

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE RIBOFLAVINA POR MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN HARINAS DE LENTEJA (*Lens esculenta*) GERMINADA Y SIN GERMINAR.

Lina M. Gil¹, Jairo Umaña¹, Juan F. Pinillos¹, Seneida M. Lopera¹ y Cecilia Gallardo^{*1}

¹Investigadores Grupo de Estudios de Estabilidad de Medicamentos, cosméticos y alimentos
Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

E-mail: * gallardoqf@gmail.com

RESUMEN

La riboflavina es un biocompuesto esencial en los alimentos, lo que hace necesario investigar fuentes alternativas de su producción y consumo. El objetivo de este estudio fue caracterizar el contenido de riboflavina, proteínas y extracto etéreo; y algunas propiedades funcionales de harinas obtenidas de lenteja (*Lens esculenta*, variedad verde) germinada y sin germinar. La Riboflavina se extrajo con metanol acuoso y ultrasonido, y la determinación por HPLC. El análisis de proteínas y extracto etéreo se realizó según métodos oficiales. Las pruebas funcionales de interacciones con el agua; capacidad de absorción de agua, retención de agua, capacidad de hinchamiento y porcentaje de solubilidad, siguiendo métodos reportados. Los datos fueron tomados por triplicado, analizados con estadístico no paramétrico, prueba de Kruskal-Wallis y de significancia con $P < 0,05$, utilizando Statgraphics Centurión. Se encontró diferencia significativa en los contenidos de proteínas y extracto etéreo, un incremento de Riboflavina mayor al 100%, que evidencia la germinación como un proceso de cambios químicos. También se hallaron diferencias en las propiedades funcionales, posiblemente por daño de los gránulos de almidón y la hidrólisis enzimática de macrocompuestos y la producción de compuestos solubles. En conclusión la germinación es un bioproceso promisorio para generar materias primas ricas en compuestos bioactivos, con propiedades funcionales interesantes para la formulación de alimentos

Palabras claves: Riboflavina • *Lens esculenta* • harina de lenteja • germinación.

ABSTRACT

Riboflavin is an essential biocomposite food, making it necessary to investigate alternative sources of production and consumption. The aim of this study was to characterize the content of riboflavin, protein, crude fat, and some functional properties of flour obtained from lentil (*Lens esculenta*, green variety) germinated and ungerminated. Riboflavin was extracted with aqueous methanol and ultrasound, and determination by HPLC. Analysis of protein and ether extract was performed according to official methods. Functional testing of interactions with water, water absorption capacity, retention of water swell ability and % solubility, following reported methods. The data were taken in triplicate and analyzed with nonparametric statistics, Kruskal-Wallis test and significance at $P < 0.05$, using Statgraphics Centurion. There was significant difference in protein content, crude fat, riboflavin increased over 100%,

which shows the germination as a process of chemical changes. Also no differences in functional properties, possibly due to damage of the starch granules and macrocompuestos enzymatic hydrolysis and production of soluble compounds. In conclusion, the germination is a promising bioprocess to produce raw materials rich in bioactive compounds with interesting functional properties for food formulation

Keywords: Riboflavin • Lens esculenta • lentil flour • germination.

I. INTRODUCCIÓN

La vitamina B₂ (Riboflavina- Rbf) es una vitamina hidrosoluble, su fórmula química es C₁₇H₂₀N₄O₆ y su peso molecular es 376,3 g/mol; presenta dos constantes de disociación pKa: 10,2 (N-3); pKa:1,7 (N-10). En su forma sólida es estable pero en soluciones alcalinas se descompone rápidamente, acelerándose aún más en presencia de la luz, (Food, 2012). La Riboflavina hace parte de la estructura de las coenzimas FMN(Flavin-Mono-Núcleo) y del FAD (Flavin-Adenin-Dinucleótido), indispensables para la actividad enzimática de las flavoproteínas (enzimas implicadas en procesos metabólicos de óxido-reducción); otra función es su participación en el crecimiento corporal, la producción de glóbulos rojos y en la liberación de energía de los carbohidratos, participa además, en los procesos de respiración celular, desintoxicación hepática, desarrollo del embrión y mantenimiento de la envoltura de los nervios, (Flórez *et al.*,2003). Todas estas funciones bioquímicas de la Rbf hacen necesario el estudio de fuentes naturales y de procesos alimentarios, para potencializar su consumo. La Rbf en los alimentos puede estar en su forma coenzimática fosfatada.

En Colombia (Resolución 333, 2011), se tiene determinado en el VDRN (Valores diarios de referencia de nutrientes), el consumo de Rbf así: Niños

mayores de 6 meses y menores de 4 años: 0,45 mg, Niños mayores de 4 años y adultos: 1,7 mg.

La lenteja en grano seco, ha sido reportada con un contenido de Rbf aproximado de 0.062 mg/100g (d.m.). La lenteja en harina tiene un contenido de Rbf aproximado de 0.04 mg/100 g (d.m.) (FAO, 2009). La lenteja es clasificada como leguminosa-proteoginosa, por su contenido de proteína y baja cantidad de grasa. Constituye una fuente de Rbf, Piridoxina, Fósforo, hierro y Zinc, contienen además de sus variados nutrientes, compuestos tales como polifenoles, fibra soluble, α-galactósidos, y las isoflavonas que le confieren propiedades de alimento funcional, (Andrade, 2010). Sin embargo la presencia de factores antinutricionales inhibidores de la tripsina, taninos y galactosidasa en la semilla exigen potencializar otras formas de consumo que permitan un grano asimilable y que conserve las características anteriores, (Sotomayor *et al.*, 1999).

Las leguminosas de consumo masivo, como la lenteja, pueden ser sometidas al proceso de germinación, como aporte a nuevas formas de consumo con valor agregado nutricional. (Tiwari *et al.*,2011).

El proceso de germinación es la recuperación de la actividad biológica de la semillas y está soportado en cambios químicos y bioquímicos, que generan

modificaciones sustanciales en las semillas como el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes, degradación de compuestos antinutricionales, cambios en las características funcionales y tecnológicas.

La función principal de la germinación es lograr que las enzimas en una etapa posterior hidrolicen las reservas de almidón del endospermo para producir azúcares. Las enzimas amilolíticas son muy importantes, pero hay otras enzimas en este proceso como son las lipolíticas malatosintetasa, isocitratoliasa, carboxipeptidasas y proteínasas, fitasa y fosfatasa, (Veluppillai *et al.*, 2009 y Azcón, 2008). A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provoca la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula. Este proceso necesita de unas condiciones especiales como disponibilidad de agua, oxígeno y temperatura que favorezcan los procesos metabólicos (respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas), (Germinación, 2011).

Se ha reportado que en la germinación de leguminosas, se presenta una disminución de los factores antinutricionales como ácido fítico e inhibidores de la tripsina y aumentan los niveles de algunas vitaminas, (Tiwari *et al.*, 2011).

Este trabajo hace parte de un macroproyecto que se adelanta en la Universidad de Antioquia, como parte de

la caracterización de biomateriales alternativos con potencialidad de aplicación en la industria alimentaria del país

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de vitamina B₂ en harinas de grano de lenteja germinada y sin germinar, como indicador del aumento del contenido de nutrientes en este proceso, además caracterizar la harina del grano germinado en algunas propiedades funcionales y de composición, para direccionar su aplicación en procesos alimentarios

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron granos de lenteja variedad verde seca, con una humedad aproximada del 8% (determinada por gravimetría), envasada en polietileno transparente, adquirida en los supermercados de cadena de la ciudad. Los solventes utilizados (metanol, acetonitrilo ácido fosfórico y fosfato de sodio) fueron grado HPLC marca Merck, para el método HPLC usando agua Milli Q y para las pruebas funcionales se utilizó agua destilada.

Proceso de germinación

Para el proceso de germinación la semilla se lavó y desinfectó con amonio cuaternario a 200 ppm con un tiempo de contacto de 5 min. El desarrollo de la germinación de la semilla duro 6 días. Se realizó el procedimiento que se presenta en la figura 1.

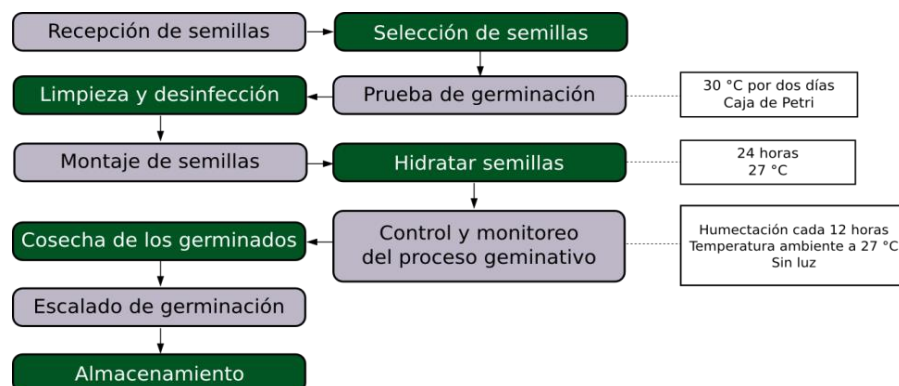


Fig.1. Procedimiento de germinación.

Prueba de germinación

Es una prueba que sirve para estimar el porcentaje de semillas con capacidad germinativa. El porcentaje de germinación en condiciones estándar, se evaluó desinfectando 20 semillas, colocándolas a germinar en cajas de petri con papel filtro y 7 mL de agua desionizada y destilada, fueron almacenadas en una estufa a 27 °C por 2 días, finalmente se sacaba la fracción de semillas germinadas (Andrade, 2010).

Proceso de obtención de harina

Las semillas germinadas y no germinadas, fueron secadas en horno marca CITALSA de secado convectivo, a 60 ± 3 °C por 18 horas. La reducción de tamaño se realizó por molienda en un molino de cuchillas modelo MC-1-800 marca SIAC y posteriormente fueron tamizadas con malla N° 50 serie Taylor, con un tamaño < a 250µm. Las harinas obtenidas, se envasaron en bolsas de polietileno debidamente selladas y fueron almacenadas en un lugar oscuro a temperatura ambiente 27 ± 2 °C.

Análisis bromatológicos:

- *Humedad:* se determinó por gravimetría secando la muestra por convección forzada, según método AOAC 925.10.
- *Proteína total:* la determinación del porcentaje de nitrógeno se realizó por el método de Kjeldahl, y aplicando posteriormente un factor de 6.25 para su transformación en porcentaje de proteína, según método AOAC 984.13.
- *Extracto etéreo:* se obtiene por medio de extracción con solvente orgánico (éter de petróleo), según método AOAC 920.39.

Cuantificación de riboflavina por Cromatografía Líquida de Alta resolución-HPLC

Para la extracción de la riboflavina como base libre se utilizó una mezcla de metanol: agua 50:50, que se puso en contacto con las harinas bajo ultrasonido marca a 50 ± 1 °C durante 1 hora luego se hizo filtración al vacío, tomando el decantado como muestra problema, que contenía la Rbf. La cuantificación se realizó en un equipo: HPLC Shimadzu UFLC Con detector DAD (arreglo de diodos) con una columna C18 cartucho Merck, la fase móvil estaba compuesta de

buffer fosfato de sodio 50 mM : Acetonitrilo (85:15), flujo: 1 mL/min y una longitud de onda para la detección de 440 nm. (Guzmán, 2008).

Caracterización funcional de la harina de germinado de lenteja y sin germinar.

Los métodos descritos a continuación, se usaron y reportados en investigaciones similares (Umaña, 2010)

Capacidad de absorción de agua (CAA): Se pesó 0.5 g de muestra y se agrego un exceso de agua (10 mL), luego se agito y se dejo hidratando por 30 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se separo el sobrenadante y se peso el sedimento

$$CAA = \frac{m_p(g) - m_m(g)}{m_m(g)}$$

Capacidad retención de agua (CRA) y Solubilidad: Se pesó 1 g de muestra y se agrego un exceso de agua (30 mL), luego se agito y se dejo hidratando por 24 horas. Se Centrifugo a 2000rpm por 30 minutos, se separo el sobrenadante y se peso el sedimento. Luego se transfirió el sedimento a un crisol de secado y se seco a 105 °C por 6 horas. Finalmente se peso el sedimento seco.

$$CRA = \frac{RH(g) - Pm(g)}{Pm(g)}$$

$$\%S = \frac{m_m(g) - RS(g)}{m_m(g)} * 100$$

Capacidad de hinchamiento (CH): Se pesaron 2.5 gramos de muestra en una probeta graduada de 25 mL y se adicionó un exceso de agua (30 mL) y se agitó. Se dejó en reposo por 24 horas y se midió el volumen final ocupado por la muestra.

$$CH = \frac{V_f(ml)}{m_m(g)}$$

Análisis estadístico: Los datos fueron obtenidos por triplicado, analizados con estadístico no paramétrico, aplicando prueba de Kruskal-Wallis y de significancia con valor $P < 0,05$, utilizando Statgraphics Centurión.

III. RESULTADOS

Los granos germinados se obtuvieron en un tiempo de 6 días y por razones de estandarización del producto, se definió como punto final de germinación, un tamaño de radícula en promedio de 4.6 cm y una humedad de 72,81%. A partir de los granos germinados se obtuvo harina de germinados, con un tamaño de partícula máximo de 250 μ m, cercano al recomendado en la normatividad, que es hasta de 220 μ m, de manera que se conserven propiedades de desempeño como materia prima, en multimezclas y en harinas compuestas, sin alterar la funcionalidad tecnológica, y una humedad de 7,25%, que garantiza la conservación e inocuidad, así como la capacidad de interacción con el agua. (Hui, 2006).

La composición respecto a la proteína y al extracto etéreo, presenta una diferencia con significancia estadística entre las dos harinas, como se muestra en la tabla 1, con aumento del contenido de proteína en la harina germinada, lo que puede explicarse, por la expresión de proteínas de embriogénesis durante la germinación, las cuales se acumulan en la desecación y se activan al disminuir el estrés por deshidratación, adicionalmente, en las semillas secas algunas proteínas sufren cambios conformacionales y al rehidratar, se presenta una recuperación

conformacional de las proteínas tipo enzimas, que apoyan la maquinaria enzimática activa típica de la germinación. La disminución de extracto etéreo en la harina de semillas germinadas de lenteja, se explica por la alta actividad enzimática lipolítica que a su vez genera ácidos grasos insaturados con alta sensibilidad a

reacciones de peroxidación y al rompimiento de lípidos que hacen parte de membranas, (Kigel *et al.*, 2011). así como la oxidación de los ácidos grasos a acetyl CoA y posterior formación de succinato en los glioxisomas. (Germinación, 2011).

Tabla 1. Variables de composición en harinas de lenteja

Propiedad	Harina de lenteja no germinada	Harina de lenteja germinada	P-Value ^a
Extracto etéreo	1,460±0,062	0,658±0,030	0,00196988
Proteína	17,062±1,443	20,125±0,505	0,00192998

^a Significancia con P <0,05

Los resultados obtenidos en las pruebas funcionales se muestran en la figura 3. Estos resultados pueden ser explicados por la hidrólisis de polisacáridos y proteínas considerando que estos componentes son los responsables de gran parte de las interacciones con el agua, se observa como la capacidad de absorción de agua y la solubilidad, aumentan con la germinación, ya que se forman compuestos simples de bajo peso

molecular, tipo monosacáridos de alta solubilidad e interacción con el agua, haciendo que la capacidad de retención y de hinchamiento disminuyan, ya que estos fenómenos requieren compuestos de alto peso molecular y de conformaciones complejas, para enlazar el agua eficientemente. Estas interacciones con el agua condicionan la funcionalidad tecnológica de los materiales (Tiwari *et al.*, 2011).

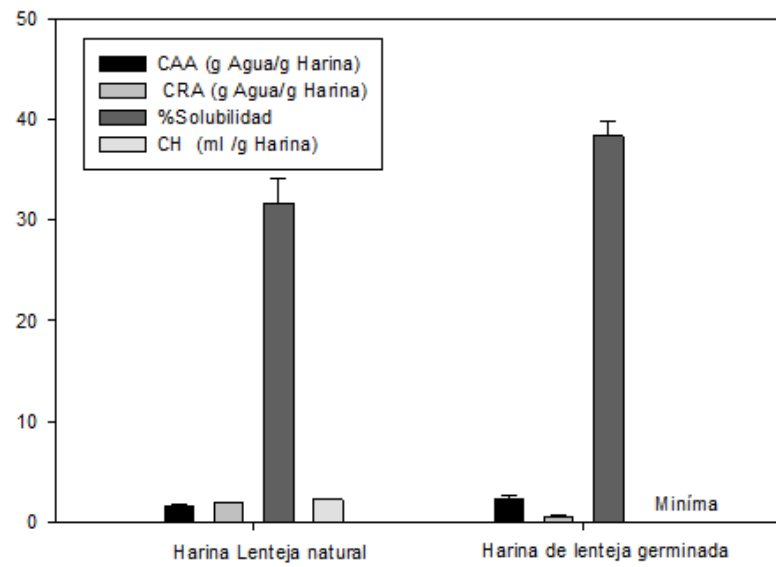


Fig.3. Pruebas funcionales de interacción agua-harina de lenteja germinada y sin germinar

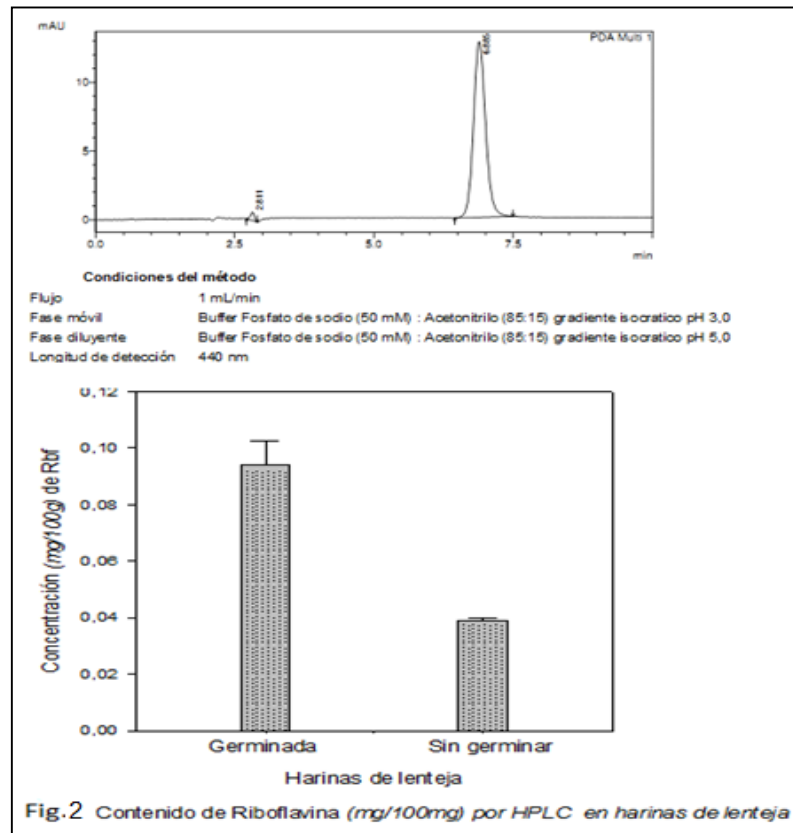


Fig.4. Contenido de Riboflavina (mg/100 mg) por HPLC en harinas de lenteja

En la Fig.4 se muestra la Rbf con un tiempo de retención de 6.864 min, determinada por el método de HPLC, anteriormente presentado. En la harina de lenteja germinada se presenta mayor cantidad de RbF, con un incremento mayor del 100%, respecto a la harina de lenteja sin germinar. El aumento de esta vitamina puede explicarse por la acción de enzimas de liberación de nutrientes y la síntesis, al presentarse el aumento de pentosa ribosa y compuestos flavín, por los efectos de la activación metabólica de la semilla y la disponibilidad de agua como solvente.

IV. CONCLUSIONES

En el proceso de la germinación, se produce una activación de la síntesis proteica y, por lo tanto, la formación de enzimas hidrolíticas que son las que promueven la movilización de las sustancias de reserva. La lenteja germinada como grano y procesada como harina, constituye una materia prima alternativa con potencialidad para formular alimentos con mayor valor nutricional y con estudios asociados a otros nutrientes, se podría considerar la germinación, como un proceso de biofortificación.

Las características funcionales de la harina de lenteja germinada, evidencian que esta tiene aplicaciones en alimentos procesados estructurados, como propuesta de nuevas formas de consumo y mayor aprovechamiento de su valor nutricional. Es necesario seguir estudiando, nuevas alternativas de consumo y procesos, para materias primas ricas en proteínas y en compuestos bioactivos.

BIBLIOGRAFÍA

Food Standards agency. (2012). Revised review of Riboflavin EVM/00/15. Consultado el 17 de Enero de 2012. Disponible en: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/revieWRiboflavin>.

Flórez, J, Armijo, J, Mediavilla, A. (2003). Farmacología Humana. 4ta Ed. Barcelona, España: Masson S.A.; Pag: 1021-1022p.

RESOLUCIÓN NÚMERO 333 de (2011). MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Reglamento técnico sobre los requisitos de etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano. Disponible en: <http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=54033>.

FAO/LATINFOODS. (2009). Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Consultado el 10 de Enero de 2012. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos>.

Andrade, X. (2010). Método para la obtención de germinados de haba y lenteja (Vicia faba L y Lens esculenta). Tesis, Universidad Nacional de Colombia [en línea] 2010. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2788/1/107410.2010.pdf>.

Sotomayor, C, Frias, J, Vidal-Valverde, C, Fornal, J, Sadowska, J, Urbano, G. (1999) Lentil Starch Content and its Microscopical Structure as Influenced by Natural Fermentation. Starch/Stärke [en línea], vol 51. Disponible en: <http://hera.ugr.es/doi/14999985.pdf>.

Tiwari BK, Gowen A, McKenna B, (2011). editores. Pulse Foods Processing, Quality and Nutraceutical Applications. Estados Unidos. *Elsevier Inc.*; 27 y 215p.

IIIFrom Marcel Dekker, Inc. New York, Basel. 237-333 p. ISBN 0-8247-9229-1

Velupillai, S, Nithyanantharajah, K, Vasantharuba, S (2009). Biochemical Changes Associated with Germinating Rice Grains and Germination Improvement. Rice science [en línea], vol 16; 240-242p. Disponible en: <http://60.191.45.226:8080/zgsdkxen/EN/abstract/abstract8835.shtml>.

Azcòn, J, Talón, M. (2008). Fisiología Vegetal. 2da Ed. Barcelona, España: Mc Graw Hill. 551p

Germinación de semillas (2011). U. Politécnica de Valencia. Consultado el 18 de diciembre de 2011. Disponible en: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm#Metabolismo%20de%20la%20germinaci%C3%B3n%20en%20cercales.

Guzmán CP. (2008). Trabajo de investigación Tesis MSc. Evaluación y aplicación de técnicas para estabilizar la Riboflavina en preparaciones farmacéuticas. U. de Antioquia. 120 p

Umaña J. (2010). Trabajo de investigación para optar al título de ingeniero de alimentos. Caracterización de harinas alternativas con potencialidad en la industria alimentaria U. de Antioquia. 89 p

Hui Y. H., (2006) *Bakery Products: Science and Technology*, Iowa, USA: Blackwell Publishing. 570 p

J. Kigel and G. Galili. (1995). Seed development and germination Edited by.