

**Cuantificación de ácido fítico, calcio y
proteína en harina a base de leguminosas
pregerminadas enriquecida con cáscara de
huevo**

Stephany Gissel Aguirre Freire

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Cuantificación de ácido fítico, calcio y proteína en harina a base de leguminosas pregerminadas enriquecida con cáscara de huevo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Stephany Gissel Aguirre Freire

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Cuantificación de ácido fítico, calcio y proteína en harina a base de leguminosas pregerminadas enriquecida con cáscara de huevo

Stephany Gissel Aguirre Freire

Resumen. Las leguminosas poseen alto contenido de proteína y minerales poco aprovechables por compuestos anti nutricionales como el ácido fítico (AF) que reducen la absorción de minerales como el calcio (Ca). En adultos entre 50 a 70 años se recomienda consumir 1200 mg de Ca diario y más proteína (Pr). El objetivo del estudio es determinar el comportamiento del AF, Ca y Pr en la pregerminación de las leguminosas autóctonas de los Andes: lupino (Lu), arveja (Ar) y haba (Ha), durante los días 0, 3 y 6 para formular una harina que se enriquecerá con cáscara de huevo (CH). El estudio constó de tres fases: 1) elaboración de harina con leguminosas pregerminadas, 2) elaboración de harina de CH y 3) formulación de harina de leguminosas enriquecida con CH. Se utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con tres tratamientos (Lu, Ar y Ha) en 3 días de pregerminación (0, 3 y 6). En la tercera fase se evaluó los cambios en contenido del Ca, AF y Pr individualmente y se seleccionó la leguminosa con mayor contenido de Pr para elaborar la harina enriquecida con CH. El lupino fue la leguminosa que obtuvo el mayor contenido de Pr en el día 6 de pregerminación y se logró elevar la concentración de calcio con la aplicación de harina de CH y se evidenció una reducción de proteína y aumento de calcio en pregerminación. Se recomienda realizar análisis de biodisponibilidad de Ca en harina de CH para asegurar su absorción en el organismo.

Palabras clave: Alverja, haba, lupino.

Abstract. The legumes have a high content of protein and minerals little use by anti-nutritional compounds such as phytic acid (Ph), which reduce the absorption of minerals such as calcium (Ca). In adults between 50 to 70 years is recommended to consume 1200 mg of Ca daily and more protein (Pr). The objective of this study was to determine the behavior of the Ph, Ca and Pr in the pre-germination of the legumes native to the Andes: lupine (Lu), pea (Pe) and broad bean (Bb), during days 0, 3 and 6 to formulate a flour enriched with eggshell (Es). The study consisted of 3 phases: 1) Development of flour with pregerminated legumes, 2) development of flour of Es and 3) Formulation of enriched legume flour with Es. The experimental design was a Randomized Complete Block (RCB) with three treatments (Lu, Ar, and Ha) in 3 days of pre-germination evaluated (0, 3 and 6). In the third phase the changes in the content of the Ca, Ph and Pr individually and selected the legume with higher content of Pr to produce flour enriched with Es. Lupin was the legume that obtained the highest content of Pr on the day 6 of pre-germination and was able to raise the concentration of calcium with the implementation of flour of Es and showed a reduction of protein and calcium in a pre-germination increase. It is recommended to carry out analysis of bioavailability of Ca in flour of Es to ensure its absorption in the body.

Key words: Broad bean, lupine, vetch.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	16
5. RECOMENDACIONES.....	17
6. LITERATUA CITADA.....	18
7. ANEXOS	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de ácido fólico en leguminosas en los días 0, 3 y 6.	7
2. Efecto de la pregerminación entre días para cada tratamiento sobre el contenido de ácido fólico en leguminosas en los días 0, 3 y 6.....	8
3. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de calcio en leguminosas en los días 0, 3 y 6	8
4. Efecto de la pregerminación entre días para cada tratamiento sobre el contenido de calcio en leguminosas en los días 0, 3 y 6	9
5. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de proteína en leguminosas en los días 0, 3 y 6	10
6. Efecto de la pregerminación entre días para cada tratamiento sobre el contenido de proteína en leguminosas en los días 0, 3 y 6.....	10
7. Contenido de calcio en harina de cáscara de huevo	12
8. Resultados de análisis microbiológicos para determinación de coliformes totales en fase I y II.....	12
9. Cuantificación de calcio, ácido fólico y proteína en harina de lupino pregerminado en el día 6.....	13
10. Determinación de calcio en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo ..	13
11. Granulometría en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo	14
12. Determinación de color en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo....	14
Figuras	Página
1. Comparación de ácido fólico y fósforo presente en harina de lupino en los días 0, 3 y 6.....	11
2. Etiqueta nutricional para harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo. ...	15

Anexos	Página
1. Flujo de proceso para elaboración de harina de cáscara de huevo.	22
2. Flujo de proceso para elaboración de harina de leguminosas pregerminadas enriquecida con cáscara de huevo.	23
3. Límite máximo permitido según el RTCA en el conteo de coliformes para productos elaborados a partir de leguminosas.	24
4. Comportamiento de ácido fítico en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.....	24
5. Comportamiento de calcio en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.....	25
6. Comportamiento de proteína en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.....	25
7. Síntesis SAS 9.4 para análisis de ácido fítico, calcio y proteína entre tratamientos.	26
8. Síntesis SAS 9.4 para análisis de ácido fítico, calcio y proteína entre días según tratamiento.	27

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas pertenecen a la familia de las fabáceas, poseen características biológicas que les permiten mejorar el aprovechamiento de recursos como consumo eficiente del agua y fijación de nitrógeno aumentando la productividad de los suelos (Mera y Rouanet 2013). Se consideran leguminosas a las semillas deshidratadas comestibles, pueden tener diferente forma, color, tamaño; deben estar dentro de una vaina y servir de alimento animal o humano; las leguminosas en general son consideradas un súper alimento del futuro por sus características biológicas a diferencia de otras plantas (FAO 2016). Las leguminas en su composición química contienen fuentes importantes de proteínas y minerales pero su utilización es limitada debido al contenido de compuestos anti nutricionales que son sustancias fibrosas generadas por el metabolismo secundario de las plantas como un mecanismo de defensa ante el ataque de mohos, bacterias, insectos y pájaros o en situaciones de estrés por lo tanto, su consumo sin tratamiento reduce la absorción de nutrientes (Castillo *et al.* 2016).

El ácido fítico (myo-inositol hexafosfato) es un compuesto natural que representa el 75% del fósforo total que se encuentra en semillas como cereales, leguminosas y frutos secos (Buades *et al.* 2017). La molécula de ácido fítico está formada por componentes como sales de zinc, hierro, calcio, magnesio, cobalto y manganeso los cuales no pueden ser desdoblada por el pH del intestino reduciendo la biodisponibilidad de minerales en el organismo (Ojeda *et al.* 2012). El ácido fítico es la principal fuente de fósforo para la producción de energía de la planta y puede establecer uniones iónicas que forman quelatos con minerales, estas uniones reducen la absorción al no permitir su liberación y aprovechamiento en la alimentación (Aguilar *et al.* 2014). El ácido fítico es necesario en pequeñas cantidades en la alimentación, este compuesto brinda varios beneficios para la salud actúa como desinflamatorio y anticancerígeno al reducir la apoptosis celular (Frontela *et al.* 2008). Estudios de toxicidad aguda realizados en ratones indicaron que consumir cantidades mayores a 2.75 mg/g puede ser tóxico para la salud (Bestard 2004).

Entre los métodos para reducir los compuestos anti nutricionales como el ácido fítico se encuentran la fermentación, malteado, cocción y pregerminación. El proceso de germinación activa la fitasa endógena (enzima) la cual puede hidrolizar el fitato para liberar el fósforo necesario en el crecimiento y desarrollo de la planta (Sanz y Haros 2012). Existen varios estudios que demuestran que el proceso germinativo ayuda a disminuir el contenido de fitatos. Los cereales pregerminados son la nueva base de productos alimenticios para personas con requerimientos nutricionales especiales como alimentos reducidos en gluten o compuestos bio activos como fitasas que no pueden estar presentes en su dieta (Cáceres 2015). El diseño de estos nuevos “alimentos con requerimientos nutricionales especiales” representa una nueva tecnología para el desarrollo de alimentos.

Los requerimientos diarios de calcio en hombres y mujeres que se encuentran entre los 50 a 70 años son de 1000 y 1200 mg diarios, el calcio puede ser absorbido de los alimentos consumidos diariamente pero no en su totalidad (Quesada y Sosa 2010). La absorción de calcio se realiza en el intestino grueso en condiciones alcalinas, esta absorción se optimiza cuando el calcio es biodisponible (Ca^{+2}) pero solo se absorbe del 20 al 30% del calcio ingerido en los alimentos elevando el riesgo de padecer enfermedades como osteoporosis (Perales y Mota 1999). La osteoporosis es una enfermedad silenciosa que produce la reducción de masa ósea dejando los huesos débiles y propensos a fracturas (Martínez *et al.* 2013). Esta patología no presenta síntomas durante su periodo de evolución en los pacientes y tiene mayor incidencia en ancianos y mujeres post menopáusicas (Palacios y Hernández 2009). En Ecuador se determinó que 37 de cada 1000 pacientes fueron internados por presentar fracturas producidas por osteoporosis, este índice demuestra que existe una gran deficiencia de este macro elemento y que su consumo se debe elevar como método de prevención (Silva 2010). La cáscara de huevo es la cubierta protectora permeable que protege al huevo de agentes externos, representa del 9 al 12% del peso del huevo y está compuesta por un 94% de carbonato de calcio y mínimas cantidades de fosfato tri cálcico y el carbonato de magnesio, el carbonato de calcio puede ser utilizado como materia prima en la elaboración de otros subproductos (Valdés 2009). El consumo de suplementos que son fortificados con calcio ha demostrado resultados beneficiosos al reducir significativamente el riesgo de sufrir fracturas de cadera y extremidades (INFAC 2013).

La proteína es un macro elemento de la alimentación, deben ser consumidas diariamente en la alimentación para que el organismo pueda regenerar y construir tejidos, también intervienen en procesos biológicos, fisiológicos y funcionales. Las proteínas son macromoléculas estructurales de los seres vivos, forma parte de tejidos, células, son usadas para cumplir varias funciones como crecimiento, desarrollo, asimilación de nutrientes, transporte de grasa, oxígeno, regulación de hormonas y minerales (Gonzales *et al.* 2007). La absorción de proteína se ve reducida a medida que se incremente la edad, la población anciana sufre frecuentemente de disminución del compartimento muscular, este trastorno produce la disminución de la proteína del músculo debido a que existen falencias en la absorción en el hígado e intestinos por lo tanto se recomienda un consumo de (1,25-2 g/kg/día) (Capo 2002). Para el desarrollo de este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Cuantificar el ácido fólico, calcio y proteína en harina de leguminosas pregerminadas para evidenciar los cambios en su contenido durante el proceso de pregerminación.
- Según la leguminosa de mayor contenido de proteína, se elaborará la harina de leguminosas pregerminadas enriquecida con cáscara de huevo.
- Enriquecer con cáscara de huevo la harina de leguminosa pregerminadas para aumentar su contenido de calcio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El desarrollo de la harina se realizó en las instalaciones del Laboratorio de análisis de Alimentos (LAAZ) y el Laboratorio de Microbiología de alimentos (LMAZ) de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el km 32 al este de Tegucigalpa, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

El estudio se dividió en 3 fases definidas a continuación.

Fase I. Elaboración de harina de leguminosas pregerminadas.

- Pregerminación y elaboración de harina
- Análisis químico de harina
- Análisis microbiológico de leguminosas pregerminadas
- Diseño experimental y análisis estadístico

Fase II. Elaboración de harina de cáscara de huevo.

- Análisis químico
- Análisis microbiológico

Fase III. Formulación de harina enriquecida con harina de cáscara de huevo.

- Análisis químico
- Análisis físico

Fase I. Elaboración de harina de leguminosas pregerminadas y análisis.

Materia prima. Para llevar a cabo el estudio se utilizó arveja (*Pisum sativum L.*), haba (*Vicia faba*) y lupino (*Lupinus mutabilis*), pertenecientes a la familia de las fabáceas, las leguminosas fueron adquiridas en Ecuador. Los huevos de gallinas (*Gallus gallus domesticus*) de la raza Cobb 50 fueron adquiridos en el “Puesto de ventas Zamorano”.

Pregerminación y elaboración de harina.

Pregerminación. La pregerminación se llevó a cabo en la cámara para prueba de estabilidad NORLAKE SCIENTIFIC® a 15 °C y 90% de humedad. Las leguminosas se colocaron en platos Petri en los cuales se añadieron 20 ml de agua por día. Los días establecidos para

pregerminar fueron seis empezando la cuenta a partir de las primeras 24 horas en las cuales inicia el proceso de imbibición.

La imbibición es el proceso de absorción de agua de la semilla donde algunas leguminosas pueden absorber hasta el 180%. El agua penetra el tegumento para rehidratar e iniciar la síntesis de nutrientes y enzimas donde se degradan sustancias de reserva como proteínas y almidones para iniciar procesos biológicos de desarrollo de la plántula (Courtis 2013).

Elaboración de harina. La elaboración de la harina se realizó con las leguminosas pregerminadas en los días 0, 3 y 6.

Secado. El secado se realizó a 55 °C en el horno NAPCO® modelo 630 por 10 h. Se debe garantizar reducir la humedad hasta un 14% para preservar características químicas y nutricionales de la harina.

El secado artificial es el proceso que garantiza la conservación de los granos los cuales permiten su almacenamiento y comercialización. Realizar este proceso a baja temperatura ayuda a preservar las características físicas y químicas de los granos y mejora el proceso de molienda seca (Rodríguez y Bartosik 2016). Las características de calidad e inocuidad de los granos no deben ser alteradas al realizar este proceso.

Molienda. La molienda se realizó en molino de disco Perten Laboratory Mill 3310. La criba de la harina se realizó con tamiz número 30 para obtener un tamaño de partícula de 600 µm y obtener una harina homogénea.

Análisis químico.

Determinación de ácido fítico. El método original utilizado para la determinación del ácido fítico fue por valoración complexométrica del exceso de hierro (III) desarrollado por (García R *et al.* 1982). Se utilizaron muestras de 5 g de harina de leguminosas pregerminadas en el día 0, 3 y 6. La extracción se realizó con 40 ml de solución (10 g/100 g Na₂SO₄ en 0.4 mol/l de HCl) durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación magnética. La suspensión se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min, se tomó 10 ml de sobrenadante y se pipeteó en tubos de centrifuga donde se colocó 10 ml de 0.4 mol/l de HCl, 10 ml de 0.03 mol/l FeCl₃ y 10 ml de 20 g/100 g de ácido sulfosalicílico. Se llevó a baño María a 90 °C durante 15 minutos evitando la evaporación de la solución y se enfrió. La muestra se centrifugó de nuevo a 5000 rpm durante 10 minutos, se decantó, se filtró y se lavó varias veces con agua destilada. El sobrenadante obtenido se llevó a 100 ml donde se tomó una alícuota de 20 ml y se ajustó el pH a 2.5 ± 0.5 con hidróxido de amonio al 30%. La solución con pH se llevó nuevamente a 200 ml, se calentó a 70-80 °C y se tituló en caliente con EDTA al 99%. La relación atómica usada para calcular el contenido de ácido fítico es Fe/P 4:6.

Proteína cruda. La medición de proteína cruda se realizó usando el método AOAC 2001.11. El método se desarrolló con los procesos de digestión, destilación y titulación.

Cuantificación de calcio. La medición de calcio se realizó según el método AOAC 985.35 con el uso de espectrofotometría de absorción atómica Varian SPECTRA AA 240. Se pesó 3.000 ± 0.005 g de muestra con un duplicado en crisoles y se incineró a $575\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 horas en la mufla Sybron Thermolyne.

Cuantificación de fósforo. La medición de fósforo se realizó según el método AOAC 985.35 con el uso de espectrofotometría de azul de molibdeno.

Análisis microbiológico de leguminosas pregerminadas.

El análisis microbiológico se realizó mediante una muestra compuesta por 10 g de haba, lupino y arveja pregerminadas en el día 6. Los análisis microbiológicos establecidos en brotes o pregerminados son *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. para asegurar su consumo y reducir el riesgo de producir brotes de ETAS (FDA 2017).

Análisis microbiológicos para determinación de *Escherichia coli* mediante coliformes totales. El método mediante el cual se determinó coliformes totales y fecales es Número Más Probable (NMP). La prueba presuntiva inició con las diluciones realizadas en 9 ml de agua peptonada de las cuales se transfirió 1 mL a los tubos con 9 mL de caldo Lauril (CL) que deben contener la campana de fermentación (CLT). Las diluciones que se realizó son (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Se incubó los tubos de NMP a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas tomando los primeros datos a las 24 horas. Si se encuentran tubos con presencia de gas en las primeras 24 horas se debe realizar pruebas confirmatorias para coliformes totales y fecales.

Según el (RTCA 2009) la harina de leguminosas entraría dentro del sub grupo 6 como producto a base de leguminosas por lo tanto los microorganismos que se analizó para asegurar la inocuidad de la harina es *Escherichia coli*.

Diseño experimental y análisis estadístico. Para la formulación de la harina de leguminosas pregerminadas enriquecida con harina de cáscara de huevo se utilizó un diseño Bloques Completos al Azar (BCA) con 3 tratamientos (leguminosas) y variables días (0, 3 y 6). Se realizó el análisis estadístico por separado para calcio, ácido fítico y proteína. Los datos recolectados fueron procesados en el software estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4 ®).

Una vez obtenidos los resultados se procedió a formular la harina con la leguminosa que presentó mayor contenido de proteína y se fortificó con harina de cáscara de huevo para alcanzar valores diarios de 1200 mg de calcio por porción.

Fase II. Elaboración de harina de cáscara de huevo.

Las cáscaras de huevo se lavaron con agua y luego fueron sumergidas durante 15 minutos para facilitar la extracción de la membrana testácea. Posteriormente se desinfectó en una solución clorada con hipoclorito de calcio al 70% durante 15 minutos y se las colocó en bandejas de aluminio. Las bandejas fueron llevadas al horno NAPCO® modelo 630, donde se aplicó tratamiento térmico a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas. Las cáscaras de huevo secas se molieron en el molino de disco Perten Laboratory Mill 3310 y se realizó la criba con tamiz

número 20 para obtener un tamaño de partícula de 250 µm. Para evitar contaminación cruzada durante el proceso de molido se llevó al horno nuevamente a 95 °C por 2 horas.

Cuantificación de calcio. La medición de calcio se realizó según el método AOAC 985.35 El método usa la base de cenizas donde se aseguró usar crisoles libres de contaminación de calcio residual.

Análisis microbiológico. El análisis microbiológico que se realizó es determinación de *Escherichia coli* mediante NMP el mismo que se realizó en el análisis microbiológico de leguminosas.

Fase III. Formulación de harina enriquecida con harina de cáscara de huevo.

Análisis químico. Se realizaron nuevamente los análisis de la primera etapa: determinación de ácido fítico, cuantificación de calcio según el método AOAC 985.35 y cuantificación de proteína según el método AOAC 2001.11.

Determinación de calcio soluble en harina de leguminosas y cáscara de huevo. Para la determinación de calcio soluble se realizó una solución de HCl y agua destilada a un pH de 2 para simular las condiciones de acidez del estómago, se pesó 1 g de la harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo. Se coló en un Beaker la solución de HCl y el gramo de harina se calentó hasta 37 °C y se agito durante 3 horas. Se realizó la medición de calcio con espectrofotómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3000.

Análisis físicos.

Granulometría. Se determinó granulometría mediante el método de Granulometría (Tyler) AOAC 965.22. Donde se usaron 100 g de la muestra de harina de leguminosas pregerminadas con harina de cáscara de huevo.

Color. Se determinó mediante el análisis color Hunter L*a*b*, método AN 1018.00 donde se utilizaron aproximadamente 3 g de harina para realizar cada medición.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis estadístico de determinación de calcio, ácido fítico y proteína en harina de leguminosas (lupino, alverja y haba) pregerminadas en los días 0, 3 y 6.

Ácido fítico. No se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos de leguminosas en el contenido de ácido fítico (Cuadro 1), este comportamiento nos indica que las condiciones de pregerminación ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90% de humedad) no fueron las más favorables para el desarrollo de las leguminosas.

Cuadro 1. Efecto de la pregerminación sobre el contenido de ácido fítico en leguminosas en los días 0, 3 y 6.¹

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Ácido fítico mg/g	0	3	6
Lupino	5.93 \pm 0.10	5.54 \pm 0.10	4.57 \pm 0.68
Alverja	2.56 \pm 0.03	2.53 \pm 0.58	3.40 \pm 0.29
Haba	3.37 \pm 0.84	3.60 \pm 0.49	3.40 \pm 0.29
C.V.	6.10	10.97	15.69

1. No se encontró diferencia significativa entre los días de pregerminación de cada tratamiento ($P < 0.05$)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

El contenido de ácido fítico en las semillas puede variar entre cultivos debido al tipo de manejo, localización, aplicaciones de fertilizantes fosfatados y la variedad en leguminosa (Frontela 2007). El lupino, haba y alverja son cultivados en Ecuador y se realizan aplicaciones de fertilizantes durante su desarrollo para mejorar el contenido de fósforo en el suelo y mejorar la nutrición de la planta (Basantes 2015). Se debe tomar en cuenta que el método de determinación de ácido fítico se realiza mediante titulación indirecta lo que origina un mayor coeficiente de variación entre resultados ya que puede reaccionar con interferencias químicas presentes en las muestras (García *et al.* 1982).

Se encontró diferencia significativa entre los días de pregerminación para cada tratamiento en el contenido de ácido fítico en los días 0, 3 y 6 en el tratamiento alverja (Cuadro 2). Este

comportamiento indica que los días de pregerminación establecidos para el tratamiento alverja sí produjeron un cambio significativo en el contenido de ácido fítico.

Cuadro 2. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de ácido fítico en leguminosas en los días 0, 3 y 6.

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Ácido fítico mg/g	0	3	6
Lupino	5.93 \pm 0.10 A	5.54 \pm 0.10 A	4.57 \pm 0.68 A
Alverja	2.56 \pm 0.03 B	2.53 \pm 0.58 B	3.40 \pm 0.29 B
Haba	3.37 \pm 0.84 A	3.60 \pm 0.49 A	3.40 \pm 0.29 A
C.V.	6.10	10.97	15.69

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

La germinación consta de factores como agua, oxígeno, temperatura, iluminación que inciden directamente sobre los factores hormonales para el desarrollo de la germinación, estos factores son diferentes para cada semilla, la deficiencia de uno de estos factores puede inactivar la germinación y a su vez se inhibir el proceso enzimático (Ojeda *et al.* 2012). La inactivación del proceso enzimático producido por una germinación deficiente afecta directamente sobre la enzima fitasa endógena reduciendo la asimilación del ácido fítico (Sanz y Haros 2012).

Calcio. Se encontró diferencia significativa entre tratamientos sobre el contenido de calcio siendo la alverja el único tratamiento que no presentó variación en su contenido durante la pregerminación (Cuadro 3). El contenido de calcio inicial varía según la reserva y conformación de la semilla de la leguminosa.

Cuadro 3. Efecto de la pregerminación sobre el contenido de calcio en leguminosas en los días 0, 3 y 6.

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Calcio mg/100g	0	3	6
Lupino	77.27 \pm 2.23 A	122.17 \pm 0.86 B	107.36 \pm 0.11 B
Alverja	54.15 \pm 0.67 A	72.11 \pm 0.53 A	66.67 \pm 2.74 A
Haba	98.91 \pm 0.73 A	125.01 \pm 0.19 B	112.34 \pm 0.98 B
C.V.	6.10	10.97	15.69

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los días de pregerminación de cada tratamiento ($P < 0.05$)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

Un estudio de germinación de amaranto, quinua y guandú demostró que el contenido de calcio en la germinación tiende a aumentar en los primeros días debido a la acción de las enzimas fitasas lo que lo vuelve más disponible, en los días siguientes el contenido tiende a bajar debido al consumo de calcio en formación de estructura (Chaparro *et al.* 2011).

Se encontró diferencia significativa entre días para cada tratamiento en el contenido de calcio para el tratamiento alverja en los días de pregerminación 3 y 6 (Cuadro 4). El tratamiento alverja presentó valores inferiores de calcio durante el proceso de pregerminación a diferencia del tratamiento lupino y haba.

Cuadro 4. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de calcio en leguminosas en los días 0, 3 y 6.

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Calcio mg/100g	0	3	6
Lupino	77.27 \pm 2.23 A	122.17 \pm 0.86 A	107.36 \pm 0.11 A
Alverja	54.15 \pm 0.67 A	72.11 \pm 0.53 B	66.67 \pm 2.74 B
Haba	98.91 \pm 0.73 A	125.01 \pm 0.19 A	112.34 \pm 0.98 A
C.V.	6.10	10.97	15.69

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

El calcio es el mineral usado como catalizador en la acción enzimática de proteasas, estas enzimas son responsables de la proteólisis de la proteína que se encuentra como reserva en la semilla con la finalidad de obtener aminoácidos sencillos para ser usados en la producción de energía y estructuras (Pita y Pérez 1998). Los aminoácidos sencillos son requeridos para la producción de biomasa que conformará la nueva planta por lo tanto a mayor producción de estructuras se consumirá más proteína al igual que calcio.

Proteína. Se encontró diferencia significativa únicamente en el tratamiento lupino debido a que presentó un alto contenido de proteína durante la pregerminación a diferencia de los tratamientos alverja y haba (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la pregerminación sobre el contenido de proteína en leguminosas en los días 0, 3 y 6.

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Proteína %	0	3	6
Lupino	40.50 \pm 0.97 A	26.35 \pm 2.10 B	26.83 \pm 0.93 B
Alverja	20.37 \pm 3.03 A	19.85 \pm 2.26 A	16.97 \pm 0.41 A
Haba	25.18 \pm 0.51 A	21.03 \pm 1.42 A	19.19 \pm 0.60 A
C.V.	6.10	10.97	15.69

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los días de pregerminación de cada tratamiento (P<0.05)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

Las semillas almacenan proteínas para ser usada como fuente de energía y aminoácidos cuando inicia el proceso de germinación la proteína será sintetizadas para ser usada en funciones biológicas (Ojeda *et al.* 2012).

Se encontró diferencia significativa entre días para cada tratamiento en el contenido de proteína en los días 0 y 6 de pregerminación siendo el lupino el tratamiento diferente (Cuadro 6). El tratamiento haba y alverja presentó reducción en el contenido de proteína durante la pregerminación.

Cuadro 6. Efecto de la pregerminación entre tratamientos sobre el contenido de proteína en leguminosas en los días 0, 3 y 6.

Tratamientos	Días de pregerminación		
	Media \pm D.E.		
Proteína %	0	3	6
Lupino	40.50 \pm 0.97 A	26.35 \pm 2.10 A	26.83 \pm 0.93 A
Alverja	20.37 \pm 3.03 B	19.85 \pm 2.26 A	16.97 \pm 0.41 B
Haba	25.18 \pm 0.51 B	21.03 \pm 1.42 A	19.19 \pm 0.60 B
C.V.	6.10	10.97	15.69

Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05)

D.E. Desviación estándar obtenida de dos repeticiones del ensayo

C.V. Coeficiente de variación

La proteína de reserva en la semilla es desdoblada a partir de enzimas proteasas para obtener aminoácidos que servirá como fuente de energía para suplir la necesidad de glúcidos hasta que la plántula pueda producir proteína a partir de la absorción de aminoácidos presentes en el suelo como nitratos de amonio (Pita y Pérez 1998). Este comportamiento llevará al

consumo de la reserva de proteínas para cumplir con los procesos fisiológicos y metabólicos durante la germinación.

Comparación de ácido fítico y fósforo presente en el lupino. El 60-90% del fósforo total presente en la planta pertenece al fitato, el fitato puede ser sintetizado por fitasas liberando fósforo disponible en la planta el cual será usado en la producción de energía, el fósforo es sintetizado por glucosa 6-P para pasar a formar parte del proceso de producción de energía (Frontela 2007). El contenido de fósforo y ácido fítico no puede ser asociado al encontrarse en diferentes proporciones en la semilla pero la reducción lineal encontrada en el contenido de ácido fítico y fósforo (Figura 1) indica que existe una reducción en el consumo de fosforo total lo cual nos permite afirmar que el método determinación del ácido fítico por valoración complexométrica del exceso de hierro (III) obtuvo resultados aceptables evidenciados en pregerminación (Ojeda et al. 2012).

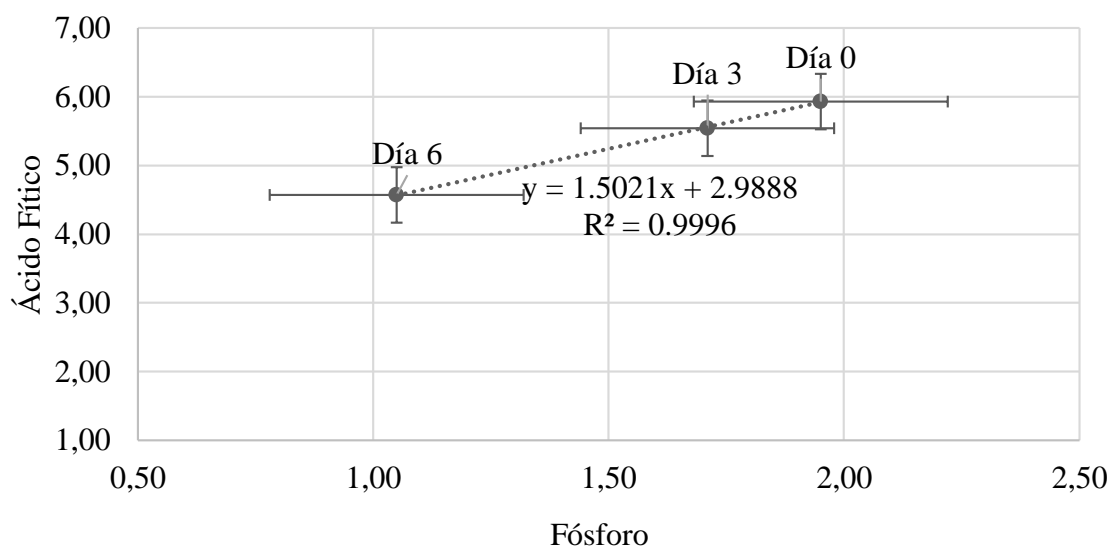


Figura 2. Comparación de ácido fítico y fósforo en mg/g presente en harina de lupino en los días 0, 3 y 6.

Contenido de calcio en harina de cáscara de huevo. Estudios realizados en composición de harina de cáscara de huevo determinaron una concentración de 57.00 mg/g de calcio el cual pertenece en mayor porcentaje al carbonato de calcio fijado en el oviducto por las aves de postura, este contenido puede variar según el tipo de alimentación y raza (Valdés *et al.* 2009). El contenido obtenido de calcio presente en la cáscara de huevo en aves de la raza Cobb 50 fue mayor (Cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido de calcio en harina de cáscara de huevo

Muestra	Calcio mg/g Media ± D.E.
Harina de cáscara de huevo	90.45 ± 5.06

D.E. Desviación estándar del triplicado de ensayo de una muestra

Análisis microbiológicos.

Según la FDA (2017) se deben realizar análisis microbiológicos en brotes o semillas pregerminadas debido a su tipo de consumo como alimento crudo, pero los parámetros de conteos microbiológicos no están establecidos hasta la actualidad. Se tomaron los valores de legumbres y vegetales crudos con un límite máximo <3 NMP/g para las leguminosas pregerminadas y para alimentos que contengan partes de huevo <3 NMP/g para la harina de cascara de huevo, ambos valores para conteo de coliformes totales (RTCA 2009). El conteo no superó el límite máximo (Cuadro 3) por lo cual estos ingredientes están aptos para el consumo y se consideran aceptables para constituir la harina de leguminosas enriquecida con cáscara de huevo.

Cuadro 8. Resultados de análisis microbiológicos para determinación de coliformes totales en fase I y II.

Muestra	Límite máximo	Conteo
Leguminosas pregerminadas	<3 NMP/g	<3 NMP/g
Harina de cáscara de huevo	<3 NMP/g	<3 NMP/g

NMP: Número más probable

Caracterización de harina.

La leguminosa con la cual se realizó la harina de leguminosas pregerminadas para enriquecer con cáscara de huevo fue el lupino en el día 6 por presentar mayor contenido de proteína (Cuadro 5). Se aplicó la harina de cáscara de huevo hasta alcanzar 1200 mg/100g tomando en cuenta el contenido de calcio que la harina de lupino pregerminado poseía inicialmente. La formulación está constituida por 80 g de harina de lupino pregerminado en el día 6: 20 g de harina de cáscara de huevo. Se realizaron pruebas químicas de: calcio, proteína, ácido fítico, calcio soluble y pruebas físicas de color y granulometría.

En Ecuador el Ministerio de Salud Pública indica que existen deficiencias nutricionales de calcio y proteína en la población adulta mayor, del total de la población entre los 50 a 70 años el 97% no cumple con los requerimientos diarios de calcio y el 9% no cumple con el requerimiento diario de proteína (Freire *et al.* 2014).

Análisis químico de harina de lupino pregerminado en el día seis.

Cuantificación de calcio, ácido fítico y proteína. El contenido de ácido fítico encontrado en las semillas de lupino crudo y sin realizar ningún tratamiento previo fue de 9.412 mg/g y 40.5 mg/100g de calcio. El análisis se realizó en la variedad INIAP ANDINO (Riera 2011). Se observa una mejora en la harina de leguminosa tanto en calcio y ácido fítico debido a que el contenido de calcio disminuye según aumentan los días de pregerminación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuantificación de calcio, ácido fítico y proteína en harina de lupino pregerminado en el día 6.

Muestra	Calcio mg/100g Media ± D.E.	Ácido fítico mg/g Media ± D.E.	Proteína % Media ± D.E.
Lupino pregerminado en el día 6	107.25 ± 0.06	4.77 ± 0.44	25.94 ± 0.48

D.E. Desviación estándar del triplicado de ensayo de una muestra

Determinación de calcio soluble. Pruebas *in vitro* realizadas en gallinas a las cuales suministraron fuentes de carbonato de calcio mostraron un incremento de masa ósea en las tibias en comparación a aves a las cuales no se les suministró, análisis de solubilidad de calcio indicaron que a menor tamaño de partícula más soluble es el calcio y se puede obtener una mayor recuperación (Buendía 2013). La harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo contenía 1200 mg/100g de calcio y se recuperó un 85% calcio soluble (Cuadro 4) , el tamaño de partícula de la harina de cáscara de huevo fue de 850 μ m.

Cuadro 10. Determinación de calcio en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo.

Muestra	Calcio mg/100g Media ± D.E.
Harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo	1023.93 ± 5.72

D.E. Desviación estándar del triplicado de ensayo de una muestra

Análisis físicos de harina de lupino pregerminado en el día seis.

Granulometría. La granulometría es importante para definir la homogeneidad del producto final. En el cuadro 11 se detalla la distribución granulométrica donde se observa que el 95% de la harina de lupino enriquecida con cascara de huevo tiene un tamaño mayor a 250 μ m.

Cuadro 11. Granulometría en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo.

Abertura (μm)	Retención (%)
850	0
600	41.20
425	32.27
250	21.15
150	5.08
Fondo	0.30

Color. Análisis realizados en harina de lupino en condiciones de almacenamiento analizado mediante Colorflex indicó que la harina posee valores menores a uno en la escala del color amarillo y esto se debe a la tonalidad “beige claro” (Mezquita *et al.* 2011).

Estos valores se obtienen de: L* indica claridad- oscurecimiento, a* color rojo (+) o verde (-) y b* color amarillo (+) o azul (-). El color es un parámetro que nos permite conocer la homogeneidad del producto final y asegurar su calidad en este caso la harina debido a las escalas de L*, a* y b* presenta una tonalidad de amarillo claro (Cuadro 12).

Cuadro 12. Determinación de color en harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo.

Muestra	L* \pm D.E.	a* \pm D.E.	b* \pm D.E.
Harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo	77.03 \pm 0.41	3.61 \pm 0.33	31.43 \pm 0.25

D.E. Desviación estándar

Etiqueta nutricional. El Codex Alimentarius (CAC/GL 1-1979) declara como fuente de proteína (10 g) y alto contenido de calcio (30%) según el mínimo de IDR para 100g en sólidos (Morán 2010). La harina de lupino pregerminado fortificado con cáscara de huevo cumple con los requisitos de Codex Alimentarius para ser declarado como fuente de proteína y alto contenido de calcio por contener 16 g de proteína y cumplir con el 80% del requerimiento de calcio diario (Figura 2).

Nutrition Facts	
Datos de Nutrición	
8 approx servings per container 8 aprox Raciones por Envase	
Serving size	1 piece (60g)
Tamaño por Ración	1 pieza (60g)
Amount per serving / Cantidad por ración	
Calories / Calorías	210
% Daily Value* / % Valor Diario*	
Total Fat / Grasa Total 2.5g	3%
Saturated Fat / Grasa Saturada	0g
<i>Trans</i> Fat / Grasa <i>Trans</i>	0g
Cholesterol / Colesterol 0mg	0%
Sodium / Sodio 0mg	0%
Total Carbohydrate / Carbohidratos Total 34g	12%
Dietary Fiber / Fibra Dietética	2g
Total Sugars / Total Azúcares	8g
Includes 0g Added Sugars / Incluye 0g Azúcares Añadidos	0%
Protein / Proteínas 16g	
Vitamin D / Vitamina D	0mcg
Calcium / Calcio	1083mg
Iron / Hierro	1mg
Potassium / Potasio	204mg
*The % Daily Value tells you how much a nutrient in a serving of food contributes to a daily diet. 2,000 calories a day is used for general nutrition advice.	
*El porcentaje de Valor Diario indica la cantidad de un nutriente en una porción de alimento contribuye a una dieta diaria. 2,000 calorías al día se utiliza para el consejo general de la nutrición.	

Figura 2. Etiqueta nutricional para harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo.

4. CONCLUSIONES

- La pregerminación bajo las condiciones del estudio es un método efectivo para disminuir el ácido fítico en lupino e incrementar calcio a pesar de la reducción de proteína en las tres leguminosas.
- Lupino fue leguminosa pregerminada con la cual se elaboró la harina de leguminosas enriquecida con cáscara de huevo en el día seis debido a que presentó mayor contenido de proteína.
- La aplicación de harina de cáscara de huevo incrementó el contenido de calcio en la harina de lupino logrando cubrir el 80 % de la recomendación diaria para una persona adulta.
- La harina de lupino enriquecida con cáscara de huevo puede ser declarada según el Codex Alimentarius (CAC/GL 1-1979) con alto contenido de calcio y fuente de proteína.

5. RECOMENDACIONES

- Determinar días y condiciones específicas de pregerminación para alverja y haba para evidenciar reducción de ácido fítico.
- Realizar perfil de aminoácidos para harina de lupino pregerminado y enriquecido con cáscara de huevo.
- Determinar la biodisponibilidad del carbonato de calcio de la harina de cáscara de huevo y analizar el tamaño de partícula.
- Realizar un análisis sensorial para determinar la aceptación de la harina de lupino pregerminado y enriquecido con cáscara de huevo.
- Realizar el análisis de costos de la harina de lupino enriquecido con cáscara de huevo.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar C, Hevia P, Núñez M. 2014. Minerales, Ácido Fítico y γ -Oryzanol en harinas integrales y salvados de trigo: EBSCO host. Anales Venezolanos de Nutrición; [accessed 2017 Jul 17]. Vol. 27 Issue 2, p252-257. 6p. <http://web.a.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=2&sid=86ca6dcb-d0f2-4f89-a38812c2a6749e56%40sessionmgr4010&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl>.

(AOAC) Association of Analytical Communities. 2005. Official Method 965.22 Sorting Corn Grits. 18th Edition. United States of America. ISBN: 0-935584-83-8; [accessed 2017 Jul 17].

(AOAC) Association of Analytical Communities. 2005. Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oil seeds. 18th Edition. United States of America. ISBN: 0-935584-83-8; [accessed 2017 Jul 17].

(AOAC) Association of Analytical Communities. 2005. Official Method 985.35 Minerals in Infant Formula, Enteral Products, and Pet Foods Atomic Absorption Spectrophotometric Method. 18th Edition. United States of America. ISBN: 0-935584-83-8; [accessed 2017 Jul 17].

Basantes E. 2015. Manejo de cultivos en Ecuador; [accessed 2017 Sep 18]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10163/4/Manejo%20Cultivos%20Ecuador.pdf>.

Bestard J. 2014. Fitato: Estudios sobre su actividad biológica y los efectos sobre la prevención de las calcificaciones patológicas. España; [accessed 2017 Sep 16]. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9457/tjpb.pdf>.

Baudes J, Sanchís PJ, Grases F. 2017. Fosfatos de origen vegetal, fitato y calcificaciones patológicas en la enfermedad renal crónica. Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología. 37(1):20–28. doi:10.1016/j.nefro.2016.07.001.

Buendía M. 2013. Determinación de la solubilidad del carbonato de calcio, conchuela y su evaluación biológica en pollos de carne. Perú; [accessed 2017 Sep 16]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1605/Q54.B9DT.pdf?sequence=1>.

Cáceres P. 2015. Optimización de la germinación de variedades de arroz integral para la obtención de alimentos con alto valor nutritivo y funcional. Universidad Autónoma de

Madrid; [accessed 2017 Jan 8]. <http://Users/stephany.aguirre/Downloads/T-SENECYT-01242.pdf>

Capo M. 2002. Importancia de la nutrición en la persona de edad avanzada. Novartis Consumer Health S.A; [accessed 2017 Sep 16]. 1era. Edición. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion/importancia_de_la_nutricion_en_la_tercera_edad.pdf.

Castillo J, Belmar R, Trejo W. 2016. Contribución de las leguminosas en la agroecología y alimentación animal en la región peninsular maya de México: Revista de agroecología. Leisa. 32(2). <http://www.agriculturesnetwork.org/wp-content/uploads/2016/12/vol32n2-1.pdf>.

Chaparro D, Pismag R, Elizalde A. 2011. Efecto de la germinación sobre el contenido de hierro y calcio en amaranto, quinua, gandul y soya. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial; [accessed 2017 Aug 15]. 9(1). [file:///C:/Users/stephany.aguirre/Downloads/173-624-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/stephany.aguirre/Downloads/173-624-1-PB%20(1).pdf).

Courtis A. 2013. Germinación de semillas: Cátedra de Fisiología Vegetal. España: UNNE; [accessed 2017 Jul 17]. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Guiadeestudio-Germinacion.pdf>.

FAO. 2016. Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible. ISBN: 978-92-5-309463-9; [accessed 2017 Sep 18]. <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>.

FDA. 2017. Cumplimiento y recomendaciones para la aplicación de las normas para el cultivo, la cosecha, el embalaje, y la producción de brotes para el consumo humano Operaciones: Guía para la industria; [accessed 2017 Jul31]. <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/UCM537031.pdf>.

Freire W, Ramirez M, Belmont P. 2014. Escuela Nacional de Salud y Nutrición ENSANUT- ECU 2012. 1st ed. Ecuador. ISBN: 978-9942-07-659-5; [accessed 2017 Sep 18]. http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/MSP_ENSANUT-ECU_06-10-2014.pdf.

Frontela C. 2007. Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral *in vitro* en papillas infantiles. España; [accessed 2017 Sep 18] <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2113/1/FrontelaSaseta.pdf>.

Frontela C, Ros G, Martínez C. 2008. Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos: Departamento de Tecnología de Alimentos. Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Archivos Latinoamericanos de nutrición; [accessed 2017 Jul 17]. Vol. 58 N° 3. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2008/3/art-1/>.

García R, García J, Lope C. 1982. Determinación de ácido fítico por titulación complejo métrica del exceso de hierro (III). The Analyst; [accessed 2017 Oct 8]. 107(1281):1503. doi:10.1039/an9820701503.

Gonzales L, Valencia A, Sampedrom H, Nájera J. 2007. Las proteínas en la nutrición. RESPYN; [accessed 2017 Sep 17]. 8 No. 2. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsal/pubnut/spn-2007/spn072g.pdf>.

HunterLab. 2016. ColorFlex EZ, especificaciones técnicas [internet]. Estados Unidos: Hunter Associates Laboratory; [accessed 2017 Sep 17]. <https://www.hunterlab.com/colorflex-ez-spectrophotometer.html>

(INFAC) Información farmacoterapéutica de la Comarca. 2013. Suplementos de calcio, osteoporosis y riesgo cardiovascular. 21 LIBURUKIA. 21(4). http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/INFAC_Vol_21_N_4.pdf.

Martínez M, Luna F, Peña A. 2013. Manual de osteoporosis. Barcelona: EdikaMed. ISBN: 9788478777570.

Mera M, Rouanet J. 2013. Contribución de las Leguminosas de Grano en Rotación con Cereales: Una Revisión. Chile: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. <http://www.sap.uchile.cl/descargas/rotaciones/Contribucion%20de%20las%20leguminosas%20.PDF>.

Mezquita, Urtucia, Ramirez, Arcos. 2011. Desarrollo de producto sobre la base de harinas de cereales y leguminosa para niños celíacos entre 6 y 24 meses; II: Propiedades de las mezclas. Nutr Hosp; [accessed 2017 Sep 16]. 1:161–169.http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n1/originales_12.pdf.

Morán J. 2010. Etiquetado y uso de declaraciones de propiedades nutricionales: Base regulatoria: Codex Alimentarius. España; [accessed 2017 Sep 18]. <http://www.foodconsulting.es/wp-content/uploads/ Etiquetado-y-uso-de-declaraciones-de-propiedades-nutricionales.pdf>.

Ojeda Á, Villavicencio I, Linares Z. 2012. Fósforo fítico y actividad de fitasa en fórmulas infantiles basadas en cereales: Instituto de Producción Animal. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Archivos Latinoamericanos de nutrición; [accessed 2017 Jul 17]. Vol. 62 N° 4.

Palacios S, Hernández K. 2009. Osteoporosis. Barcelona: Amat (El médico en casa). ISBN: 9788497352758.

Perales E, Mota E. 1999. Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas. Gac Méd Méx; [accessed 2017 Jul 17]. 135(135). http://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1999-135-3-291-304.pdf.

Pita M, Pérez F. 1998. Germinación de semillas. España: Hojas divulgadoras. ISBN: 84-491-0356-8; [accessed 2017 Sep 18].http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf.

Quesada J, Sosa M. 2010. Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2011; [accessed 2017 Jul 17]. 3:165–166. <http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com/pdf/articulos/12011030401650182.pdf>.

Riera M. 2011. Estudio de la acción fuertemente quelante del ácido fítico como factor anti nutricional en granos andinos y su incidencia en la baja biodisponibilidad de minerales. Carrera de ingeniería bioquímica [Tesis] Universidad Técnica de Ambato: Ecuador; [accessed 2017 Sep 18]. http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/bitstream/41000/870/1/iniap_sctR548est.pdf.

Rodríguez J, Bartosik R. 2016. Secado de Granos: Proyecto eficiencia de cosecha y post cosecha. Argentina: PRECOP INTA; [accessed 2017 Sep 18]. [file:///C:/Users/stephany.aguirre/Downloads/folletosecadogranos%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/stephany.aguirre/Downloads/folletosecadogranos%20(1).pdf).

RTCA. 2009. Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. [España]. RTCA 67.04.50:08. http://www.msp.gov.gt/images/files/d_rca/normativasvigentes/RTCACriteriosMicrobiologicos.PDF.

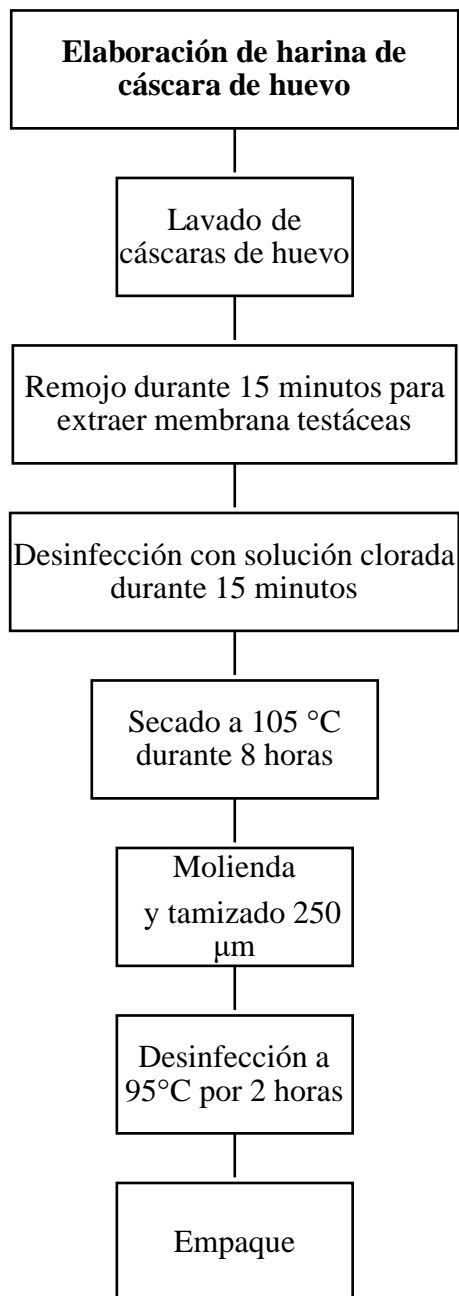
Sanz J, Haros M. 2012. Nuevas estrategias para incrementar la calidad nutricional de productos de panadería. Efectos sobre el contenido de fitatos y la biodisponibilidad de hierro en CACO-2. España: Universidad Politécnica de Valencia; [accessed 2017 Sep 18]. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/47888/1/TESIS%20Juan%20Mario%20Sanz.pdf>.

Silva A. 2010. Evaluación clínica nutricional a trastornos metabólicos de osteoporosis y osteopenia. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del litoral; [accessed 2017 Jul 17]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/19733/1/Guia%20de%20articulo%20osteoporosis.pdf>.

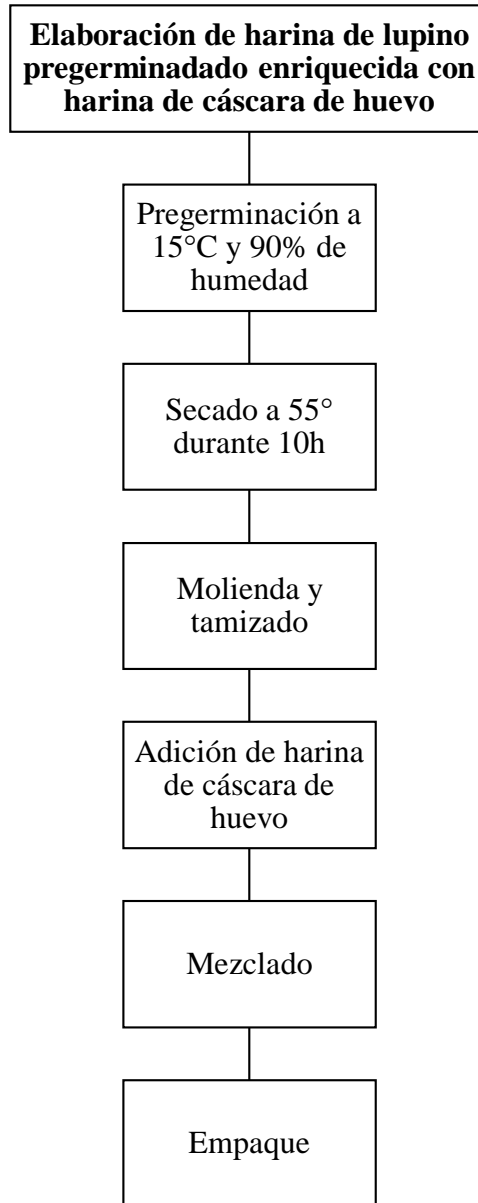
Valdés J. 2009. La cáscara del huevo: ¿desecho o valor agregado para la salud humana y la producción avícola? Una experiencia cubana. *Revista Cubana Aliment Nurt*; [accessed 2017 Sep 18]. 1:S84S102. http://www.revicubalimentanut.sld.cu/Vol_19_1_Suplemento/Ponencia%20Jesus%20Valdes.pdf.

7. ANEXOS

Anexo 1. Flujo de proceso para elaboración de harina de cáscara de huevo.



Anexo 2. Flujo de proceso para elaboración de harina de leguminosas pregerminadas enriquecida con cáscara de huevo.

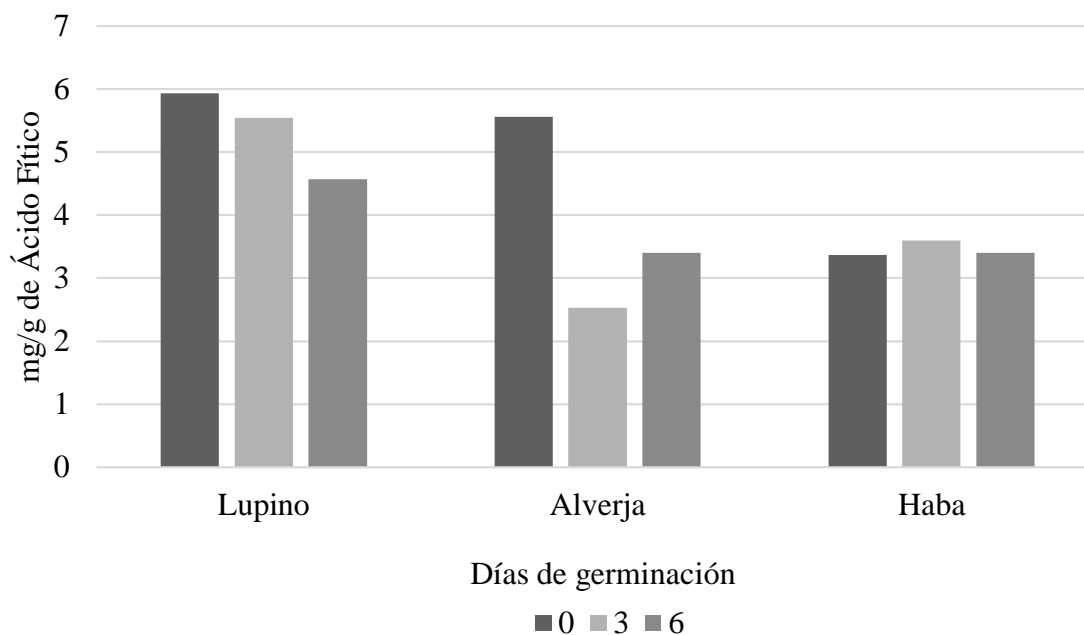


Anexo 3. Límite máximo permitido según el RTCA en el conteo de coliformes para productos elaborados a partir de leguminosas.

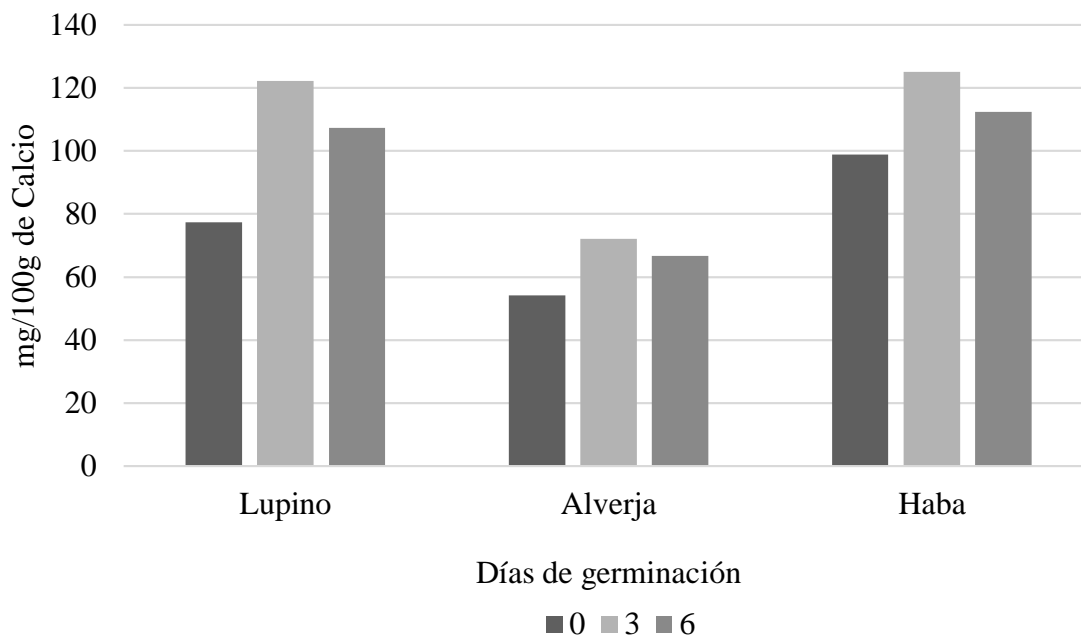
6.0 Grupo de alimento: Producto elaborado a partir de cereales. Cereales y productos a base de cereales derivados de granos de cereales, de raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas, extruidos los productos de panadería de la categoría de alimentos 7.0.			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	5	C	<3 NMP/g

(RTCA 2009)

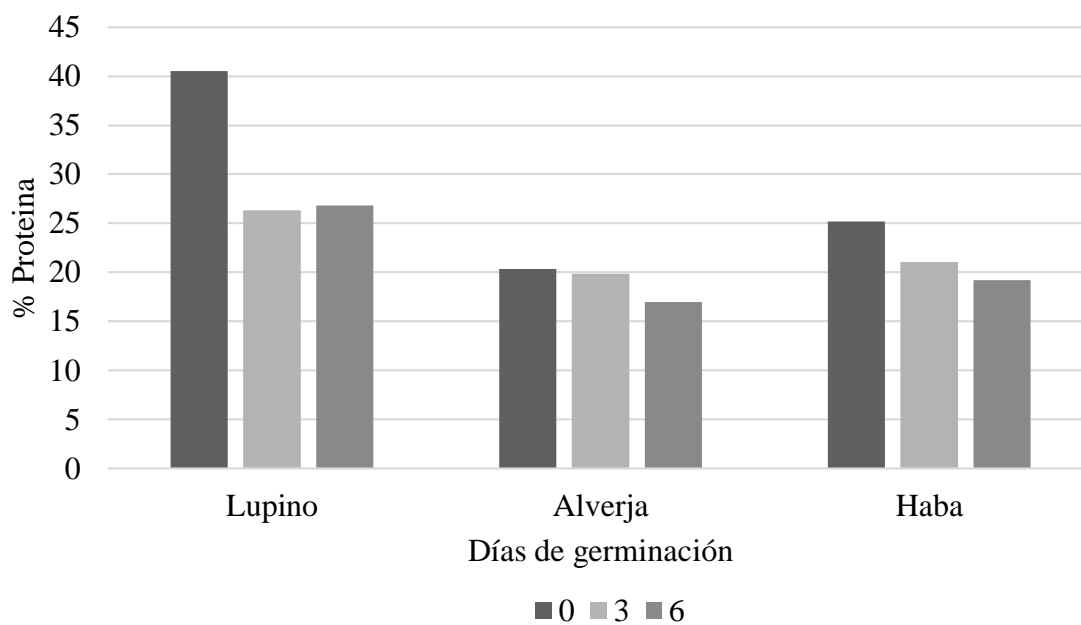
Anexo 4. Comportamiento de ácido fítico en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.



Anexo 5. Comportamiento de calcio en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.



Anexo 6. Comportamiento de proteína en los días 0, 3 y 6 presente en semillas de leguminosas.



Anexo 7. Síntesis SAS 9.4 para análisis de ácido fólico, calcio y proteína entre tratamientos.

Ácido fólico.

TRT	DIAS	AF LSMEAN	Standard 0.4593479	Pr > t 	LSMEAN Number	Diferencia de medias
Lu	3	5.54191	0.4593479	<.0001	8	A
Lu	6	4.569645	0.4593479	<.0001	9	A B
Ha	3	3.59738	0.4593479	2E-04	5	B C
Ha	6	3.40293	0.4593479	3E-04	6	B C
Al	6	3.40293	0.4593479	3E-04	3	B C
Ha	0	3.37052	0.4593479	3E-04	4	B C
Al	0	2.5603	0.4593479	0.001	1	C
Lu	0	5.930815	0.45934789	<.0001	7	A
Al	3	2.52789	0.4593479	0.001	2	C

Calcio.

TRT	DIAS	AF LSMEAN	Standard Error	Pr > t 	LSMEAN Number	Diferencia de medias
Ha	3	125.013	7.40675	<.0001	5	A
Lu	3	122.168	7.40675	<.0001	8	AB
Ha	6	112.341	7.40675	<.0001	6	AB
Lu	6	107.362	7.40675	<.0001	9	AB
Ha	0	98.9089	7.40675	<.0001	4	BC
Lu	0	77.2705	7.40675	<.0001	7	CD
Al	3	72.1053	7.40675	<.0001	2	D
Al	6	66.6661	7.40675	0.0001	3	D
Al	0	54.153	7.40675	0.0003	1	D

Proteína.

TRT	DIAS	AF LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number	Diferencia de medias
Lu	0	40.5025	1.87398	<.0001	7	A
Lu	6	26.8342	1.87398	<.0001	9	B
Lu	3	26.3481	1.87398	<.0001	8	B
Ha	0	25.1771	1.87398	<.0001	4	BC
Ha	3	21.026	1.87398	<.0001	5	BCD
Al	0	20.3686	1.87398	<.0001	1	BCD
Al	3	19.8481	1.87398	<.0001	2	CD
Ha	6	19.194	1.87398	<.0001	6	CD
Al	6	16.9699	1.87398	0.0001	3	D

Anexo 8. Síntesis SAS 9.4 para análisis de ácido fítico, calcio y proteína entre días según tratamiento.

Calcio entre día 0, 3 y 6.

DIAS=0

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	98.91	2	Ha
A	77.27	2	Lu
A	54.15	2	Al

DIAS=3

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	125.0130	2	Ha
A	122.1679	2	Lu
B	72.1053	2	Al

DIAS=6

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	112.341	2	Ha
A	107.362	2	Lu
B	66.666	2	Al

Proteína entre día 0, 3 y 6.

DIAS=0

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	40.503	2	Lu
B	25.177	2	Ha
B	20.369	2	Al

DIAS=3

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	26.348	2	Lu
A	21.026	2	Ha
A	19.848	2	Al

DIAS=6

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	26.8342	2	Lu
B	19.1940	2	Ha
B	16.9699	2	Al

Ácido fítico entre día 0, 3 y 6.

DIAS=0

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	5.9308	2	Lu
B	3.3705	2	Ha
A	2.5603	2	Al

DIAS=3

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	5.5419	2	Lu
A	3.5974	2	Ha
A	2.5279	2	Al

DIAS=6

**Means with the same letter
are not significantly different.**

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	4.5696	2	Lu
A	3.4029	2	Ha
A	3.4029	2	Al