra con el aire caliente del deshidratador.

Luego de conocer el patrón de pérdida de agua de los granos escaldos de cada morfotipo, se procedió al deshidratar el resto para elaborar las harinas como tal. Aunque, según la curva de secado, la humedad se ve reducida casi completamente a las 7 horas, se decidió dejarlas por 24 horas para asegurar un mayor secado; sin embargo, si se tratara de producción de harina a escala industrial, donde el tiempo juega un factor muy importante en la eficiencia del proceso, sí sería necesario dejarlo durante 7 horas o buscar otro equipo de deshidratación que disminuya el tiempo de secado.

Una vez deshidratados los granos, se determinó el peso recuperado luego de la pérdida de humedad para conocer el rendimiento obtenido (Tabla 8):

Tabla 8. Cálculo del rendimiento del proceso de deshidratación.

<b><i>Erythrina edulis</i></b>	<b>Peso granos frescos (g)</b>	<b>Peso granos deshidratados</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Rojo	3700 ± 50a	485,0 ± 0,1a	13,1a
Amarillo	2500 ± 50b	537,6 ± 0,1b	21,5b

Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Posteriormente se procedió a moler y tamizar. La granulometría del producto de la molienda se determinó haciendo pasar las harinas por distintos tamices. El resultado se muestra en la siguiente tabla (Tabla 9):

Tabla 9. Granulometría de las harinas de *Erythrina edulis*.

<b>Mesh</b>	<b>≥30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>&lt;60</b>
<b>Tamaño de partícula (µm)</b>	≥595	420	297	250	<250
<b>Rojo</b>	17%	13,80%	16,65%	8,90%	43,60%
<b>Amarillo</b>	15,27%	13,50%	15,72%	8,90%	46,60%

La tabla 9 muestra que no hay diferencia significativa entre las granulometrías de ambas harinas. El mayor porcentaje se obtiene con tamaños de partícula menor a 250 µm. Se decidió entonces tomar la harina tamizada por la malla de 60 mesh y <60; esto no solamente permite un mayor porcentaje de recuperación de la harina, sino que también al momento de su utilización y su análisis es más ventajosa debido a que existe una mayor superficie de contacto con los solventes y reactivos. Además, en el caso de que se buscara la comercialización de esta harina, mientras más fina sea, más atractiva resultaría al consumidor.

El rendimiento global del proceso (Tabla 10), que va desde la reducción de tamaño hasta la molienda, sería considerado tomando en cuenta que sólo se le dió uso a la harina tamizada a 60 mesh y menor a este tamaño de partícula, por la razones citadas en el párrafo anterior. Siendo así, el rendimiento obtenido fue el siguiente:

Tabla 10. Rendimiento global del proceso de elaboración de harinas.

<b><i>Erythrina edulis</i></b>	<b>Peso granos frescos (g)</b>	<b>Peso harina tamizada ≤60 mesh (g)</b>	<b>Rendimiento total(%)</b>
<b>Rojo</b>	3700 ± 50a	230,1 ± 0,1a	6,2a
<b>Amarillo</b>	2500 ± 50b	273,1 ± 0,1b	10,9b

Errores asociados a las balanzas. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Como se puede apreciar, el rendimiento fue bastante bajo, siendo menor en la harina de *Erythrina edulis* rojo y un poco mayor en el morfotipo amarillo. El bajo rendimiento se debe principalmente al contenido de humedad inicial de los granos frescos el cual, se verá más adelante, varía entre 70 y 80 %, por lo que al remover el agua se pierde una cantidad significativa de masa, además de las pérdidas que se pudieron suscitar sobre todo a la hora de la molienda.

### **5.3. Caracterización de las harinas de *Erythrina edulis*.**

#### **5.3.1. Análisis proximal de las harinas de *Erythrina edulis*.**

Los resultados obtenidos de los macronutrientes para las harinas de *Erythrina edulis* se muestran a continuación en la tabla 11:

Tabla 11. Valor nutricional de las harinas de *Erythrina edulis*.

<b>g/100g</b>	<b>Rojo</b>	<b>Amarillo</b>
<b>Humedad</b>	14,6 ± 0,2a	8,6 ± 0,2b
<b>Cenizas</b>	3,4 ± 0,1a	2,6 ± 0,2b
<b>Grasa cruda</b>	1,5 ± 0,1a	0,7 ± 0,1b
<b>Proteína cruda</b>	25,9 ± 0,3a	18,0 ± 0,1b
<b>Carbohidratos totales</b>	54,7 ± 0,6a	70,2 ± 0,4b
<b>Almidón</b>	42,5 ± 1,9a	45,7 ± 0,6b
<b>Calorías /100g</b>	335,2 ± 1,2	358,7 ± 0,8b

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la fila con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

La humedad de la harina del morfotipo rojo resultó significativamente mayor que la harina del morfotipo amarillo, esto puede ser consecuencia de que los granos rojos tenían un mayor contenido de humedad que las amarillas, y aunque ambas se dejaron un tiempo prolongado para asegurar una correcta deshidratación, puede que parte

del agua de los granos rojos sea agua fuertemente ligada la cual no es fácil remover a una temperatura de 45°C, además que la composición de su matriz es distinta al del morfotipo amarillo.

Los resultados de los demás macronutrientes fueron expresados en base seca y como se puede apreciar, los valores de ambos morfotipos oscilan entre lo esperado para una leguminosa, sin embargo, llama la atención que sí existen diferencias nutricionales significativas entre ambos morfotipos. El *Erythrina edulis* rojo aporta más cenizas, grasa cruda y proteínas que el morfotipo amarillo, mientras que la deficiencia de este último en estos macronutrientes se ve compensada por una mayor cantidad de carbohidratos y como se puede ver también el contenido de almidón del morfotipo amarillo es ligeramente mayor a la del morfotipo rojo, pero representa una diferencia significativa estadísticamente, igualmente el contenido calórico. Las calorías aportadas al consumir 100g de harinas de *E. edulis* cubren alrededor de 17% del valor total para una dieta recomendada de 2000 calorías.

Considerando que el morfotipo rojo es más rico nutricionalmente, es posible considerar que el morfotipo amarillo es producto de un alelo recesivo en la genética de la planta, esto puede además afectar la ruta fotosintética del árbol que provoque la disminución de las características de la planta y sus granos.

### 5.3.2. Análisis físicos.

#### 5.3.2.1. Colorimetría.

En las imágenes de las harinas obtenidas en la sección anterior, es notable la diferencia de color entre ambas dependiendo del morfotipo. Empleando el colorímetro Hunterlab, estas diferencias se especifican de una manera más cuantitativa mediante los resultados mostrados a continuación (tabla 12):

Tabla 12. Parámetros colorimétricos de las harinas de *Erythrina edulis*:

<i>Erythrina edulis</i>	L*	a*	b*
<b>Rojo</b>	71,08 ± 0,01a	0,46 ± 0,02a	7,82 ± 0,04a
<b>Amarillo</b>	81,65 ± 0,00b	1,73 ± 0,02b	13,39 ± 0,01b

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Como se puede notar en la Tabla 12., la harina resultante del *Erythrina edulis* amarillo tiene una luminosidad (\*L) significativamente mayor que la del rojo, además de tener

valores más positivos hacia la tonalidad roja ( $a^*$ ) y amarilla ( $b^*$ ) que la harina de *E. edulis* rojo (Figura 33) Para ilustrar mejor los resultados, se muestra la siguiente imagen (Figura 32), donde 1 es la harina de *E. edulis* rojo y 2 amarillo

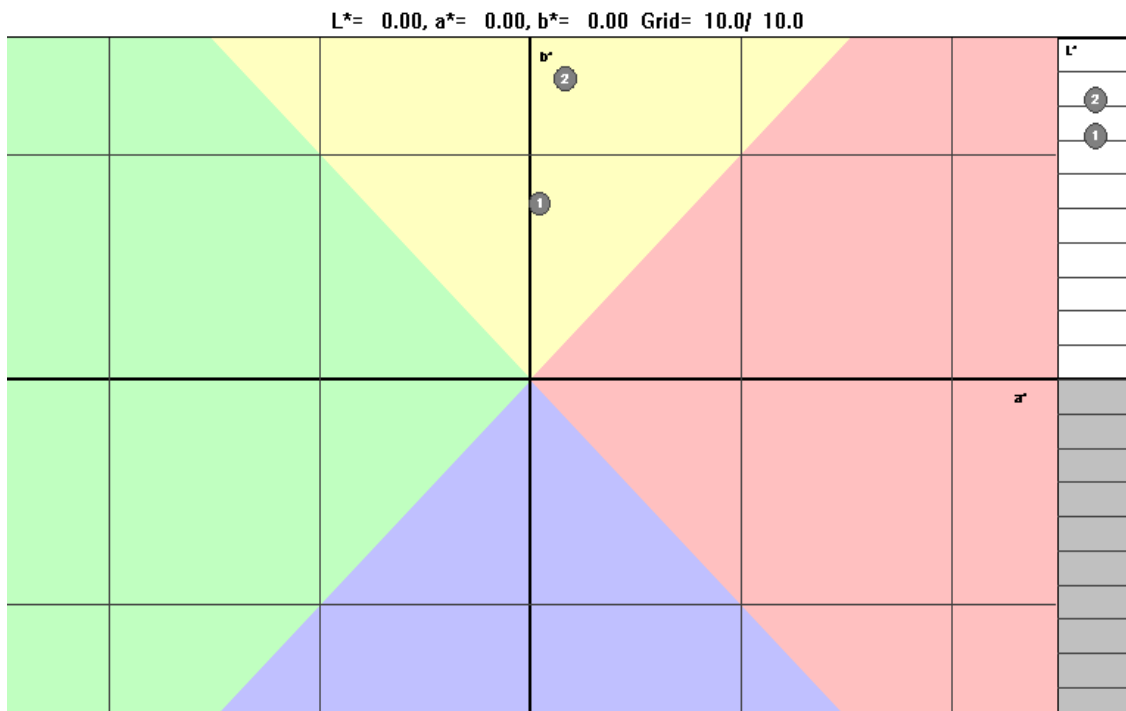


Figura 32. Plano colorimétrico de las harinas de *Erythrina edulis*.

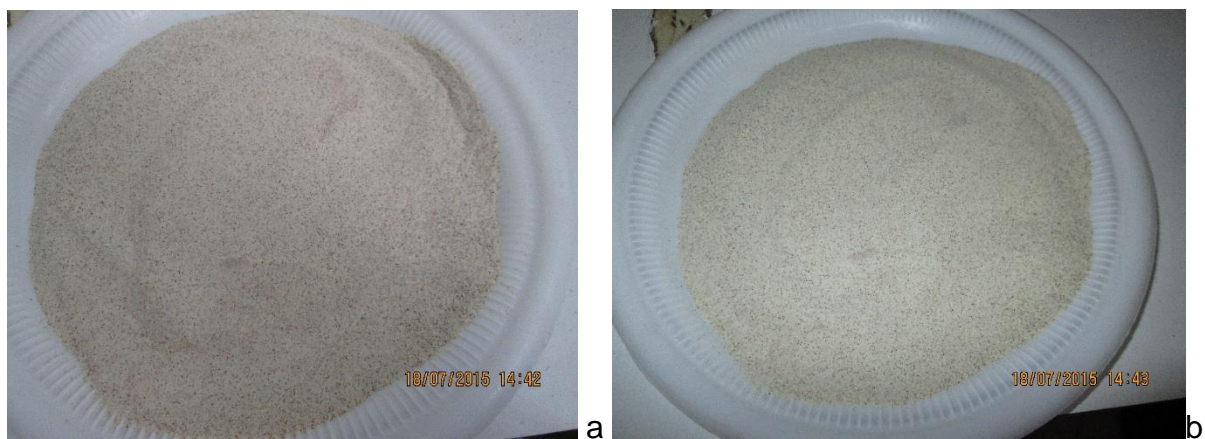


Figura 33. a. Harina de *Erythrina edulis* rojo; b. Harina de *Erythrina edulis* amarillo

### 5.3.2.2. Actividad de agua.

Los resultados obtenidos para la actividad de agua de las harinas se muestran en la tabla 13:

Tabla 13. Actividad de agua de las harinas de *Erythrina edulis*:

<b><i>Erythrina edulis</i></b>	<b><math>a_w</math></b>
<b>Rojo</b>	0,47 ± 0,04a
<b>Amarillo</b>	0,42 ± 0,01a

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Una actividad con estos valores, para harinas, se encuentra entre los límites deseados, ya que es lo suficientemente baja como para evitar que ocurran reacciones indeseadas.

La actividad de agua está directamente relacionada con el contenido de humedad del alimento, por lo que es de esperarse que la  $a_w$  de la harina *Erythrina edulis* rojo sea ligeramente mayor a la del amarillo, sin embargo no hay diferencias significativas.

Es muy importante conocer la actividad de agua de un alimento debido a que esto brinda un indicio de qué tan estable puede ser este a lo largo del tiempo, ya que, dependiendo de la matriz del alimento, pueden ocurrir reacciones de oxidación de lípidos, pardeamiento no enzimático, fermentación, proliferación de microorganismos.<sup>[46]</sup>

### 5.3.3. Análisis fisicoquímicos.

La acidez titulable fue expresada en base a ácido sulfúrico ya que no se conoce el ácido orgánico en mayor proporción responsable de la acidez de esta leguminosa. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 14. pH y acidez titulable de harinas de morfotipos de *Erythrina edulis*.

<b><i>Erythrina edulis</i></b>	<b>pH</b>	<b>Acidez titulable (%)</b>
<b>Rojo</b>	6,75 ± 0,07a	0,076 ± 0,006a
<b>Amarillo</b>	6,77 ± 0,04a	0,047 ± 0,005b

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Como se puede ver en tabla 14, no hay diferencias significativas entre el pH de ambos morfotipos, siendo éste en general ligeramente ácido pero muy cercano a la neutralidad. La acidez titulable es bastante baja, sin embargo se evidencia una diferencia significativa entre ambos morfotipos, siendo mayor la del *Erythrina edulis* rojo. Los factores que pueden incidir en la acidez son los ácidos orgánicos libres, los



ácidos grasos, los fenoles y los restos de aminoácidos con cadena lateral ácida, además se debe recordar que el contenido de grasa cruda del morfotipo rojo es mayor que el del morfotipo amarillo.

#### **5.4. Elaboración de harina proteica de *Erythrina edulis*.**

Como se dijo anteriormente, las proteínas se extrajeron una mezcla 50:50 de las harinas de morfotipo rojo y amarillo, esto debido a la poca disponibilidad de materia prima (harinas). Para poder evaluar el rendimiento de la extracción de las proteínas, fue necesario conocer el contenido proteico real de la mezcla de estas harinas. En la tabla 15 se muestran los resultados de humedad y proteína de la mezcla de harinas que se empleó como materia prima:

Tabla 15. Contenido de humedad y proteína en la mezcla 50:50 de harinas de morfotipos de *Erythrina edulis*:

<b>g/100g</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteína (b.s)</b>
<b>Mezcla de harinas</b>	9,98 ± 0,06	21,46 ± 0,11

*Valores promedio ± desviación estándar, n=3*

Como era de esperarse, la cantidad de proteína cuantificada por Kjeldahl arrojó un resultado igual al teórico calculado por balance de masas, por lo que se puede asumir que sucederá lo mismo con el resto de los nutrientes.

Se procedió a evaluar entonces el pH óptimo de extracción, con una relación harina:solvente de 1:20 y un tiempo de 24h para posteriormente centrifugar y precipitar la proteína a un pH genérico de 3, obteniendo los siguientes resultados según el método de Lowry para proteínas, ilustrados en la siguiente gráfica (Figura 34):

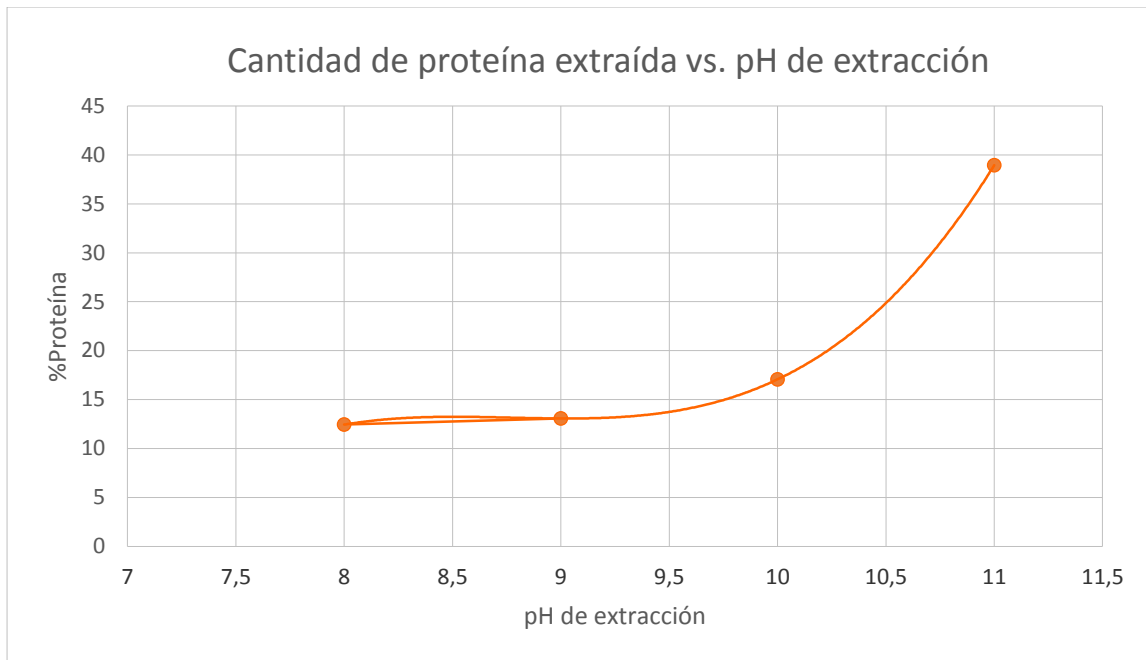


Figura 34. Estandarización del pH óptimo de extracción de las proteínas de *Erythrina edulis*.

El método mostró diferencias significativas entre la proteína extraída en cada pH y a pesar de que éstos valores no fueron muy elevados, tomando en cuenta que pH 3 no es el punto isoeléctrico de la proteína, la gráfica de la figura 34 denota que a pH 11 se realiza la mayor extracción, por lo que ese fue el pH empleado en el siguiente análisis donde se determinó el punto isoeléctrico de la proteína (Figura 35):

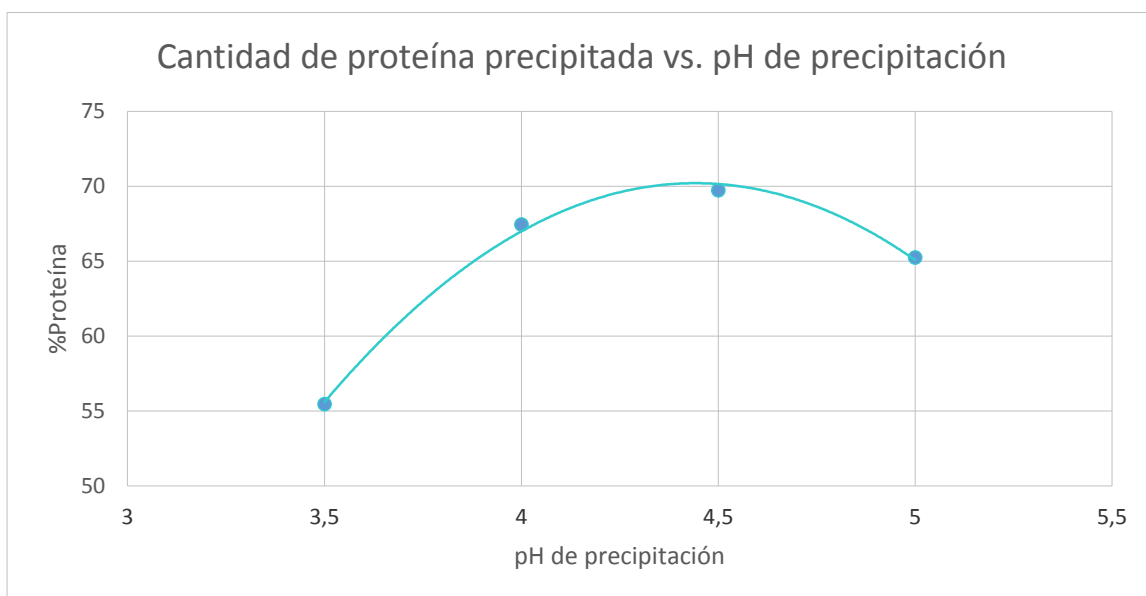


Figura 35. Estandarización del punto isoeléctrico de la proteína de *Erythrina edulis*.

El método de Martínez y Añón <sup>[36]</sup>, propone una evaluación del punto isoeléctrico entre los pH 3 y 7 con intervalos de unidad, sin embargo, en este estudio se decidió disminuir el intervalo de evaluación por varios motivos: en primer lugar, según las observaciones experimentales, los pH donde se observó mayor precipitado fue entre 4 y 5, siendo este el intervalo reportado por la bibliografía para leguminosas. En segundo lugar, esto permitió que se estudiaran valores de pH más precisos, ya que pequeñas variaciones en éste pueden alterar el punto isoeléctrico, es decir, puede que el pI no sea un número entero.

Como se puede apreciar en la figura 35, el pH al cual precipitó mayor cantidad de proteína fue a pH 4,5, tomando este pH como punto isoeléctrico, lo cual concuerda con estudios realizados por Fan y Sosulski. (1974), en los cuales se empleó un pH de precipitación de 4,5 para elaborar aislados proteicos de once leguminosas, obteniendo resultados bastante satisfactorios. <sup>[47]</sup>.

Debido a que el tiempo de extracción de 24 horas implica un alto consumo de tiempo y a pH alcalino pueden ocurrir reacciones de hidrólisis y solubilización de compuestos que podrían disminuir el rendimiento del contenido proteico, se decidió experimentar un tiempo de extracción de 1 hora, bajo las mismas condiciones, obteniendo los siguientes resultados ilustrados en la siguiente gráfica (Figura 36):

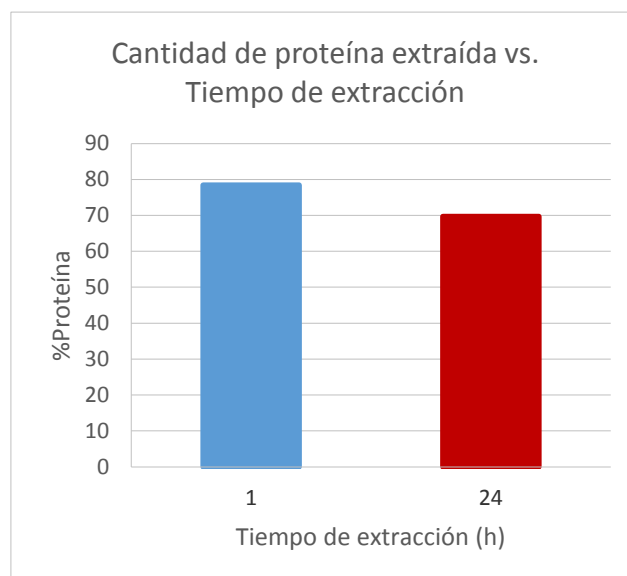


Figura 36. Comparación de proteína extraída a 1 hora y 24 horas.

Como se puede apreciar en la gráfica (figura 36), el contenido proteico obtenido con una extracción de 1 hora es significativamente mayor al obtenido con 24 horas (tomando dos réplicas para cada caso), siendo estos 78,42 % y 68,71% respectivamente, por lo que se planteó elaborar el producto final bajo las condiciones de relación harina solvente 1:20, tiempo de extracción 1 hora, pH de extracción 11 y pl 4,5 a temperatura ambiente, ya que esto implica un ahorro de tiempo y mejora del rendimiento del extracto proteico.

## **5.5. Caracterización de la harina proteica de *Erythrina edulis*.**

### **5.5.1. Análisis proximal de la harina proteica.**

La cantidad de producto final obtenido fue de 3,2 gramos, extraídos de 200 gramos de mezcla de harinas. Como se puede notar, el rendimiento es bajo (1,6%), sin embargo para productos proteicos, incluso de origen animal, como es el caso del aislado de suero de leche, se obtienen rendimientos alrededor de 3%. Debido a la poca disponibilidad de producto final, algunos análisis se vieron afectados. Los resultados obtenidos de los análisis para la harina proteica fueron los siguientes (Tabla 16):

Tabla 16. Macronutrientes presentes en la harina proteica de *Erythrina edulis*:

	<b>g/100g</b>
<b>Humedad</b>	9,83 ± 0,07
<b>Cenizas</b>	8,03 ± 0,65
<b>Grasa cruda</b>	N.D
<b>Proteína cruda</b>	51,97 ± 0,02
<b>Carbohidratos totales</b>	N.D

Valores promedio ± desviación estándar, n=3; N.D: no determinado.

La grasa cruda no fue determinada ya que no se consideró que el producto tuviese una cantidad significativa de lípidos debido a que la materia prima también era escasa en este macronutriente, además no se contaba con la cantidad de producto suficiente como para aplicar alguno de los métodos específicos para determinar grasas. Igualmente, no se puede asumir que la harina proteica tuviese cero contenido de grasa, lo que deriva en que no se puede hacer el cálculo de los carbohidratos totales.

En cuanto a la proteína, a pesar de que el contenido proteico de los extractos obtenidos en la estandarización, cuantificados por el método de Lowry, arrojan resultados de alrededor de 80% de proteína - lo que clasificaría al producto final como un concentrado proteico - luego de realizar el producto a macroescala y obtener cantidad suficiente para emplear el método de Kjeldahl para su caracterización tal como lo norma la AOAC, se obtuvieron resultados significativamente distintos (Tabla 17):

Tabla 17. Comparación de métodos Lowry y Kjeldahl en la cuantificación de la proteína de extracto proteico de *Erythrina edulis*.

Método	%Proteína (b.s)	Lowry/Kjeldahl
Lowry	86,95 ± 2,83a	1,7
Kjeldahl	51,97 ± 0,01b	

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Indiscutiblemente existen diferencias muy significativas (casi el doble) en la cuantificación de la proteína, tomando como verdadero el resultado el arrojado por el método de Kjeldahl el cual se basa en la cuantificación del nitrógeno total, mientras que el método de Lowry por ser un método colorimétrico está sujeto a muchas interferencias <sup>[37]</sup>. En este caso en particular, lo que pudo afectar los resultados es el contenido de polifenoles en el producto final, ya que el reactivo de Folin- Ciocalteu empleado para el método de Lowry es empleado por sí solo para cuantificación de polifenoles, lo que quiere decir que la más mínima cantidad de estos que se pudieran encontrar en el producto, se verían oxidados por el reactivo de Folin, dando una coloración azul y así afectando el resultado, dando un error por exceso.

Un contenido de proteínas de 52% posiciona el producto final en la categoría de harinas proteicas según el Codex alimentarius <sup>[33]</sup>, y este valor es, sin embargo, un resultado satisfactorio ya que se logró aumentar en más del doble el contenido proteico de la mezcla de harina inicial, y si bien es cierto que ahora el producto final involucra otros compuestos aparte de las proteínas, esto podría traer igualmente beneficios nutricionales y funcionales, como se citó anteriormente. Bahnssey y col., obtuvieron resultados similares a estos (46-55% de proteína) para lentejas y caraotas, empleando las mismas condiciones de extracción y precipitación. <sup>[48]</sup>

Con el fin de determinar el punto crítico del proceso, el cual pudo haber sido responsable de obtener la harina proteica y no el aislado proteico, se decidió determinar si en el sobrenadante remanente luego del ajuste del punto isoeléctrico, había presencia de proteínas. De esta manera se sabría si fue el pH de extracción lo que resultó ineficiente, dejando las proteínas en la harina ó si fue el pH isoeléctrico. Siendo así, se analizaron tres alícuotas de 20mL del sobrenadante y el resultado obtenido fue positivo, arrojando una concentración de proteína de 2,5g/L, tomando en cuenta que se dispersaron 200g de harina en 4L de solución alcalina, se puede decir que en esos 4L quedaron en suspensión 10g de proteínas, lo cual representa casi  $\frac{1}{4}$  de las proteínas presentes en los 200g de mezcla de harina (42g de proteína). De este análisis se puede concluir que si bien 10g apenas es  $\frac{1}{4}$  de la proteína total, si hubiesen precipitado en su totalidad se hubiese obtenido un rendimiento más alto de producto final, y si hubiesen precipitado selectivamente quizá se hubiese logrado un aislado proteico. Sin embargo debido a la complejidad de la matriz estas proteínas siempre se encuentran formando fuertes interacciones con los demás componentes de la muestra. Por lo que se puede decir que el punto crítico del proceso fue el punto isoeléctrico, a pesar de autores reportan que la extracción alcalina y precipitación entre pH 4 y 5 se emplea regularmente para precipitar las proteínas de la soya y colza en la elaboración de aislados proteicos [28],[49], además la bibliografía también reporta que los pH de precipitación para albuminas y globulinas (fracciones proteicas mayoritarias en leguminosas) están entre pH 4 y 5.

Por otra parte, debido a los valores obtenidos en la estandarización, no hay nada que pueda asegurar que con cualquier otro pH se hubiese obtenido una precipitación total, siendo así, lo que puede resultar ineficiente es emplear el método de precipitación isoeléctrica para la obtención del producto proteico, quizás utilizar membranas de ultrafiltración pudo haber arrojado mejores resultados, pero no se disponía de estas. Otro factor que pudo afectar en la precipitación de las proteínas fue la temperatura del proceso; Martínez y Añón y Pablo Rodríguez elaboraron aislados proteicos de amaranto y reportan haber realizado el proceso de centrifugación a una temperatura de 4°C [36] [50], lo cual es lógico ya que las proteínas, al igual que otros compuestos aumentan su solubilidad cuando la temperatura varía de 0 a 40-50°C [28]. La temperatura a la que se realizó la precipitación en este caso fue de 25°C, si se hubiese trabajado a 4°C es muy probable que se hubiese favorecido la precipitación.

## 5.5.2. Análisis físicos de la harina proteica.

### 5.5.2.1. Color.

El color del producto final obtenido fue de color pardo (Figura 35), lo que sugiere también la presencia de polifenoles.



Figura 37. Harina proteica de *Erythrina edulis*.

Sus parámetros colorimétricos fueron medidos al igual que se hizo con las harinas de *Erythrina edulis*:

Tabla 18. Parámetros colorimétricos de la harina proteica de *Erythrina edulis*.

<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
28,45 ± 0,03	12,24 ± 0,03	10,06 ± 0,03

Valores promedio ± desviación estándar

Como se puede apreciar (Tabla 18), la luminosidad (L\*) es baja, por lo que el producto es notablemente oscuro y su tonalidad tiende hacia el rojo y amarillo. Esto se puede observar mejor en el plano colorimétrico (Figura 36):

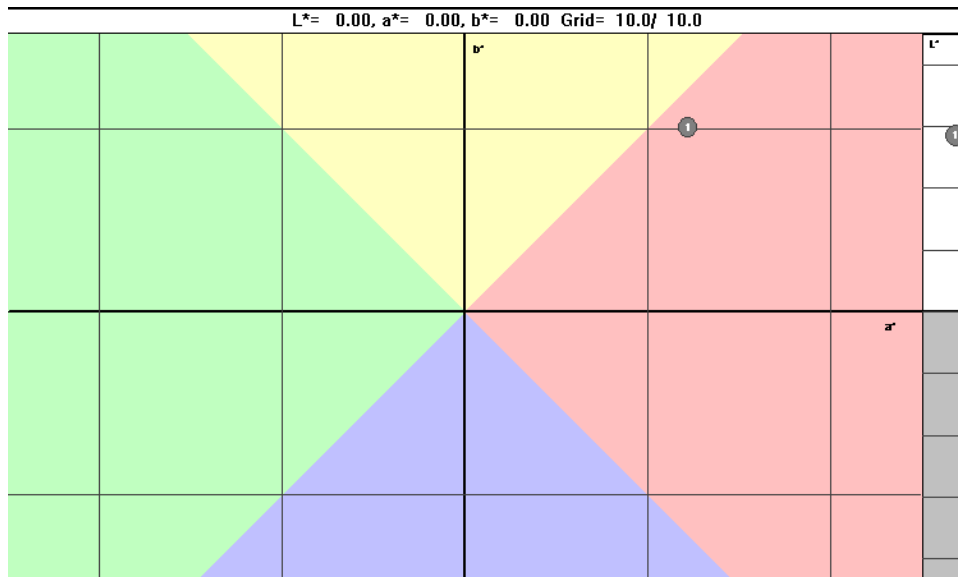


Figura 38. Plano colorimétrico de la harina proteica.

#### 5.5.2.2. Actividad de Agua.

El contenido de humedad de la harina proteica oscila alrededor de 10%, sin embargo, se encontraron valores de actividad de agua bastante bajos de  $0,154 \pm 0,004$ , en comparación a las harinas de *Erythrina edulis*. Recordando que la actividad de agua representa el agua disponible para el desarrollo de reacciones y microorganismos, puede ser que a pesar de tener un 10% de humedad, esta agua presente no se encuentre de forma libre sino más bien ligada a la proteína, la cual se encuentra en mayor cantidad que en las otras harinas, por lo se debe tomar en cuenta que las proteínas se caracterizan por su capacidad de absorción y retención de agua.

#### **5.6. Determinación de la concentración de polifenoles en las harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y en la harina proteica.**

Debido a la discrepancia entre el método de Lowry y el de Kjeldahl, se procedió a determinar la concentración de polifenoles en las harinas de ambos morfotipos de *Erythrina edulis* y en el producto final, de manera de certificar que la presencia de éstos sí interfirió con el método.



Tabla 19. Contenido de polifenoles totales en las harinas de *Erythrina edulis* y en la harina proteica:

Harina	Polifenoles totales (mgAc.Gal/gmuestra)
<b><i>E. edulis</i> Rojo</b>	2,70 ± 0,05a
<b><i>E. edulis</i> Amarillo</b>	1,97 ± 0,09b
<b>Harina proteica</b>	5,12 ± 0,26c

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Como se puede notar en la tabla 19, en las harinas de los morfotipos de *Erythrina edulis* la concentración de polifenoles es bastante baja, sin embargo, es significativamente mayor en la harina del morfotipo rojo que en la del morfotipo amarillo, esto es predecible ya que la intensidad del color del tegumento de granos de leguminosas va directamente ligada a su contenido de polifenoles. Considerando que se utilizó una mezcla 50:50 de cada harina, por balance de masas, es de esperarse que el contenido de polifenoles de la materia prima fuese aproximadamente 2,3mg/ gmuestra, sin embargo, es importante recalcar que el producto final tuviese más del doble de esa concentración, por lo que se puede inferir que estos polifenoles fueron extraídos junto con las proteínas, y no permanecieron en solución sino que precipitaron con estas al acidificar, lo cual puede deberse a las fuertes interacciones proteína-polifenol, lo que explica además el color pardo de la harina proteica. Los polifenoles en presencia de oxígeno, pueden oxidarse a las quinonas correspondientes. Algunas quinonas son capaces de polimerizarse por vía no enzimática en pigmentos pardos de elevada masa molar o bien reaccionar con ciertos residuos de aminoácidos como la lisina, cistina, metionina o el triptófano [21]. Una manera de reducir este efecto colateral sería remover el tegumento de los granos antes de elaborar las harinas, ya que los polifenoles en las leguminosas se encuentran principalmente en esta parte de la semilla, o lavar la harina con una mezcla etanol-agua previo a la extracción de las proteínas, de manera de remover la mayor cantidad de polifenoles.

### 5.7. Perfil de Aminoácidos de las harinas de los morfotipos de *Erythrina edulis* y de la harina proteica.

El valor biológico de una proteína depende de su perfil de aminoácidos y de su digestibilidad. A continuación se muestra el perfil de aminoácidos tanto de las harinas de los morfotipos de *Erythrina edulis* como de la harina proteica expresados en función de la proteína de cada muestra y en función de la muestra total (Figuras 39 y 40):

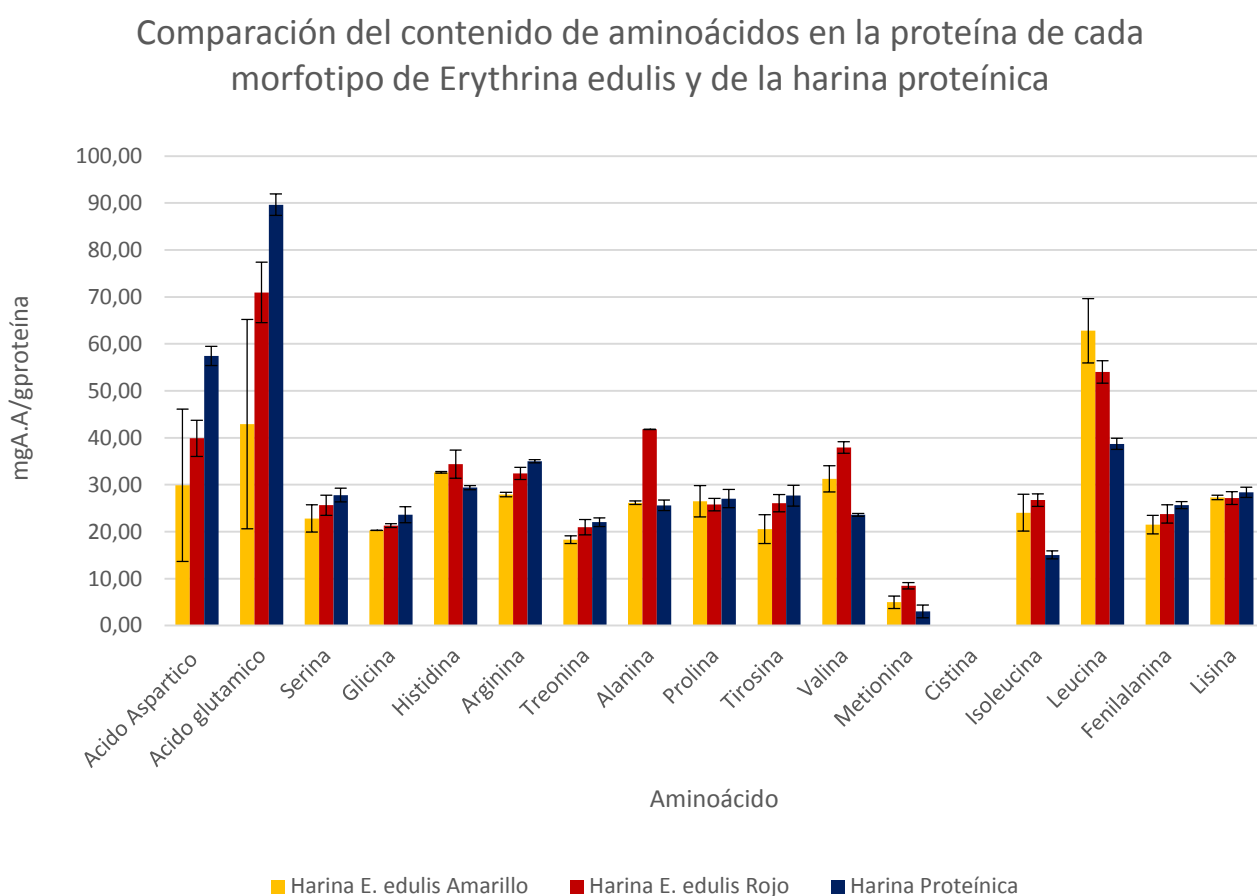


Figura 39. Comparación del contenido de aminoácidos por gramo de proteína de las harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y harina proteica.

### Comparación del contenido de aminoácidos en muestra total de harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y de harina proteica

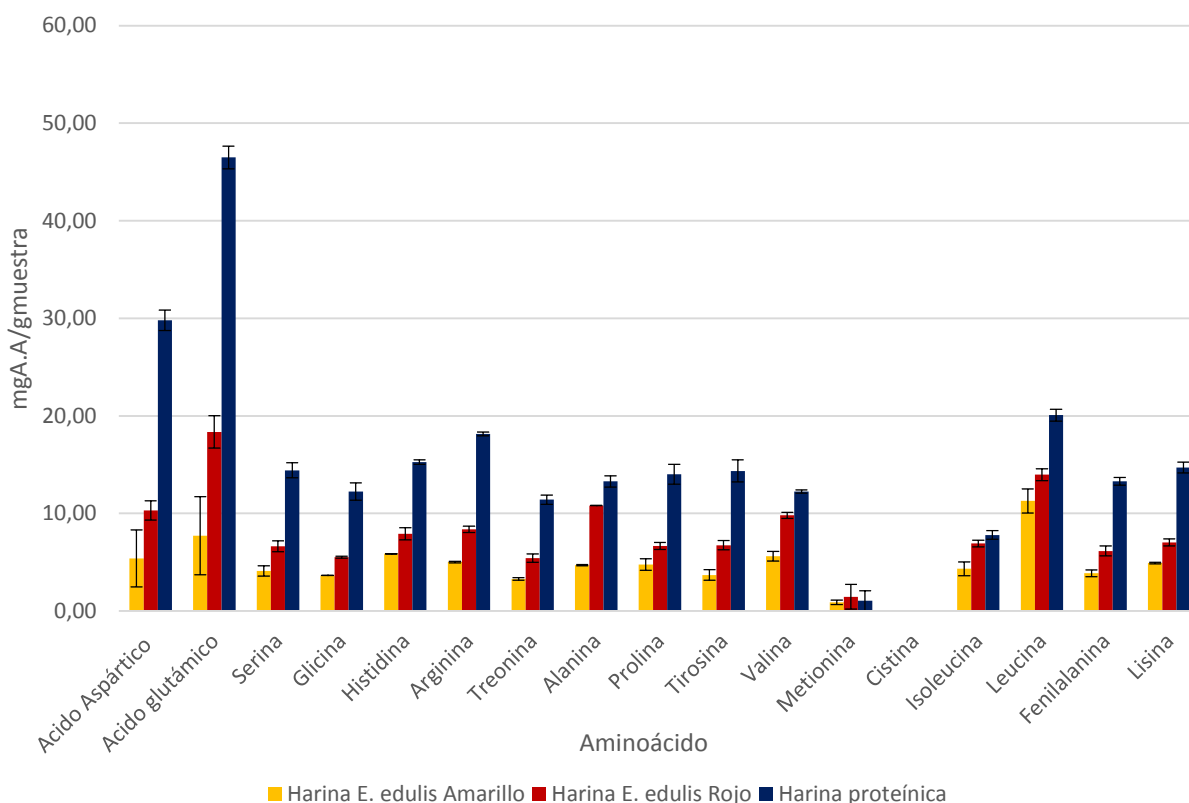


Figura 40. Comparación del contenido de aminoácidos por gramo de muestra total de las harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y harina proteica.

Comparando las harinas de ambos morfotipos, se puede decir que en líneas generales, en cuanto a los miligramos de aminoácidos por gramos de proteína (figura 39) la harina del morfotipo rojo tiene mayor contenido de todos los aminoácidos que la harina amarilla, exceptuando la leucina, la cual es mayor en la proteína de la harina del morfotipo amarillo. De la misma manera, comparando con la harina proteica, se pueden ver valores significativamente mayores de ácido aspártico y glutámico en el producto final, esto es bastante predecible debido a que la extracción se realizó en medio alcalino por lo que existen más probabilidades de solubilización de los residuos de aminoácidos ácidos, los cuales quedan cargados negativamente para luego ser precipitados. En cuanto al contenido de histidina, alanina y valina, este se ve superado por la harina de *Erythrina edulis* rojo.

Como se puede ver el triptófano no ha sido reportado debido a interferencias importantes en los cromatogramas de la muestra, en algunos casos el pico era muy pequeño y no estaba resuelto y en otras ocasiones no aparecía, lo que evitó su correcta cuantificación. Esto pudo deberse a la oxidación progresiva del anillo indol del triptófano en el medio alcalino tan fuerte de la hidrólisis, además es importante recordar que las leguminosas son fuente pobre de triptófano. También se puede observar que la cistina no se pudo cuantificar puesto que no apareció en los cromatogramas (Anexo VII, VII, IX), lo cual era perfectamente predecible ya que, por ser una leguminosa, su contenido de aminoácidos azufrados es muy escaso o nulo, por lo que igualmente, el contenido de metionina cuantificado es bajo, lo que además conlleva un error asociado muy grande ya que sus picos en el cromatograma no eran definidos.

Cuando un consumidor elige un producto, generalmente se basa en su contenido nutricional en la muestra total, en este sentido, se puede apreciar en la gráfica de la figura 40, como la harina proteica de *Erythrina edulis*, supera por mucho a las harinas nativas de los morfotipos en cuanto al perfil de aminoácidos debido a su mayor contenido proteico. Además es de especial importancia recalcar que el perfil de aminoácidos en muestra total de la harina como de *Erythrina edulis* rojo es mayor que en el amarillo.

### **5.8. Digestibilidad proteica in vitro de harina proteica de *Erythrina edulis*.**

Es siempre deseable que la absorción de los nutrientes consumidos en los alimentos sea de un 100%, sin embargo, nunca se llega a este valor. En el caso de las proteínas, ni siquiera las proteínas animales son absorbidas en su totalidad. Por su parte, las proteínas vegetales son más problemáticas al momento de digerir debido a los antinutrientes citados y explicados anteriormente. Al analizar la digestibilidad proteica *in vitro* del producto final, se encontró un resultado de  $(70,4 \pm 0,7)\%$ . Este valor es menor al reportado para las leguminosas crudas por Cabrejas y col.<sup>[22]</sup>, el cual se encuentra alrededor de 80%, sin embargo, un valor de 70% para un producto que contiene 52% de proteínas, es satisfactorio. Igualmente, este valor de digestibilidad puede ser atribuido al alto contenido de polifenoles que presentó la muestra y otros antinutrientes que pudieron ser extraídos.

La digestibilidad proteica *in vitro* según el método empleado (Hsu y col. 1977) tiene una correlación de 0,90 con la digestibilidad proteica *in vivo*, lo cual es bastante exacto. Basado en esto puede asumirse que si un ser humano o animal consume 100g de harina proteica, de los cuales 52g son proteínas, sólo aprovecharía 36g de estas, sin embargo, este valor de proteína es más de lo que pueden aportar las harinas de los morfotipos de *Erythrina edulis* y cualquier otra leguminosa después de ser digeridas.

Evaluando el perfil de aminoácidos desde un punto más nutricional, tomando en cuenta la digestibilidad proteica y sabiendo que los requerimientos diarios de proteínas y aminoácidos propuestos por la Organización Mundial de la salud son los siguientes:

Tabla 20. Requerimientos diarios de proteínas y aminoácidos reportados por OMS/FAO/ONU (2013) <sup>[51]</sup>

Edad (años)	Requerimiento proteína (g/kg/día)		Requerimientos de aminoácidos (mg/kg/día)								
	Mantenimiento	Crecimiento	His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Tre	Trp	Val
0.5	0,66	0,46	22	36	73	63	31	59	35	9,5	48
1-2	0,66	0,20	15	27	54	44	22	40	24	6	36
3-10	0,66	0,07	12	22	44	35	17	30	18	4,8	29
11-14	0,66	0,07	12	22	44	35	17	30	18	4,8	29
15-18	0,66	0,04	11	21	42	33	16	28	17	4,4	28
>18	0,66	0,00	10	20	39	30	15	25	15	4,0	26

SAA: aminoácidos sulfurados; AAA: aminoácidos aromáticos.

Se puede decir que si un bebe sano de 15 meses de edad, con un peso promedio de 11kg <sup>[52]</sup> con un requerimiento diario de proteína de 9,46g, consume 100g de harina proteica estaría sobrepasando su ingesta diaria recomendada de proteína, así como de los requerimientos diarios de histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina y valina (Tabla 21) sólo por la parte de aminoácidos esenciales, tomando en cuenta que el aporte en cuanto a aminoácidos azufrados y triptófano es bajo y se puede buscar otra fuente proteína para compensar este déficit, como por ejemplo los cereales.

Tabla 21. Requerimiento diario para un niño de 15 meses de 11kg de peso promedio.

<b>Aminoácido</b>	<b>Requerimiento diario (mg/día)<sup>1</sup></b>	<b>Aporte harina proteica</b>	<b>% de requerimientos</b>
<b>Histidina</b>	165	1525	<b>924</b>
<b>Isoleucina</b>	297	779	<b>262</b>
<b>Leucina</b>	594	2007	<b>338</b>
<b>Lisina</b>	484	1470	<b>304</b>
<b>Treonina</b>	264	1141	<b>432</b>
<b>Valina</b>	396	1223	<b>309</b>
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	649	5330	<b>821</b>

Igualmente se puede realizar el mismo análisis para un adulto sano, considerando que según estudios publicados por la revista Public Health <sup>[53]</sup>, en Latinoamérica el peso promedio de un adulto es 68kg, éste necesitaría 45g de proteína para cubrir su ingesta diaria, sin embargo como se mencionó anteriormente, 100g de harina proteica aportan 36g de proteína neta, sin embargo esto es un 80% del requerimiento diario. En cuanto a los aminoácidos, los requerimientos diarios cubiertos por consumir 100g de harina proteica se muestran en la tabla 22:

Tabla 22. Requerimiento diario para un adulto Latinoamericano de 68kg de peso promedio

<b>Aminoácido</b>	<b>Requerimiento diario (mg/día)<sup>1</sup></b>	<b>Aporte harina proteica (100g)</b>	<b>% de requerimientos</b>
<b>Histidina</b>	680	1525	<b>224</b>
<b>Isoleucina</b>	1360	779	<b>57</b>
<b>Leucina</b>	2652	2007	<b>76</b>
<b>Lisina</b>	2040	1470	<b>72</b>
<b>Treonina</b>	1020	1141	<b>112</b>
<b>Valina</b>	1768	1223	<b>69</b>
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	1020	5330	<b>523</b>

<sup>1</sup> Cálculo de los requerimientos de aminoácidos diarios:  $\left(\frac{mgAA}{(kg \times día)}\right) \times peso\ promedio\ del\ individuo\ (kg)$

Calculo de los mg de aminoácidos aportados por 100g de harina proteica:  $\frac{mgAA}{gmuestra} \times 100gmuestra$

Como se puede observar en la tabla 22, consumiendo 100g de harina proteica, un adulto promedio cubre en su totalidad los requerimientos de histidina, treonina y aminoácidos azufrado, mientras que el resto de los aminoácidos esenciales presentados en la tabla se ven cubierto en más del 50%.

## 6. Conclusiones

1. Se encontraron dos morfotipos de *Erythrina edulis*: uno de granos rojos y otro de granos amarillos, cuyas harinas se elaboraron por separado obteniendo un bajo rendimiento en proceso debido al alto contenido de humedad en los granos frescos.
2. La harina obtenida con el morfotipo rojo mostró un aporte nutricional (para todos los perfiles evaluados incluyendo aminoácidos) superior al amarillo, lo que es indicio de que el morfotipo amarillo podría ser una degeneración de la variedad debido a factores que no se han considerado en este estudio.
3. La extracción alcalina de las proteínas de la mezcla de harinas de ambos morfotipos de *Erythrina edulis* mostró mayor eficiencia a pH 11, con el cual se logró extraer una cuarta parte de la proteína total presente en la mezcla.
4. El punto isoeléctrico indicó que el pH óptimo de precipitación de la proteína de *Erythrina edulis* es de 4,5; obteniéndose así un producto final de 52% de proteína, lo que de acuerdo al Codex Alimentarius, se clasifica como una harina proteica.
6. La harina proteica obtenida mostró un perfil de aminoácidos variado, habiendo la presencia de importantes contenidos de aminoácidos esenciales (exceptuando el triptófano), asimismo esta proteína mostró una digestibilidad de 70%, lo que pone de manifiesto que esta proteína vegetal es de alto valor biológico y que por tanto es factible sugerir su uso para consumidores tradicionales y también para consumidores con regímenes especiales de alimentación, como es el caso de vegetarianos estrictos.



## 7. Recomendaciones

Basado en la experiencia del presente trabajo y tomando en cuenta que los trabajos de investigación sobre el *Erythrina edulis* apenas comienzan, hay una serie de recomendaciones que se sugiere tomar en cuenta para estudios futuros de la proteína de esta leguminosa:

1. El rendimiento de la obtención de la harina de esta leguminosa es muy bajo, lo cual es normal debido a su alto contenido de humedad, por lo que se recomienda trabajar con cantidades muy grandes (>30kg de frutos) para obtener suficiente harina para realizar todos los análisis y en especial para poder obtener más cantidad de extracto proteico.
2. Si se desea obtener un aislado proteico de 90% de proteínas, es recomendable: remover el tegumento que recubre los granos antes de elaborar la harina, este es alto en polifenoles, los cuales interactúan fuertemente con la proteína e impide su aislamiento eficiente.
3. Además, la solubilidad de las proteínas también depende de la temperatura, por lo que se recomienda la extracción alcalina a temperatura ambiente. Por su parte, si se debe emplear la precipitación por punto isoeléctrico, realizar este paso en frío, sin embargo sería más conveniente emplear membranas de ultrafiltración de manera de recuperar toda la proteína que se encuentra en suspensión.
4. Se sugiere en trabajos posteriores estudiar las propiedades funcionales de las proteínas de manera de determinar específicamente para que tipo de formulaciones de productos es conveniente emplearlas.

## 8. Referencias bibliográficas

1. Inicirte I, Pérez A. Presencia del chachafruto (*Erythrina edulis* Triana Ex Micheli) en el estado Mérida, Venezuela. [Online]. [consultado el 15 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://convite.cenditel.gob.ve/files/2015/RevistaCLIC09-10.pdf>.
2. Agudelo R, Méndez L. Estudio sobre el uso del chachafruto (*Erythrina edulis*) en la elaboración de arepas. [Online].; 2006 [Consultado el 13 de octubre de 2015]. Disponible en:  
[http://www.slan.org.ve/publicaciones/congreso/uso\\_chachafruto\\_arepas.asp](http://www.slan.org.ve/publicaciones/congreso/uso_chachafruto_arepas.asp)].
3. Hernández J, Castillo M. Efecto de la harina de chachafruto (*Erythrina edulis* Triana Ex Micheli) como suplemento en la alimentación de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Revista de Agricultura Andina. 2010; 18: p. 12-24.
4. Barrera N. Chachafruto: Pasado, Presente y Futuro. 3rd ed. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1994.
5. Acero L. Guía para el aprovechamiento del Chachafruto o Balú. Colección Ciencia y Tecnología. ; 105.
6. Chachafruto: un racimo de nutrientes para beneficio colectivo [Online]. [Consultado el 10 de enero de 2015]. Disponible en <http://bitacora.ivic.gob.ve/?p=9507>.
7. Fuente propia. D'Amore Carla
8. Pérez G. Evaluation of protein quality of *Erythrina edulis*. Archivos Latinoamericanos de nutrición. 1979; 29(2): p. 193-207.
9. Arango O. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de Chachafruto (*Erythrina edulis*). Revista Universidad y Salud. 2012; 14: p. 161-167.
10. Isasa MET, Marqués CD. Legumbres. In Santos Dd, editor. Tratado de Nutrición. Madrid; 1999. p. 425-430.
11. Tharanathan RS, Mahavedamma S. Grain legumes: a boom in human nutrition. Trends in Food Science and Technology. 2003; 14: p. 507-518.
12. RCSB Protein Data Bank. [Online]. [Consultado el 30 de junio de 2015]. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/secondary.do?p=v2/secondary/visualize.jsp#Jmol>.

13. Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*. 2010; 43: p. 414-431.
14. Schuster-Gajzágó. Nutritional aspects of legumes, cultivated plants, primarily as food sources. [Online]. [Consultado el 10 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/e5-02-02.pdf>.
15. Ermetice G. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*. 2006 Enero; 94(3): p. 327-330.
16. Kozłowska H. Carbohydrates in grain legume seeds. [Online]. [consultado el 11 de marzo de 2016. Disponible en: [books.google.co.ve](https://books.google.co.ve).
17. Pattee HE, Salunkhe DK. Legume lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1983; 17(2): p. 97-139.
18. Kwolek I, Wolff W. Lipids of the leguminosae. In *Chemotaxonomy of the leguminosae*. E.E.U.U; s.f.
19. Deshpande SS, col. Effects of the dehulling on phytic acid, polyphenols, and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Food Science*. 1982; 47: p. 1846-1850.
20. Coulibaly A, Kouakou B, Chen J. Phytic acid in cereal grains: structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*. 2011; 1: p. 1-22.
21. Lupano E. Modificaciones de componentes en los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. 1ra edición. La Plata; 2013.
22. Martín-Cabrejas y col. The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*. 2009; 114: p. 1063-1068.
23. Elkowicz K, Sosulski FW. Antinutritive factors in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. *Journal of Food Science*. 1982; 47: p. 1301-1304.

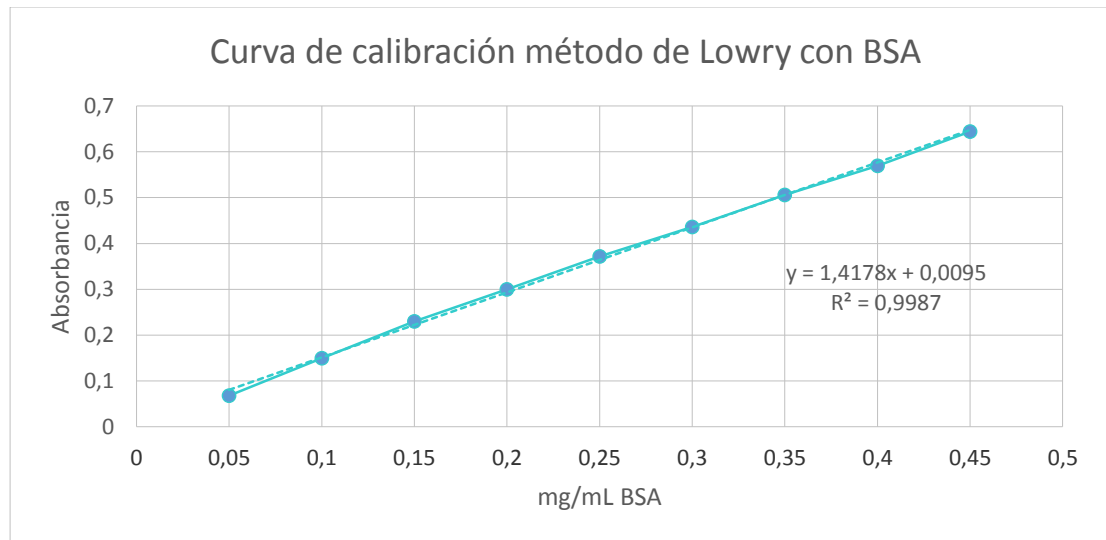
24. Nathan S, Halina L. Legume lectins- a large family of homologous proteins. The FASEB Journal. 1990; 4: p. 3198-3208.
25. Douglas y col.. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. Poultry Science. 1999; 78: p. 91-95.
26. Debenedetti, Silvia y Wilson, Erica. Farmacognosia. [Online] [Consultado el 24 de mayo de 2016. Disponible en:  
<http://repositorio.ub.edu.ar:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6138/4320%20-%20completo%20-%20%20Farmacognosia%20-%20debenedetti.pdf?sequence=1>]
27. Pino A y col. Ingesta de Alimentos de Origen Animal versus Origen Vegetal y Riesgo Cardio Vascular. Revista Chilena de Nutrición. 2009; 36(3): p. 210-216.
28. Cheftel JC y col. Proteínas Alimentarias. Edit. Acribia E. España; 1989.
29. Codex Alimentarius. Cereales, legumbres, leguminosas y productos proteínicos Vegetales. 2007.
30. Wright DJ, Bumstead MR. Legume proteins in food technology. Philosophical Transactions of The Royal Society, Biological Sciences. 1984; 304: p. 381-393.
31. Google Maps. [Consultado el 15 de abril de 2015. Disponible en:  
<https://www.google.co.ve/maps/@8.7130117,-71.5825797,7z?hl=en>]
32. Guzmán R. Tomada en mayo de 2015.
33. Official Methods of Analysis of AOAC International.. 18th ed.; 2005.
34. Schoch T. Non carbohydrate substance in starch. Journal of chemical society. 1942; 64(12): p. 2954-2956.
35. American Association of Cereal Chemists. 2003..
36. Martínez E, Añón M. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and colorimetric study. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1996; 44: p. 2523-2530.
37. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 1951; 193: p. 265-275.

38. O. Folin, V. Ciocalteu. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1927; 73: p. 627-550.
39. Valoración de proteínas por el método de Lowry [Online]. [Consultado el 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www2.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/practicas/Lowry.pdf> ]
40. Roffé C. Fraccionamiento y caracterización parcial, bioquímica y nutricional de las proteínas de *Phaseolus vulgaris*. Universidad Central de Venezuela, Escuela de Biología; 1983.
41. Mazza G y col.. Anthocyanins, phenolics and color of cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999; 47: p. 4009-4017.
42. Chiang B, Johnson J. Measurement of total and gelatinized starch by gluoalylase and o-toluidine reagent. *Cereal Chemistry*. 1977; 54(3): p. 429-435.
43. Biological Sugars and reactions [Online]. [Consultado el 14 de marzo de 2016. Disponible en: <http://cms.cerritos.edu/uploads/lwaldman/212Lecture/Notes/212LecNotes33Sbiocarb s.pdf>.
44. Heinrikson RL, Meredith SC. Aminoacid analysis by reverse-phase high-performance liquid cromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136(1): p. 65-74.
45. Hsu HW y col. A multienzimatic technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*. 1977; 42(5): p. 1269-1273.
46. Bello Gutierrez J. *Ciencia Bromatológica*. Edit. Díaz de Santos S.A. España: 2000 p. 47-54
47. Fan TY, Sosulski FW. Dispersibility and isolation of proteins from legume flours. *Journail of Canadian Institute of Science and technology Aliment*. 1974; 7(4): p. 256-259.
48. Bahnassey Y, Khan K, Harrold R. Fortification of spaghetti with edible legumes. *Cereal Chemistry*. 1986; 63(3): p. 210-215.

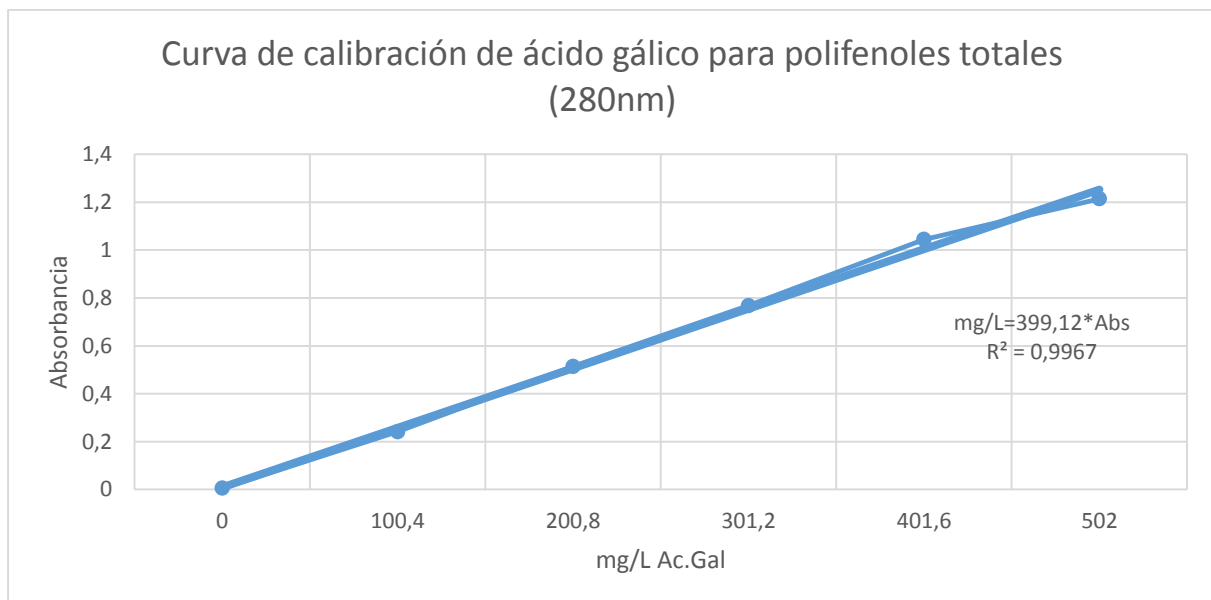
49. Gonçalves y Vioque. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y aceites*. 2001; 52(2): p. 127-131.
50. Rodríguez P. Obtención de un aislado proteico de Amarantho (*Amaranthus spp.*) y Harina de Plátano (*Musa sp.*) para la elaboración de una mezcla deshidratada para bebidas instantáneas. Caracas: Universidad Central de Venezuela, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2010.
51. FAO. Dietary protein quality in human nutrition. Roma. 2013..
52. Health Children[Online]. [Consultada el 29 de marzo de 2016. Disponible en: (<https://www.healthychildren.org/English/ages-stages/toddler/Pages/Physical-Appearance-and-Growth-Your-1-Year-Old.aspx>),]
53. Walpole , col. The weight of nations: an estimationg of adult human biomass. *BMC Public Health*. 2012;: p. 12-439.

## 9. Anexos

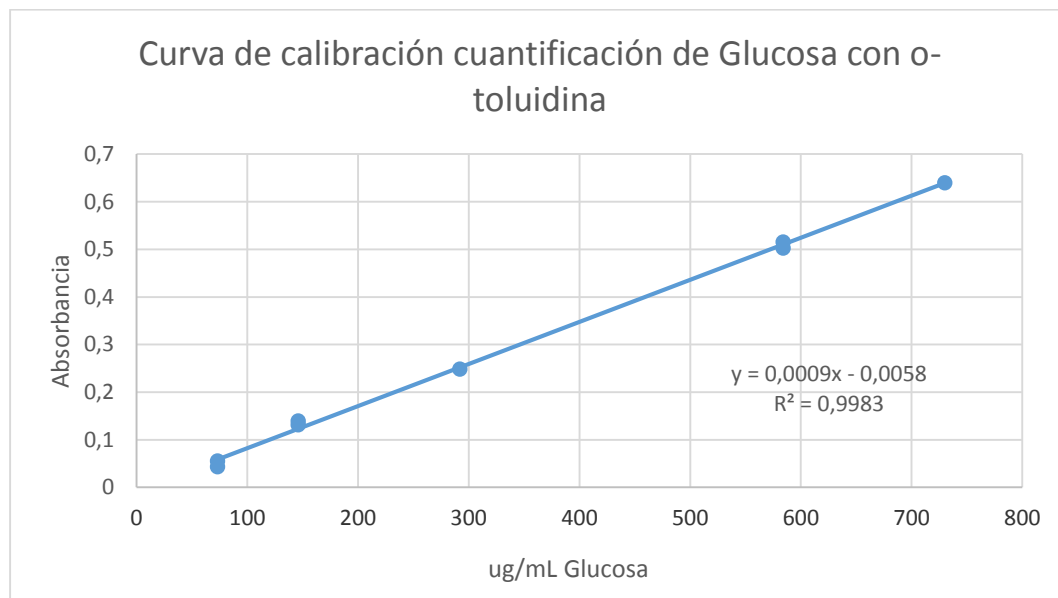
### I. Curva de calibración método de Lowry



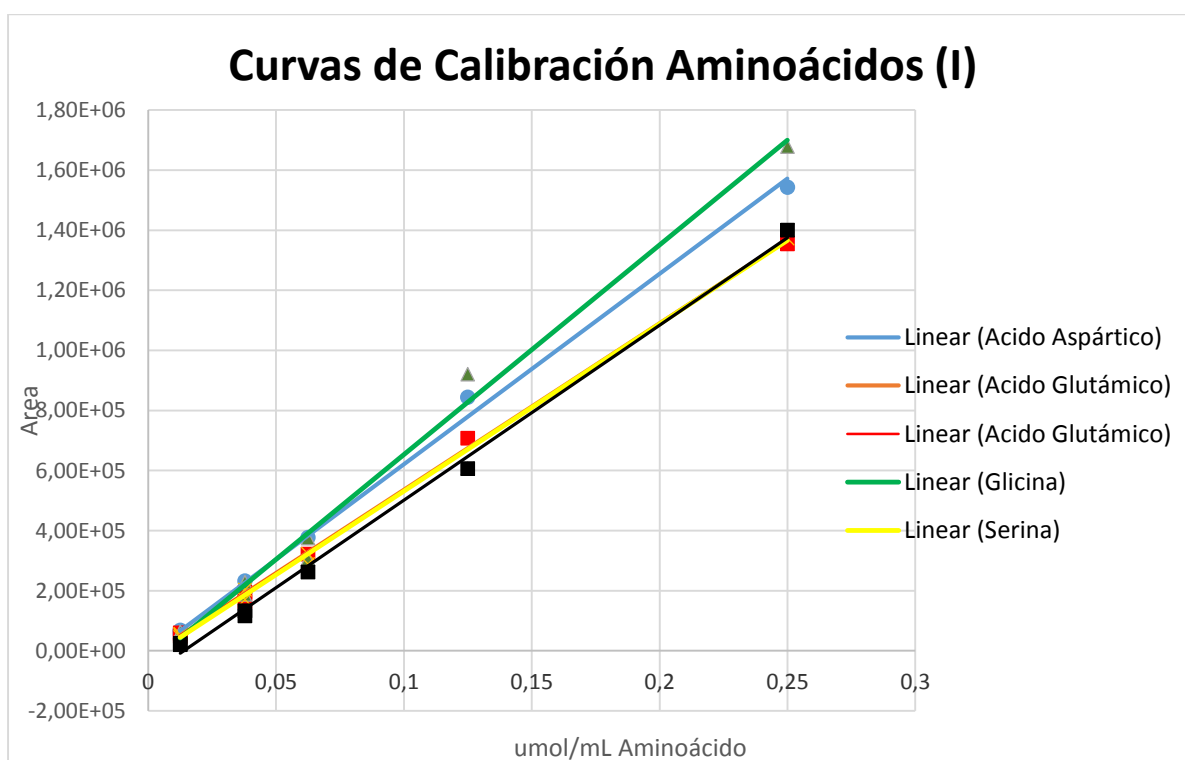
### II. Curva de calibración para determinación de polifenoles totales con ácido gálico.



### III. Curva de calibración cuantificación de glucosa (determinación de almidón)

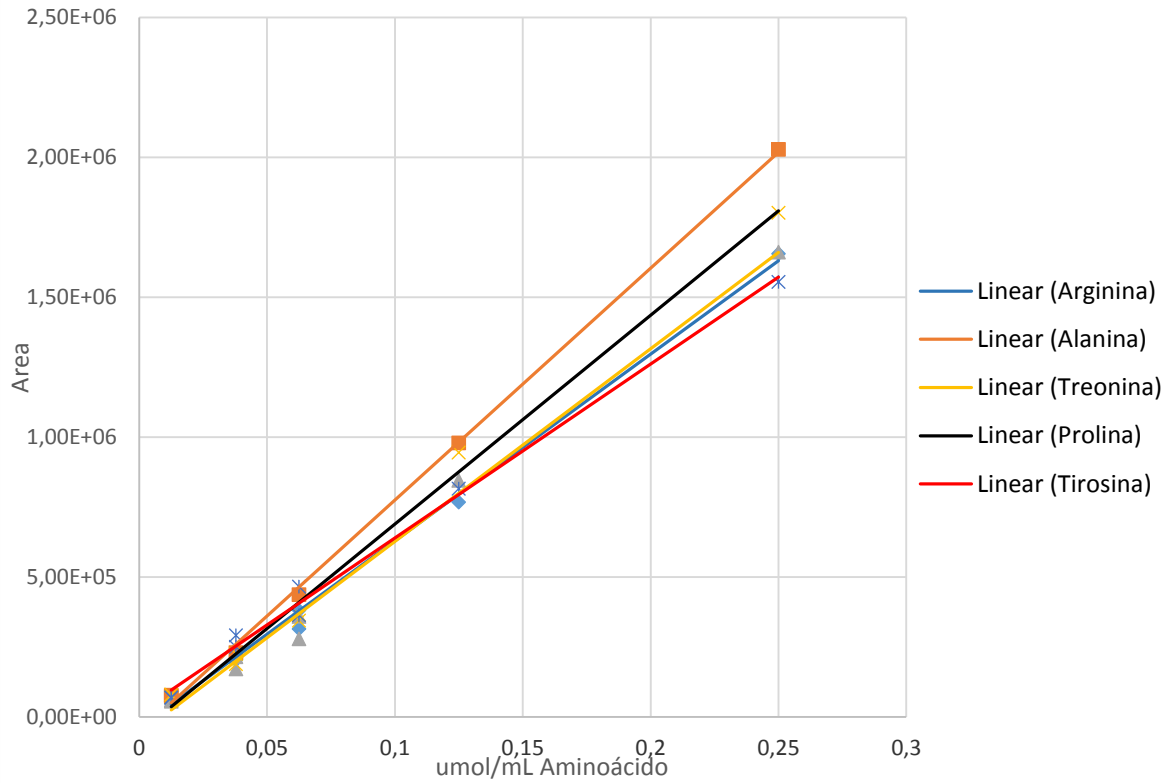


### IV. Cuvas de calibración para cada aminoácido

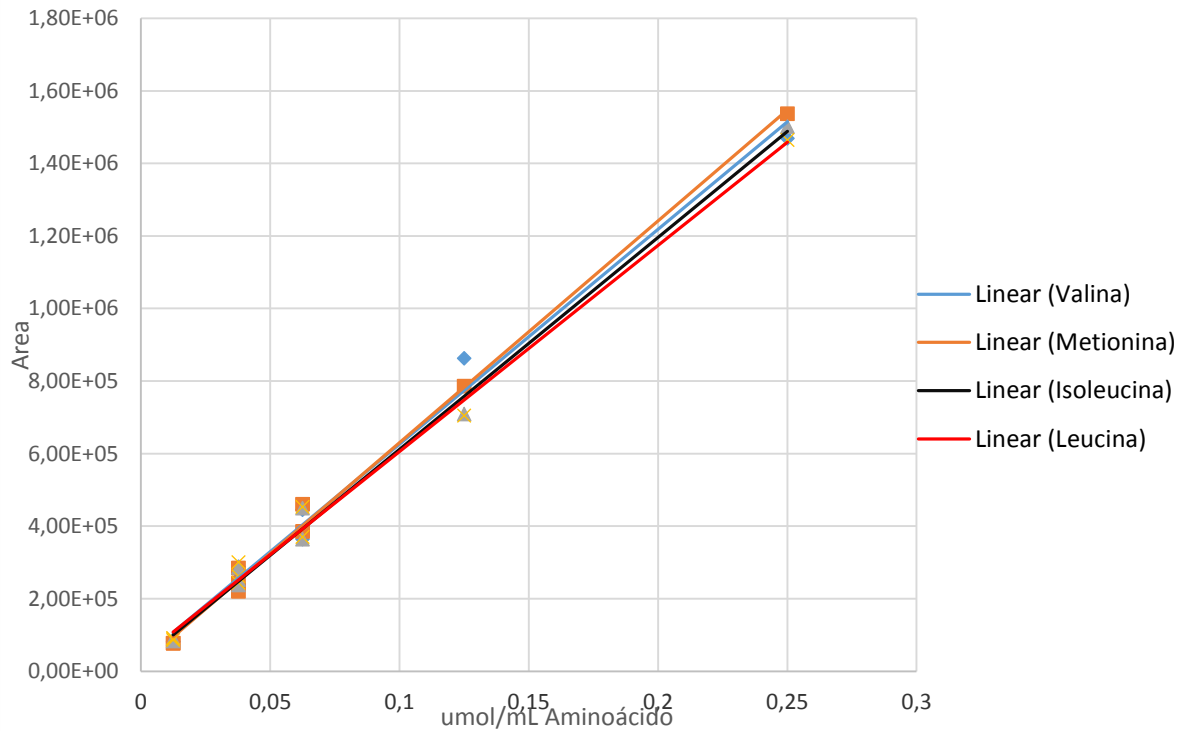




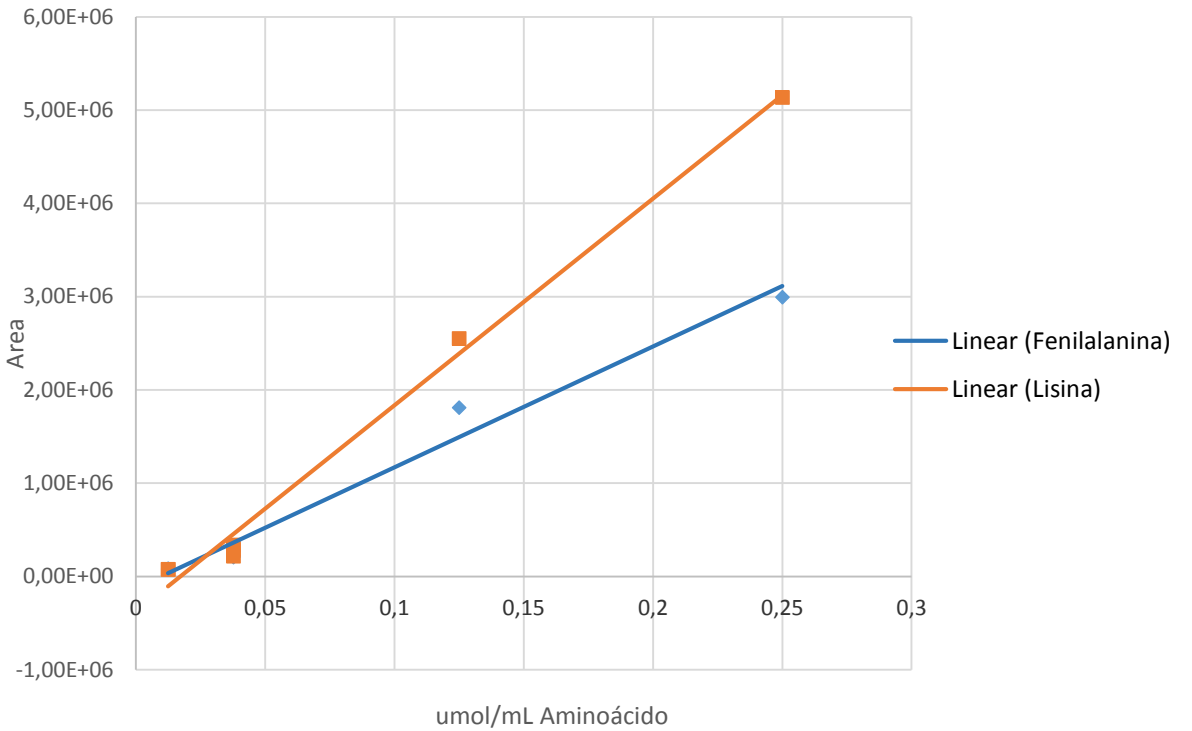
## Curvas de Calibración Aminoácidos (II)



## Curvas de Calibración Aminoácidos (III)



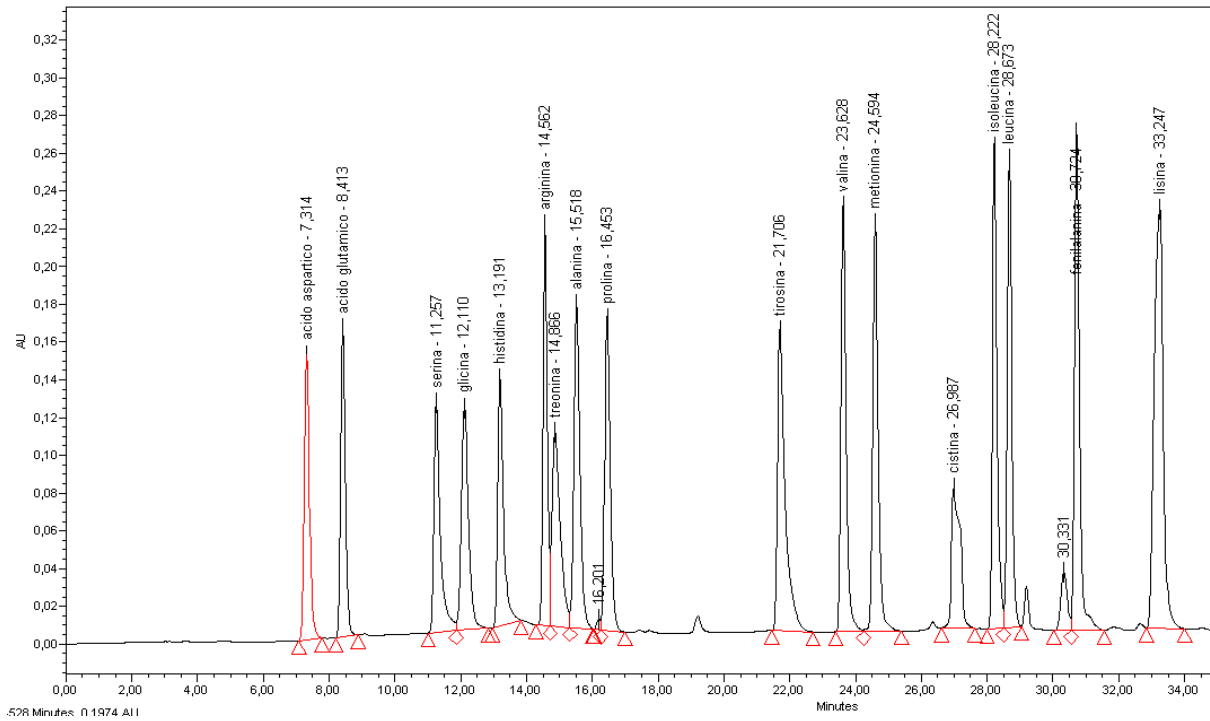
### Curvas de Calibración Aminoácidos (IV)



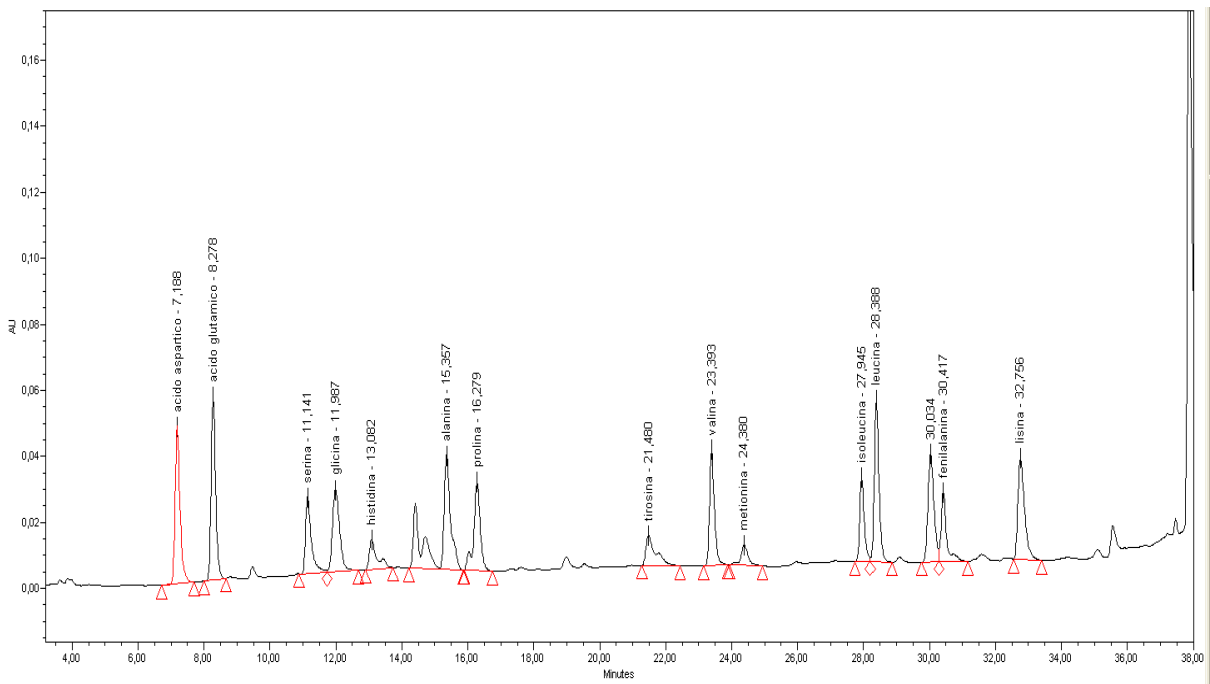
V. Coeficientes y  $R^2$  de las curvas de calibración de cada aminoácido.

<b>Coeficientes de la línea de tendencia lineal (<math>y=bx + a</math>) y <math>R^2</math> para cada aminoácido</b>			
<b>Aminoácido</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>Ac. Aspártico</b>	6,35E+06	-2,23E+04	0,993
<b>Ac. Glutámico</b>	5,55E+06	-2,54E+04	0,995
<b>Serina</b>	5,73E+06	-2,05E+04	0,989
<b>Glicina</b>	6,93E+06	-3,19E+04	0,988
<b>Histidina</b>	5,78E+06	-8,29E+04	0,989
<b>Arginina</b>	6,67E+06	-3,73E+04	0,996
<b>Treonina</b>	6,86E+06	5,65E+04	0,993
<b>Alalina</b>	8,27E+06	-6,13E+04	0,995
<b>Prolina</b>	7,44E+06	-5,27E+04	0,994
<b>Tirosina</b>	6,20E+06	2,49E+04	0,989
<b>Valina</b>	5,92RE+6	3,38E+04	0,99
<b>Metionina</b>	6,13E+06	1,70E+04	0,996
<b>Isoleucina</b>	5,82E+06	3,18E+04	0,994
<b>Leucina</b>	5,68E+06	3,72E+04	0,993
<b>Fenilalanina</b>	1,29E+07	-1,23E+05	0,9802
<b>Lisina</b>	2,20E+07	-3,80E+05	0,991

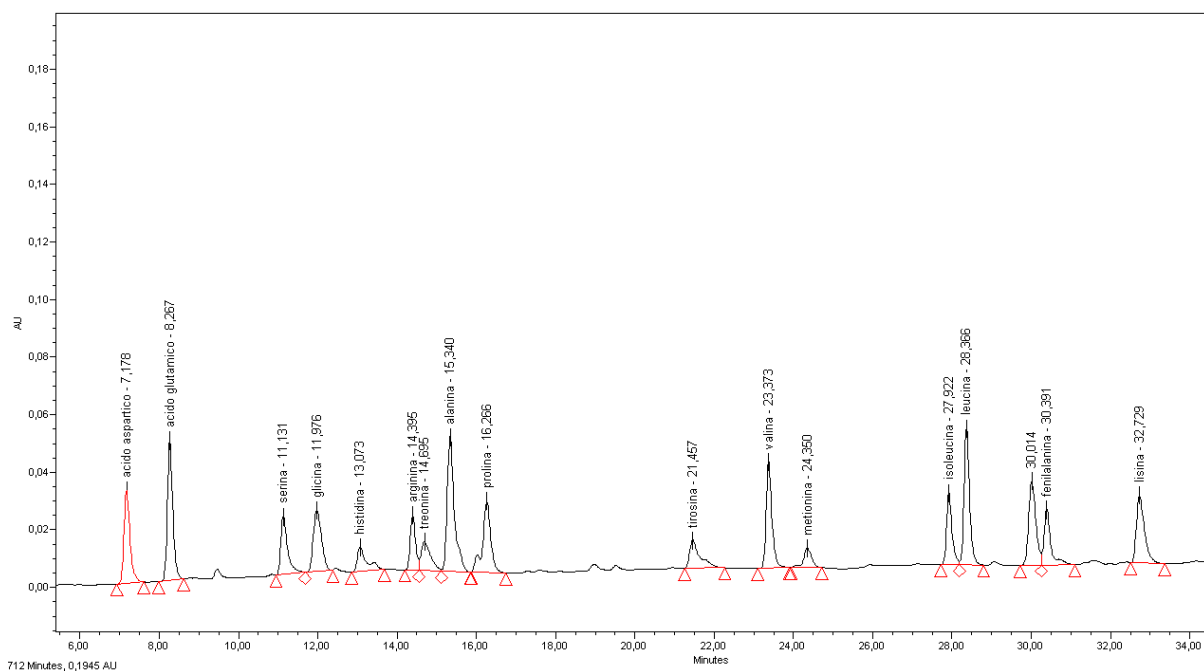
## VI. Cromatograma modelo del nivel 5 de la curva de calibración para cuantificación de aminoácidos.



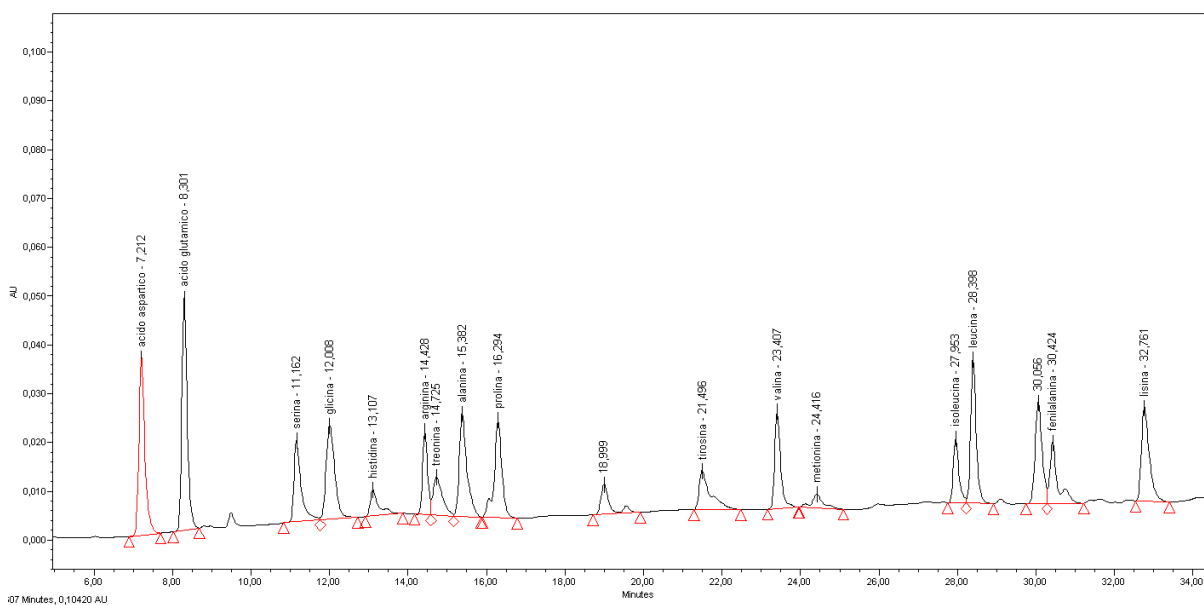
## VII. Cromatograma de aminoácidos de *Erythrina edulis* amarillo.



## VIII. Cromatograma de aminoácidos de *Erythrina edulis* rojo.



## IX. Cromatograma de aminoácidos de la harina proteica de *Erythrina edulis*.



X. Contenido de aminoácidos respecto a la proteína de las harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y harina proteica.

Aminoácido	mgA.A /g proteína		
	Harina E. edulis Amarillo	Harina de E. edulis Rojo	Harina proteínica
Acido aspártico	29,90 ± 16,22a	39,87 ± 3,84a	57,44 ± 2,02a
Acido glutámico	42,90 ± 22,27a	70,96 ± 6,42a	89,63 ± 2,27a
Serina	22,87 ± 2,88a	25,62 ± 2,16a	27,80 ± 1,49a
Glicina	20,290 ± 0,002a	21,30 ± 0,42a	23,62 ± 1,72a
Histidina	32,61 ± 0,17a	34,39 ± 3,02a	29,40 ± 0,45a
Arginina	27,90 ± 0,48a	32,38 ± 1,21b	34,99 ± 0,36b
Treonina	18,28 ± 0,81a	20,96 ± 1,66a	22,01 ± 0,91a
Alanina	26,16 ± 0,39a	41,79 ± 0,03b	25,61 ± 1,12a
Prolina	26,48 ± 3,34a	25,77 ± 1,35a	27,04 ± 1,96a
Tirosina	20,53 ± 3,06a	26,07 ± 1,84b	27,68 ± 2,21b
Valina	31,25 ± 2,77a	37,92 ± 1,20a	23,58 ± 0,32b
Metionina	4,97 ± 1,32a	8,47 ± 0,70a	3,02 ± 1,36b
Cistina	-	-	-
Isoleucina	24,04 ± 3,92a	26,74 ± 1,33a	15,03 ± 0,85b
Leucina	62,79 ± 6,87a	54,00 ± 2,38a	38,70 ± 1,18a
Fenilalanina	21,48 ± 1,97a	23,77 ± 1,95a	25,63 ± 0,74a
Lisina	27,32 ± 0,47a	27,17 ± 1,37a	28,35 ± 1,10a

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

XI. Contenido de aminoácidos en muestra total de harinas de morfotipos de *Erythrina edulis* y harina proteica.

Aminoácido	mg A.A /g muestra		
	Harina <i>Erythrina e.</i> Amarillo	Harina <i>Erythrina e.</i> Rojo	Harina proteica
Acido Aspártico	5,37 ± 2,91a	10,31 ± 0,99a	29,79 ± 1,05b
Acido glutámico	7,71 ± 4,00a	18,35 ± 1,66b	46,48 ± 1,18c
Serina	4,10 ± 0,52a	6,63 ± 0,56a	14,42 ± 0,77b
Glicina	3,65 ± 0,00a	5,51 ± 0,11a	12,25 ± 0,89b
Histidina	5,86 ± 0,03a	7,91 ± 0,61a	15,25 ± 0,23b
Arginina	5,01 ± 0,09a	8,37 ± 0,34b	18,15 ± 0,19c
Treonina	3,28 ± 0,14a	5,42 ± 0,43a	11,41 ± 0,47b
Alanina	4,70 ± 0,07a	10,81 ± 0,01b	13,28 ± 0,58b
Prolina	4,76 ± 0,60a	6,66 ± 0,35a	14,02 ± 1,02b
Tirosina	3,69 ± 0,55a	6,74 ± 0,48b	14,35 ± 1,14c
Valina	5,62 ± 0,50a	9,81 ± 0,31b	12,23 ± 0,17b
Metionina	0,89 ± 0,24a	1,46 ± 1,27a	1,04 ± 1,03a
Cistina	-	-	-
Isoleucina	4,32 ± 0,70a	6,91 ± 0,34b	7,79 ± 0,44b
Leucina	11,28 ± 1,23a	13,96 ± 0,62a	20,07 ± 0,61b
Fenilalanina	3,86 ± 0,35a	6,15 ± 0,50a	13,29 ± 0,38b
Lisina	4,91 ± 0,09a	7,03 ± 0,35a	14,70 ± 0,57b

Valores promedio ± desviación estándar, n=3. Valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).