



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HARINA DE NUEZ
(*Juglans regia* L.), SUBPRODUCTO DE LA OBTENCIÓN DE
ACEITE, EN EL DESARROLLO DE BUDINES LIBRES DE GLUTEN**

Tesista:

Ing. en Alimentos. Juan José Burbano Moreano

Directora:

Dra. María Jimena Correa

Año:

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HARINA DE NUEZ
(*Juglans regia* L.), SUBPRODUCTO DE LA OBTENCIÓN DE
ACEITE, EN EL DESARROLLO DE BUDINES LIBRES DE GLUTEN**

Tesista:

Ing. en Alimentos. Juan José Burbano Moreano

Directora:

Dra. María Jimena Correa

Año:

2022

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos –CIDCA– (UNLP-CIC-CONICET) bajo la dirección de la Dra. María Jimena Correa. El mismo se desarrolló con fondos otorgados por la UNLP, la ANPCyT y el CONICET.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

Revistas indexadas internacionales

✓ BURBANO, JUAN J.; CABEZAS, DARÍO M.; CORREA, M. JIMENA. Effect of walnut flour addition on rheological, thermal and microstructural properties of a gluten free-batter. LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT UND-TECHNOLOGIE FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. ELSEVIER SCIENCE BV. 2022 vol.154 n°. issn 0023-6438.

✓ BURBANO, JUAN JOSÉ; CABEZAS, DARÍO MARCELINO; CORREA, MARÍA JIMENA. Gluten-free cakes with walnut flour: a technological, sensory, and microstructural approach. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC. 2022 vol. n°. issn 0950-5423.

✓ BURBANO, JUAN JOSÉ; CORREA, MARÍA JIMENA. Composition and Physicochemical Characterization of Walnut Flour, a By-product of Oil Extraction. PLANT FOODS FOR HUMAN NUTRITION. SPRINGER. 2021 vol.76 n°2. p233 239.issn 0921-9668.

Actas de congresos

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CABEZAS DARIO M; REPO-CARRASCO-VALENCIA RITVA; CORREA, MARIA JIMENA. CHARACTERIZATION OF GLUTEN FREE CAKE BATTER WITH WALNUT FLOUR: WATER MOBILITY AND TEXTURAL BEHAVIOR. Austria. Viena. 2021. Libro. Resumen. Congreso. 16th ICC Cereal and Bread Congress.

✓ CABEZAS, DARÍO M.; BURBANO JUAN JOSÉ; CORREA, M. JIMENA. Characterization of walnut flour by-product of oil extraction and its use in a gluten-free sponge cake. Estados Unidos de América. Urbana. 2021. Libro. Resumen. Exposición. Virtual 2021 AOCS Annual Meeting & Expo. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CABEZAS DARIO M; CORREA, MARIA JIMENA. EFECTO DE LA ADICIÓN DE HARINA DE NUEZ EN LAS PROPIEDADES TÉRMICAS DE UN BATIDO LIBRE DE GLUTEN. Uruguay. Montevideo. 2020. Libro. Resumen. Congreso. III Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos.

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CORREA, MARIA JIMENA. IMPACTO DE LA ADICIÓN DE HARINA DE NUEZ PARCIALMENTE DESENGRASADA EN LA CALIDAD PANADERA DE BUDINES SIN GLUTEN. Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2019. Libro. Artículo Completo. Congreso. XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CORREA, MARIA JIMENA. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE HARINA DE NUEZ COMERCIAL PARCIALMENTE DESENGRASADA. Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2019. Libro. Resumen. Congreso. XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CORREA, MARIA JIMENA. IMPACTO DE LA ADICIÓN DE HARINA DE NUEZ PARCIALMENTE DESENGRASADA EN LA CALIDAD PANADERA DE BUDINES SIN GLUTEN. Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2019. Libro. Resumen. Congreso. XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

✓ BURBANO JUAN; CORREA, MARIA JIMENA. Caracterización fisicoquímica y estabilidad oxidativa de harina de nuez parcialmente desengrasada. Argentina. Córdoba. 2018. Libro. Resumen. Congreso. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018).

✓ BURBANO JUAN; CORREA, MARIA JIMENA. Efecto de la adición de harina de nuez en la calidad panadera de budines libres de gluten. Argentina. San Rafael. 2018. Libro. Resumen. Congreso. 5° Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. CLICAP 2018.

✓ BURBANO JUAN JOSÉ; CORREA, MARIA JIMENA. Efecto de la utilización de harina de nuez en la calidad de budines libres de gluten durante el almacenamiento. Argentina. Córdoba. 2018. Libro. Resumen. Congreso. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018).

Dedico esta tesis a toda mi familia,

Muchas gracias por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Un agradecimiento gigante a todas las personas que han hecho que esta experiencia sea inolvidable.

- A mi genial directora, Jimena, por postular a un becario desconocido, arriesgarse y apoyarme durante toda esta experiencia. Por compartir conmigo sus conocimientos y su calidad como persona.

- A mi grupo de trabajo, desde las investigadoras Cecilia, Cristina, Paula y Vicky que siempre estaban pendientes de que todo esté bien. A mis amigos Angie, Barbie, Marie, Nati, Facu, Gabi, Leo y Lucho con quienes compartimos interminables horas en el laboratorio y fuera de él. Lucho muchas gracias por ser mi intérprete de argentino a neutro y viceversa.

- A mis amigos de oficina: Lu, Mica, Marti, Sil, Vane, Juan, Tincho y Camilo, integrante honorario, por el excelente ambiente de trabajo.

- A toda la gente increíble que labora en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por compartir momentos y experiencias, desde conversaciones mientras esperas el conteo regresivo en algún equipo o en alguna que otra fiesta. A todo el personal administrativo, por siempre saludarte y ayudarte con una sonrisa. A los becarios de otros grupos de trabajo: Andre, Florcita, Maga, Nina, Lau, Lu Valerga, Vera, Yuli, Alejo, Mati, por ese apoyo moral cuando algún experimento no salía bien. Y a los técnicos por compartir su experiencia, para que pueda crecer profesionalmente, en especial a Fer, Mari, Claudito y Javier por ayudarme con sus respectivos equipos.

- A Darío Cabezas, por su colaboración en las distintas publicaciones, por su predisposición con los equipos en la Universidad Nacional de Quilmes y su ayuda fuera del campo académico.

- Un especial agradecimiento a las doctoras: Dra. Sonia Ulic porque de no ser por ella, no hubiese sabido la existencia de las becas del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Dra. Mirari Arancibia por ser mi codirectora de beca, sin su experiencia mi postulación habría sido imposible.

- A Dra. Jacqueline Ortiz y Ab. Anita Del Pozo por su apoyo en los trámites administrativos para mi inscripción al doctorado y por sus palabras de ánimo.

- A la Universidad Nacional de la Plata, la Facultad de Ciencias Exactas y al CIDCA por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Argentina por su programa de becas doctorales para Países Latinoamericanos.

- A mis amigos internacionales Clau, Lu, Estefa, Ceci, JuanCa, Lean, Mainor, Mauro, y Pablo por todas las experiencias compartidas y momentos increíbles. En especial a Erik Andrés por ser mi mejor amigo en el colegio y coincidir acá por su maestría y por ser mi compañero de departamento por dos años.

- A mis amigos de ejercicio: Mili, Lau, Mari, Juani, Luquitas, y especialmente Valen y Esteban y a sus respectivas familias por recibirme y tratarme tan bien.

Muchas gracias a todas las personas que han contribuido para que a pesar de estar a 5857 km de mi tierra, me haya sentido como en casa.

Resumen

El subproducto de la extracción del aceite de nuez (*Juglans regia* L.) es una torta de prensado rica en ácidos grasos poliinsaturados y otros compuestos bioactivos. A partir de esta torta, se obtiene harina de nuez (HN) mediante un proceso de molienda.

Se caracterizó HN mediante la determinación de la composición proximal, el contenido en minerales y los perfiles de ácidos grasos y aminoácidos. Además, se determinó la capacidad antioxidante y la capacidad de retención de agua y aceite. HN tiene un alto contenido de lípidos (55 %), con una óptima relación $\omega 6/\omega 3$, una buena relación lisina/arginina y altos niveles de antioxidantes que contribuyen a su estabilidad oxidativa, siendo la vida útil estimada de 16 meses.

En cuanto a la interacción con otros ingredientes, la harina de nuez retuvo un 258 % y un 70 % (p/p) de agua y aceite, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados demuestran que HN es una buena fuente de micro y macronutrientes, en comparación con las harinas habitualmente utilizadas en panificación. Además, la harina de nuez presenta características tecno-funcionales idóneas para ser incorporada en productos de panadería, por lo que se estudió su aplicación en batidos y budines libres de gluten (GF, por sus siglas en inglés).

Sin embargo, para una correcta industrialización de los alimentos libres gluten, es importante conocer sus propiedades y su comportamiento durante el procesamiento, lo cual es aún más importante cuando se utilizan nuevos ingredientes. Con esta finalidad, se evaluaron los efectos de la adición de HN en diferentes niveles (0, 10, 15, 20 % (p/p) en base de mezcla de harinas) en las

propiedades reológicas, texturales, térmicas y microestructurales de los batidos GF. Las propiedades de empaste de la premezcla de harinas base (harina de arroz, fécula de mandioca y almidón de maíz) se vieron alteradas por la adición de la HN. Asimismo, el aumento de la concentración de HN en los batidos incrementó su firmeza, cohesividad e índices de consistencia y viscosidad.

En cuanto a la movilidad molecular de los componentes de los batidos, se encontró una disminución de los tiempos de relajación en los ensayos de RMN y de la cantidad de agua congelable, mientras que la transición vítrea no se vio afectada. Las micrografías confocal láser de barrido de los batidos mostraron una matriz proteica con gránulos de almidón, gotas de aceite dispersas y fragmentos de fibra. En general, estos resultados mostraron que la adición de la HN modificó positivamente las características de los batidos libres de gluten. Durante el horneado, la adición de HN modificó la gelatinización del almidón y aumentó el contenido del complejo amilosa-lípido.

Al evaluar el efecto de la adición de HN sobre las propiedades de calidad del producto final, los budines con adición del 15% de HN presentaron el mayor volumen específico y no hubo diferencias en la aceptabilidad general con respecto al control. Además, los budines con HN presentaron migas que requerirían menor esfuerzo al masticar y con mayor contenido de fibra dietética total y proteínas.

Por lo tanto, la harina de nuez es un ingrediente adecuado para ser incorporado en productos de panadería sin gluten y podría emplearse para mejorar las características nutricionales y tecnológicas de nuevos productos.

Índice general

Índice de tablas	XX
Índice de figuras	XXII
Índice de ecuaciones	XXX
Capítulo 1: Introducción general	1
1.1. Enfermedad celíaca.....	1
1.1.1. Epidemiología: Incidencia y prevalencia	2
1.1.2. Patofisiología	3
1.1.3. Presentación clínica	8
1.1.4. Diagnóstico	11
1.1.5. Otras patologías asociadas al consumo de gluten.....	13
1.2. Productos panificados con harina de trigo	13
1.2.1. Pan	15
1.2.2. Productos batidos	16
1.3. Alimentos libres de gluten	17
1.3.1. Panificados libres de gluten	18
1.3.2. Ingredientes	19
1.4. Productos panificados sin gluten dulces	30
1.5. Subproductos de la industria alimentaria.....	31
1.6. Subproducto de la extracción de aceite	32
Capítulo 2: Objetivos	34
2.1. Objetivo general:.....	35
2.2. Objetivos específicos:.....	35

Capítulo 3: Caracterización de la harina de nuez.....	36
3.1. Introducción	37
3.2. Objetivos del capítulo.....	38
3.2.1. Objetivo general del capítulo.....	38
3.2.2. Objetivos específicos del capítulo.....	38
3.3. Materiales y Métodos	39
3.3.1. Materiales caracterizados.....	39
3.3.2. Composición proximal	39
3.3.3. Antioxidantes.....	45
3.3.4. Calidad lipídica.....	47
3.3.5. Calidad proteica: Evaluación del perfil aminoacídico.....	53
3.3.6. Propiedades fisicoquímicas de harina de nuez	55
3.3.7. Microestructura de harina de nuez.....	59
3.3.8. Ensayo de almacenamiento de la harina de nuez.....	64
3.3.9. Análisis estadístico.....	70
3.4. Resultados y Discusión	71
3.4.1. Composición proximal	71
3.4.2. Composición mineral.....	71
3.4.3. Actividad antioxidante	74
3.4.4. Calidad lipídica.....	75
3.4.5. Calidad proteica de la harina de nuez	78
3.4.6. Propiedades fisicoquímicas de harina de nuez	79
3.4.7. Microestructura de la harina de nuez	82
3.4.8. Estabilidad de la harina de nuez durante el almacenamiento.....	87

3.5.	Conclusiones parciales	99
Capítulo 4: Batidos libres de gluten con harina de nuez		100
4.1.	Introducción	101
4.2.	Objetivos del capítulo.....	103
4.2.1.	Objetivos general del capítulo.....	103
4.2.2.	Objetivos específicos del capítulo.....	103
4.3.	Materiales y Métodos.....	104
4.3.1.	Ingredientes usados para las premezclas y batidos	104
4.3.2.	Formulación de las premezclas y batidos	104
4.3.3.	Propiedades de empaste de las premezclas	105
4.3.4.	Elaboración de los batidos	107
4.3.5.	Distribución del tamaño de partícula del aceite en los batidos.	108
4.3.6.	Propiedades de hidratación de los batidos.....	108
4.3.7.	Transiciones térmicas de los batidos por calorimetría diferencial de barrido	111
4.3.8.	Características texturales de los batidos	114
4.3.9.	Comportamiento reológico de los batidos	116
4.3.10.	Microestructura de las harinas y batidos por microscopía láser confocal de barrido.....	118
4.3.11.	Análisis estadístico.....	119
4.4.	Resultados y discusión	120
4.4.1.	Propiedades de empaste de las premezclas	120
4.4.2.	Distribución de tamaño de partícula de la fase lipídica en los batidos	124

4.4.3.	Propiedades de hidratación de los batidos.....	126
4.4.4.	Transiciones térmicas de los batidos por DSC.....	129
4.4.5.	Características textuales de los batidos	136
4.4.6.	Comportamiento reológico de los batidos	138
4.4.7.	Microestructura de las harinas y los batidos por CSLM.....	146
4.5.	Conclusiones parciales	156
Capítulo 5: Budines libres de gluten con harina de nuez		158
5.1.	Introducción	159
5.2.	Objetivos del capítulo.....	160
5.2.1.	Objetivo general del capítulo.....	160
5.2.2.	Objetivos específicos del capítulo.....	160
5.3.	Materiales y métodos	161
5.3.1.	Ingredientes usados en los budines.....	161
5.3.2.	Formulaciones para los budines	161
5.3.3.	Elaboración de los batidos y budines.....	161
5.3.4.	Parámetros fisicoquímicos.....	162
5.3.5.	Análisis de la textura de miga y corteza.....	165
5.3.6.	Microestructura de la miga	170
5.3.7.	Composición proximal de los budines	172
5.3.8.	Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines.....	172
5.3.9.	Análisis sensorial de los budines	173
5.3.10.	Análisis estadístico	174
5.4.	Resultados y discusión	175
	Calidad panadera de los budines	175

5.4.1.	Parámetros fisicoquímicos de los budines.....	175
5.4.2.	Análisis de la textura de miga y corteza.....	181
5.4.3.	Microestructura de la miga	184
5.4.4.	Composición proximal de los budines sin gluten.....	196
5.5.	Conclusiones parciales	203
Capítulo 6: Almacenamiento de los budines libres de gluten con harina de nuez.....		205
6.1.	Introducción del capítulo	206
6.2.	Objetivos del capítulo.....	207
6.2.1.	Objetivo general del capítulo.....	207
6.2.2.	Objetivos específicos del capítulo.....	207
6.3.	Materiales y métodos.....	208
6.3.1.	Metodología para el ensayo de almacenamiento	208
6.3.2.	Disponibilidad y contenido de agua de la miga almacenada	208
6.3.3.	Evaluación de la retrogradación del almidón y disociación del complejo amilosa lípido.....	208
6.3.4.	Análisis de la textura de miga y corteza durante el almacenamiento	210
6.3.5.	Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines durante el almacenamiento.....	210
6.3.6.	Análisis estadístico.....	211
6.4.	Resultados y discusión	212
6.4.1.	Actividad acuosa (<i>a_w</i>) de la miga durante el almacenamiento..	212
6.4.2.	Humedad de la miga durante el almacenamiento.....	213

6.4.3.	Evaluación de la retrogradación del almidón	215
6.4.4.	Disociación del complejo amilosa lípido.....	217
6.4.5.	Análisis del perfil de textura (TPA) de la miga.....	220
6.4.6.	Dureza de la corteza durante el almacenamiento.....	227
6.4.7.	Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines durante el almacenamiento.....	228
6.5.	Conclusiones parciales	232
Capítulo 7:	Conclusiones generales	233
7.1.	Conclusiones.....	234
Referencias	237

Índice de tablas

Tabla 1. Harinas y almidones empleados en productos panificados sin gluten	20
Tabla 2. Gradiente de elución de buffer acetato de sodio (A) y acetonitrilo (B)	54
Tabla 3. Condiciones experimentales del almacenamiento	67
Tabla 4. Composición proximal de la harina de nuez (HN)	71
Tabla 5 Composición mineral de harina de nuez (HN)	72
Tabla 6. Proporciones provenientes del perfil de ácidos grasos de la harina y del aceite de nuez	76
Tabla 7 Estabilidad oxidativa de harina y aceite de nuez	77
Tabla 8. Perfil aminoacídico de las proteínas de la harina de nuez	79
Tabla 9. Variación del color de la harina de nuez almacenada	89
Tabla 10. Variación del perfil de ácidos grasos presentes en la harina de nuez almacenada	93
Tabla 11. Variación de los índices de peróxidos e Iodo de la harina de nuez almacenada ..	96
Tabla 12. Parámetros de empaste de las materias primas	122
Tabla 13. Parámetros de empaste de las premezclas con harina de nuez	124
Tabla 14. Disponibilidad de agua en los batidos: actividad de agua (<i>aw</i>) y contenido de humedad.....	127
Tabla 15. Parámetros de los ensayos de relajación ¹ H-RMN de los batidos con harina de nuez	128
Tabla 16. Temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión del hielo y agua congelable de los batidos.....	131
Tabla 17. Parámetros de gelatinización del almidón de los batidos sin gluten	133
Tabla 18. Parámetros de disociación del complejo amilosa-lípido de los batidos sin gluten	135

Tabla 19. Parámetros texturales de los batidos sin gluten control y con harina de nuez (HN).....	136
Tabla 20. Comportamiento reológico de los batidos durante los barridos de esfuerzo	139
Tabla 21. Parámetros de los batidos durante barridos de frecuencia según el modelo de gel débil.....	141
Tabla 22. Parámetros fisicoquímicos de los budines frescos con la harina de nuez	176
Tabla 23. Índice de pardeamiento (browning index, BI) de los budines frescos con harina de nuez.....	177
Tabla 24. Porosidad estructural de la miga	179
Tabla 25. Parámetros texturales de las migas	181
Tabla 26. Tiempos de relajación de la miga de los budines ajustados con el modelo generalizado de Maxwell	183
Tabla 27. Composición proximal de los budines con adición de harina de nuez.....	197
Tabla 28. Parámetros de retrogradación del almidón en los budines sin gluten a los siete días de almacenamiento	216
Tabla 29. Parámetros de disociación del complejo amilosa lípidos en los budines sin gluten a los siete días de almacenamiento	219
Tabla 30. Variación del contenido de ácidos grasos (AG) presentes en la miga durante el almacenamiento. [g ácido graso/ 100 g de budín en base seca]	231

Índice de figuras

Figura 1. Patogénesis de la celiacía. Fuente: (Calado y Verdelho Machado, 2022).....	8
Figura 2. Modelo del iceberg para la celiacía. Adaptada de Gallagher y colaboradores (2004).....	12
Figura 3. Modelo estructural propuesto para el gluten. Fuente: (Shewry et al., 2000).....	15
Figura 4. Símbolos “Sin TACC” admitidos. Fuente: (Código Alimentario Argentino, 2011)	18
Figura 5. Fragmento de la cadena de amilosa. Fuente: (Lehninger, Nelson y Cox, 2005)	23
Figura 6. Tipos de unión en la amilopectina. Fuente:(Lehninger, Nelson y Cox, 2005)	24
Figura 7. Estructura semicristalina del gránulo de almidón. Fuente: (Goesaert et al., 2005)	24
Figura 8. Envejecimiento del pan. Fuente: (Cheftel y Cheftel, 1992)	26
Figura 9. Fórmula de la HPMC. Fuente: Dow Chemical.....	27
Figura 10. Determinación del tiempo de inducción de harina de nuez a 100 °C usando Rancimat.....	50
Figura 11. Representación de gamas de color en distintos espacios. A) CIE XYZ y B) CIE L* a *b*. Fuente: (Horvath y Lipka, 2017).....	56
Figura 12. Esquema de funcionamiento de un difractor láser. Adaptado de Arp(2019) y McClements (2001)	58
Figura 13. Esquema del funcionamiento básico de un microscopio confocal. Adaptada de (STTI, 2011)	60
Figura 14. Diferencia de las rutas de la luz en microscopia de campo amplio y en confocal. Adaptada de Proteintech (sin fecha)	61
Figura 15. Esquema de un microscopio electrónico de barrido. Adaptada de Steff (2016)	63
Figura 16. Esquema de la cinética de acumulación de productos de oxidación de un lípido insaturado. Adaptado de Pignitter y Somoza (2012).....	65

Figura 17. Fotografía de la harina de nuez en la bolsa sellada al vacío para el ensayo de almacenamiento.....	66
Figura 18. Perfil de ácidos grasos de harina (HN) y aceite (AN) de nuez en porcentaje en base de ácidos grasos totales.....	75
Figura 19. Fotografía de la harina de nuez y los parámetros de color instrumental.....	80
Figura 20. Distribución en volumen del tamaño de partícula de la harina de nuez con y sin tratamiento de sonicación.....	82
Figura 21. Micrografías de Harina de nuez mediante microscopía confocal láser de barrido a 20x. Imágenes a) todos los canales de fluoróforos encendidos (calcoflúor: CF, rojo Nilo: RN y rodamina B: RB), b) canal CF encendido, c) canal RN encendido y d) canal RB encendido.....	84
Figura 22. Micrografía electrónica de la harina de nuez observada en modo ESEM a 1000×	85
Figura 23. Micrografías electrónicas de harina de nuez desgrasada. a y b) observadas en modo de bajo vacío a 2000× y a 4000×, respectivamente.....	86
Figura 24. Variación del porcentaje de humedad de la harina de nuez durante el almacenamiento. HN _{t0} harina de nuez tiempo cero. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas al vacío. Las barras verticales indican el desvío estándar de las muestras.....	90
Figura 25. Variación de la actividad acuosa de la harina de nuez durante el almacenamiento. HN _{t0} harina de nuez tiempo cero. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas al vacío. Las barras verticales indican el desvío estándar de las muestras.....	91
Figura 26. Índice de p-anisidina en la harina de nuez almacenada por diez meses. Las líneas negras representan el desvío estándar y letras diferentes entre los tratamientos muestran diferencias significativas (p<0,05). NV y V son tratamientos sin y con aplicación de vacío, respectivamente. 20, 0 y -20 hacen referencia a sus respectivas temperaturas [°C] de almacenamiento.....	97

Figura 27. Ejemplo del perfil viscoamilográfico con rampa de calentamiento–isoterma y enfriamiento y los parámetros de empaste	106
Figura 28. Explicación gráfica de las dos fases del H ¹ -RMN. polarización (a-b) y adquisición (c-d). Fuente: (Arp, Ferrero y Correa, 2019).....	109
Figura 29. Representación de un termograma con temperaturas (To: onset, Tp: de pico y Tf: final). Adaptada de Bertrand y colaboradores (2019)	112
Figura 30. Representación del ensayo back extrusion. a) la sonda desciende y toma contacto con el alimento (batido), b) la sonda lo comprime y c) el batido se extrude por el espacio libre. Adaptado de (Bourne, 2002a).....	115
Figura 31. Curva típica de back extrusion con sus respectivos parámetros. Adaptada de Cevoli y colaboradores (2013).....	116
Figura 32. Perfiles viscoamilográficos de a) las materias primas: harina de arroz (HA), fécula de mandioca (FM) y almidón de maíz (AM) y b) las premezclas: control (PControl) y con harina de nuez (PHN). Premezcla control: HA (0,7 kg), FM (0,15 kg) y AM (0,15 kg). Niveles de adición de harina de nuez en las pemezclas: 10, 15 y 20 % de harina de nuez en base a la premezcla control (PHN10, PHN15 y PHN20, respectivamente)	121
Figura 33. Distribución de tamaño de las partículas de HN y de las gotas de aceite en los batidos. Las micrografías de microscopía láser confocal de barrido corresponden al batido control y al HN20 teñido con rojo Nilo (20X). ———HNControl - - - - -HN10 - - - - -HN15 — . .HN20.....	126
Figura 34. Termograma por DSC del batido HN20. a: transición vítrea (Tg), b: fusión de hielo, c: gelatinización de almidón y d: disociación del complejo amilosa lípido	129
Figura 35. Termograma en la zona de congelamiento del batido HN20. a: transición vítrea (Tg) y b: fusión del hielo	130
Figura 36. Termograma en la zona de calentamiento del batido HN20. c: gelatinización del almidón y d: disociación del complejo amilosa lípido	132

Figura 37. Espectros mecánicos: Efecto de la frecuencia sobre los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los batidos adicionados con harina de nuez.....	140
Figura 38. Comportamiento reológico de los batidos: Efecto de la frecuencia sobre el módulo complejo y curvas ajustadas al modelo de gel débil.....	141
Figura 39. a) Módulo complejo (G^*) en función de la temperatura en los batidos sin gluten, b) Módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función de la temperatura.....	145
Figura 40. Micrografías obtenidas por microscopía confocal láser de barrido de la harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca. Las muestras fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las micrografías (a) muestran todos sus canales encendidos, mientras que (b) muestran el canal de FITC apagado	149
Figura 41. Micrografías a 20x por microscopía confocal láser de barrido de la harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca. Las muestras fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las micrografías (c) muestran todos sus canales encendidos, mientras que (d) muestran el canal de FITC apagado	150
Figura 42. Micrografías a 20x por CSLM de los batidos Control y HN10. Las micrografías fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las imágenes a) muestran todos los canales encendidos, b) muestran el canal de rodamina B apagado, c) muestran el canal de FITC apagado. A: almidón, F: fibra y P: proteína.....	153
Figura 43. Micrografías a 20x por CSLM de los batidos HN15 y HN20. Las micrografías fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las imágenes a) muestran todos sus canales encendidos, b) muestran el canal de rodamina B apagado, c) muestran el canal de FITC apagado. A: almidón, F: fibra y P: proteína.....	154
Figura 44. Micrografías por CSLM de batidos sin gluten a 20x. Las micrografías fueron teñidas con rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor. La imagen del Control (a) muestra todos sus canales encendidos, mientras que b) muestran el canal de rodamina B apagado. y c) muestran el canal de rojo Nilo apagado. A: almidón, F: fibra, L: lípidos y P: proteína.....	155

Figura 45. Diagrama esquemático de las dos compresiones necesarias para el análisis de perfil de textura de la miga. Adaptado de Bourne (2002a).....	165
Figura 46. Esquema de un perfil de textura con sus respectivas partes. Fuente: (Bourne, 2002a)	166
Figura 47. Esfuerzo resultante de la aplicación de una deformación constante sobre diferente tipo de materiales en un ensayo de relajación. Adaptado de Whaley y colaboradores (2019).....	168
Figura 48. Volumen específico de los budines libres de gluten con harina de nuez. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)	175
Figura 49. Rodajas cortadas transversalmente del budín control y de los budines con harina de nuez.....	178
Figura 50. Gráficos de la intensidad superficial de las migas con la harina de nuez. alv.= alveolos y PH = partículas de la harina de nuez.....	180
Figura 51. Curva de relajación para la miga HN20 ajustada al modelo de Maxwell (Ecuación 24)	182
Figura 52. Micrografías de las migas de budines por SEM. (a, c, d y e: 500×) y (b y f:1500×). Las barras negra y blanca corresponden a 200 y 50 μm , respectivamente. A=almidón, P=proteína	185
Figura 53. Micrografía a 4x por CSLM de clara de huevo coagulada por calor teñida con calcoflúor white y rodamina B	187
Figura 54. Micrografías de la miga Control y HN10 por CSLM. Muestras teñidas con FITC, rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b y b') se apagó el canal FITC y d) sólo el canal CF está encendido. a' y b' son las imágenes provenientes de los recuadros anaranjados con mayor magnificación	188
Figura 55. Micrografías de la miga HN15 y HN20 por CSLM. Muestras teñidas con FITC, rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b, b' y b'') se apagó el canal FITC, c y c') se apagó el canal de RB y d y d'') sólo	

el canal CF está encendido. a' y b'c' son las imágenes provenientes del recuadro anaranjado con mayor magnificación.....	189
Figura 56. Micrografías de la miga Control y HN10 por CSLM. Muestras teñidas con rojo Nilo (RN), rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b y b') se apagó el canal RN y c y c') se apagó el canal de RB. a', c' y b'c' son las imágenes provenientes de los recuadros anaranjados con mayor magnificación. L: Lípidos.....	193
Figura 57. Micrografías de la miga HN15 y HN20 por CSLM. Muestras teñidas con rojo Nilo (RN), rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a) presentan todos los canales encendidos, b) se apagó el canal RN, c) se apagó el canal de RB y d) sólo el canal RN está encendido. L: Lípidos.....	194
Figura 58. Ácidos grasos presentes en la miga de los budines frescos. [% de ácidos grasos/cantidad total de ácidos grasos]. Letras diferentes entre formulaciones indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	200
Figura 59. Evaluación sensorial de los budines. *atributos con diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 48$).....	201
Figura 60. Variación de la actividad acuosa de la miga de los budines con adición de harina de nuez durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$). Los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde.....	213
Figura 61. Variación de la humedad en la miga de los budines con adición de harina de nuez durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$). Los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde.....	214
Figura 62. Termogramas por DSC de los budines libres de gluten con harina de nuez. Resaltando las transiciones de retrogradación de amilopectina y la disociación del complejo amilosa lípido.....	215

Figura 63. Entalpía de disociación del complejo amilosa lípido en la miga de budines libres de gluten con harina de nuez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). *HN10 día siete ND: No determinado..... 219

Figura 64. Variación de la firmeza de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 221

Figura 65. Variación de la cohesividad de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 223

Figura 66. Variación de la resiliencia de la miga de los budines almacenados a 20 °C durante 7 días. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 224

Figura 67. Variación de la elasticidad de la miga de los budines almacenados a 20 °C durante 7 días. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 225

Figura 68. Variación de la masticabilidad [N] de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 226

Figura 69. Evolución de la dureza de la corteza de los budines durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde 228

Figura 70. Perfil de ácidos grasos (AG), por grado de saturación, presentes en la miga de los budines [% AG/ AG totales]. D0: día cero y D7: día siete 229

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Contenido de humedad.....	39
Ecuación 2. Contenido de lípidos.....	40
Ecuación 3. Contenido de proteínas.....	41
Ecuación 4. Contenido de cenizas.....	42
Ecuación 5. Contenido de fibra dietaria total.....	44
Ecuación 6. Contenido de carbohidratos.....	44
Ecuación 7. Constante de velocidad modelo de Arrhenius.....	51
Ecuación 8. Constante de velocidad en función del tiempo crítico.....	52
Ecuación 9. Ecuación linealizada de Arrhenius.....	52
Ecuación 10. Q_{10}	52
Ecuación 11. Tiempo estimado de vida útil.....	52
Ecuación 12. Puntuación química de aminoácidos.....	54
Ecuación 13. Tonalidad de color.....	55
Ecuación 14. Croma o saturación de color.....	55
Ecuación 15. Capacidad de retención de agua.....	57
Ecuación 16. Índice de yodo.....	69
Ecuación 17. Índice de p-anisidina.....	70
Ecuación 18. Modelo de decaimiento exponencial.....	110
Ecuación 19. Fracción de agua congelable.....	113
Ecuación 20. Energía cohesiva.....	116
Ecuación 21. Modelo de gel débil ajustando el módulo complejo G^*	117
Ecuación 22. Browning index (índice de pardeamiento).....	163
Ecuación 23. Coordenada de cromaticidad.....	164
Ecuación 24. Modelo generalizado de Maxwell.....	169

Capítulo 1: Introducción

general

Capítulo 1

1.1. Enfermedad celíaca

La celiaquía o enfermedad celíaca (EC) es una condición inmunomediada caracterizada por la enteropatía del intestino delgado, síntomas sistémicos relacionados con mala absorción y/o activación inmune, y presencia de autoanticuerpos contra la transglutaminasa tisular (TTG). La celiaquía es única entre las enfermedades autoinmunes ya que su desencadenante, ha sido identificado, y su remoción de la dieta da lugar a la resolución de los síntomas y de la enteropatía en la mayor parte de los pacientes (Lebwohl y Rubio-Tapia, 2021). La celiaquía se desencadena, en individuos genéticamente predispuestos, por la ingesta de proteínas del grupo de las prolaminas presentes en el trigo, la avena, la cebada y el centeno (T.A.C.C.), comúnmente denominadas en forma genérica como “gluten”, lo que da lugar a la inflamación crónica del intestino delgado y atrofia de las vellosidades intestinales. Esta situación conlleva a una absorción deficiente de nutrientes y a otras patologías asociadas como diarrea, anemia, pérdida de peso y diabetes (Catassi y Fasano, 2008). Es por ello, que el único tratamiento posible para los individuos celíacos es el apego de por vida de una dieta con exclusión completa y estricta de gluten (Calado y Verdelho Machado, 2022). Dado que si se realiza una dieta sin TACC la persona no presenta ningún síntoma, muchos profesionales hablan de condición celíaca y no de enfermedad.

En los últimos años ha habido cambios importantes en el diagnóstico y patogénesis de esta condición y se dice que la celiaquía ha sufrido una metamorfosis debido al incremento sostenido en el número de diagnósticos realizados, inclusive en pacientes geriátricos (Hernández et al., 2021; Volta et al.,

2014). Esta situación se ha atribuido a la mayor disponibilidad de pruebas más sensibles y específicas, lo que permite la identificación de grupos de riesgo y ha dado lugar al incremento de diagnosticados en todo el mundo (Caio et al., 2019). Sin embargo, también se han postulado diferentes teorías que sugieren que la globalización y la difusión generalizada de diferentes versiones de la llamada “dieta mediterránea” han dado lugar al incremento del consumo de gluten en cantidades muy elevadas, hasta 20 g/día, lo que habría dado lugar al aumento de la prevalencia de la celiacía. También se ha culpado a las nuevas variantes biotecnológicas del trigo (de Lorgeril y Salen, 2014). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada. Por el contrario, se ha observado que, en el hemisferio occidental, otras patologías autoinmunes han mostrado el mismo comportamiento en el aumento de casos. Esta situación sugiere que serían otros factores ambientales diferentes del trigo, los que podrían estar en juego en el aumento de los casos (Bach, 2018; Caio et al., 2019).

1.1.1. Epidemiología: Incidencia y prevalencia

Anteriormente se creía que la celiacía era una afección que afectaba predominantemente a individuos oriundos de Europa. Sin embargo, hoy se reconoce como una afección presente en todo el mundo, siendo la seroprevalencia a nivel global 1,4%. La prevalencia varía por continentes siendo 1,3% para América del Sur y 1,8% para Asia (Singh et al., 2018). Un hallazgo común a todas las regiones es que la incidencia y prevalencia se encuentra en constante aumento a lo largo del tiempo.

La celiacía puede desarrollarse a cualquier edad, incluidas las poblaciones geriátricas. No obstante, la mayoría de los pacientes desarrollan la enfermedad

celíaca antes de los diez años (Liu et al., 2017). Los diagnósticos en adultos mayores no se deben necesariamente al descubrimiento tardío de la enfermedad celíaca de larga data, sino que podrían ser el resultado de la pérdida de nuevo de la tolerancia al gluten (Catassi et al., 2010).

Por otro lado, se ha observado que la incidencia de celiaquía es mayor en mujeres que en hombres, pero esto podría estar relacionado con que es más probable que los hombres no sean diagnosticados. Ya que es menos probable que los hombres se realicen una biopsia duodenal ante síntomas como diarrea y pérdida de peso (Lebwohl y Rubio-Tapia, 2021). Además, existen diferencias raciales y étnicas en la prevalencia.

También se ha observado que la prevalencia es mayor en familiares de primer grado de celíacos (10-15%) y en grupos de riesgo como individuos con síndrome de Down, diabetes tipo 1 o deficiencia de IgA.

Un estudio realizado en niños en Argentina, encontró una prevalencia en la población pediátrica de 1,26 %, es decir, de cada 79 niños estudiados, uno es celíaco (Mora, 2012).

1.1.2. Patofisiología

La celiaquía es una enfermedad autoinmune única en relación a que los elementos genéticos claves (antígeno leucocitario humano (HLA)-DQ2 y HLA-DQ8), el autoantígeno involucrado (transglutaminasa tisular (tTG)) y el desencadenante ambiental (gluten) están bien definidos.

Como con muchas otras enfermedades autoinmunes, se ha cuestionado si el gluten es el único elemento clave que desencadena la aparición de la enfermedad

en sujetos genéticamente predispuestos. La mejora de la higiene y la falta de exposición a microorganismos se han relacionado con un fuerte aumento en los casos de las enfermedades autoinmunes en países industrializados durante los últimos 40 años (Okada et al., 2010; Verdu, Galipeau y Jabri, 2015). La hipótesis de la higiene sostiene que la creciente incidencia de muchas enfermedades autoinmunes puede ser parcialmente debida a cambios en el estilo de vida que han reducido nuestra exposición a patógenos. Con el avance sobre el rol de la microflora intestinal en el equilibrio entre la tolerancia y la respuesta inmunitaria que lleva a la autoinmunidad, esta hipótesis está en discusión (Caio et al., 2019). Pero independientemente de si las enfermedades autoinmunes se deben a una exposición excesiva o insuficiente a microorganismos, generalmente se acepta que la inmunidad adaptativa y el desequilibrio entre las respuestas de las células T helpers 1 y 2 son elementos clave de la patogenia del proceso autoinmune.

Además de la predisposición genética y la exposición al gluten, la pérdida de la función de la barrera intestinal, una respuesta inmunitaria innata proinflamatoria provocada por el gluten, una respuesta inmunitaria adaptativa inapropiada y un desequilibrio de la microflora intestinal parecen ser piezas claves en la celiacía.

1.1.2.1. Factores genéticos

Al igual que otras enfermedades autoinmunes, la celiacía tiene un fuerte componente hereditario como lo demuestra su alta recurrencia familiar (~ 10-15%) y la alta presencia de la enfermedad en gemelos monocigóticos (75-80%) (Lundin y Wijmenga, 2015). También es común a otras enfermedades autoinmunes el papel relevante del HLA de clase II, específicamente DQ2 y DQ8, en la heredabilidad de la celiacía. Los antígenos (moléculas) del HLA-II se

encuentran en las células del sistema inmune y las sustancias que se unen a ellas provienen, en general, de afuera del organismo, como microorganismos o proteínas (gluten). Cuando una proteína es reconocida como extraña, el HLA se une a esa proteína y es atacada por los linfocitos (Fasano y Catassi, 2001). El HLA-DQ-2 se encuentra en el 80-90% de los pacientes celíacos y en el resto se encuentra el HLA-DQ-8. Por lo tanto, la celiaquía no se desarrolla a menos que la persona tenga alguno de estos dos grupos genéticos. Sin embargo, el HLA-DQ-2/HLA-DQ-8 es frecuente entre la población general (25-35 %) y solo el 3 % de estos individuos compatibles con HLA desarrollarán celiaquía. Esto significa que la presencia de estos HLA es necesaria, pero no suficiente, para desarrollar la celiaquía, situación que podría estar relacionada a que se han identificado más de 100 genes no relacionados con HLA pero sí asociados con la celiaquía (Dieli-Crimi, Cénit y Núñez, 2015).

1.1.2.2. El gluten como desencadenante ambiental de la celiaquía

Los cereales que contienen gluten son una incorporación reciente a la dieta humana, ya que fueron introducidos hace unos diez mil años durante la transición del estilo de vida nómada al de asentamientos agrícolas. Además, el gluten es una de las pocas proteínas que presenta baja digestibilidad, se consume crónicamente en cantidades significativas y está constituido por varios péptidos inmunogénicos no digeribles. Estas características podrían contribuir a la pérdida de la tolerancia a este antígeno alimentario, cuando se activa el sistema inmunitario, como puede ocurrir durante una infección entérica (Caio et al., 2019). Las gliadinas, prolaminas del trigo, son proteínas ricas en prolina y glutamina, que son parcialmente digeridas por las enzimas intestinales porque las proteasas tienen baja actividad

de prolil-endopeptidasa (Calado y Verdelho Machado, 2022; Silano, Vincentini y De Vincenzi, 2009). El producto final de esta digestión parcial es una mezcla de péptidos que pueden desencadenar respuestas del huésped (aumento de la permeabilidad intestinal y respuesta inmunitaria innata y adaptativa) que se asemejan mucho a las provocadas por la exposición a microorganismos potencialmente dañinos (Singh et al., 2018; Tye-Din, Galipeau y Agardh, 2018).

Transporte del gluten desde el lumen a la lámina propia

Los péptidos de gluten no se absorben libremente y necesitan una interrupción en la barrera epitelial para trasladarse a la lámina propia, donde residen las células presentadoras de antígenos (APC) (Figura 1). Eso puede ocurrir a través de un epitelio dañado, por una infección intestinal transitoria, una inflamación inducida por fármacos o disbiosis (desbalance de la microbiota intestinal). El gluten también puede cruzar el epitelio por vía transcelular a través de la unión de los complejos IgA-gluten al receptor de transferrina CD71 o dentro de células dendríticas que cruzan el epitelio (Calado y Verdelho Machado, 2022). Las moléculas del HLA-II se unen preferentemente a péptidos con aminoácidos cargados negativamente. Aunque los péptidos de gluten tienen muy pocos aminoácidos cargados, son muy susceptibles a la desamidación de sus residuos de glutamina a glutamato por la transglutaminasa tisular, quedando de este modo cargado negativamente. Así aumenta la estabilidad e inmunogenicidad de los complejos formados. Las células presentadoras de antígenos APC (células dendríticas y macrófagos) presentan el complejo gliadina desamidada con HLA-II a las células T CD4+, lo que induce un fenotipo proinflamatorio en las células T. Además, las células T CD4+ activadas promueven la diferenciación de las células B

en células plasmáticas y liberan citocinas proinflamatorias como el interferón- γ y la interleucina-21 que activan las células T CD8+ intraepiteliales. La interleucina-15 promueve aún más la diferenciación de las células T CD8+ intraepiteliales en un fenotipo similar a las células NK citotóxicas, lo que daña los enterocitos. Los linfocitos T CD4+ activados también secretan el factor de necrosis tumoral α , que actúa sobre los fibroblastos intestinales induciendo la secreción de metaloproteinasas, que contribuyen a la destrucción de la mucosa por disolución del tejido conjuntivo, y factores de crecimiento que contribuyen a la hiperplasia de las células epiteliales de las criptas intestinales (Caio et al., 2019). Por último, el complejo de gluten desamidado con la transglutaminasa tisular puede unirse a receptores, lo que permite la internalización en células B específicas, que luego actúan como APC para las células T CD4+, alimentando aún más la respuesta inmunitaria. Además, estas células B pueden diferenciarse en células plasmáticas (productoras de anticuerpos), lo que explica por qué la producción de anticuerpos anti transglutaminasa específicos solo ocurre bajo una dieta que contiene gluten (Calado y Verdelho Machado, 2022).

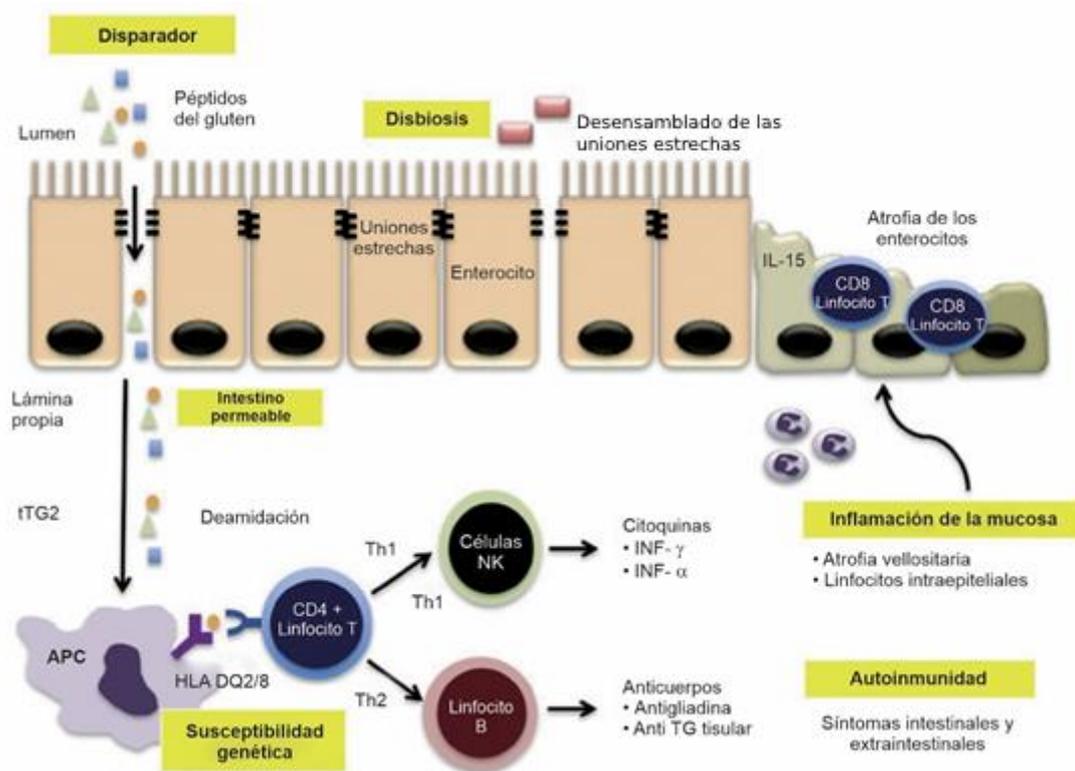


Figura 1. Patogénesis de la celiaquía. Fuente: (Calado y Verdelho Machado, 2022)

1.1.3. Presentación clínica

La celiaquía se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres con una relación de mujeres a hombres que varía de 2:1 a 3:1. Sin embargo, según pruebas serológicas, se estima que la proporción real de mujeres a hombres es de 1,5:1. La celiaquía puede manifestarse a cualquier edad, desde la primera infancia hasta la vejez, pero hay dos picos de inicio: uno poco después del comienzo de la ingesta de gluten en los primeros 2 años de vida, y el otro en la segunda o tercera décadas de vida. Dado que los síntomas pueden variar significativamente de un paciente a otro, el diagnóstico no siempre es sencillo. Las manifestaciones clínicas de la celiaquía se pueden dividir, desde un punto de vista práctico, como intestinales o extraintestinales. La forma intestinal de la celiaquía se detecta con mayor

frecuencia en la población pediátrica y en niños menores de 3 años y se caracteriza por diarrea, pérdida de apetito, distensión abdominal y retraso en el crecimiento (Vivas et al., 2008). Los niños mayores y los adultos pueden presentar diarrea, hinchazón, estreñimiento, dolor abdominal o pérdida de peso (Reilly et al., 2011). Sin embargo, en adultos, el síndrome de malabsorción con diarrea crónica, pérdida de peso y astenia significativa es bastante raro. Por el contrario, es más frecuente una presentación similar al síndrome del intestino irritable con estreñimiento o alternancia de síntomas intestinales y/o dispepsia, como náuseas y, a veces, vómitos (McAllister, Williams y Clarke, 2019; Volta et al., 2014).

Los síntomas extraintestinales son comunes tanto en niños como en adultos. Pueden manifestarse como una anemia microcítica ferropénica, detectable hasta en un 40% de los casos, debida a la malabsorción del hierro o a la inflamación crónica del intestino o, como una anemia macrocítica por déficit de ácido fólico y/o vitamina B12. También, se observan problemas en la densidad mineral ósea (osteopenia u osteoporosis) debido a la mala absorción de calcio y vitamina D3. Estas manifestaciones se observan en el 70 % de los pacientes en el momento del diagnóstico. En los niños, el retraso del crecimiento y la baja estatura pueden hacer sospechar de celiaquía. Otros signos incluyen defectos del esmalte dental, estomatitis aftosa (identificada en aproximadamente el 20 % de los pacientes con celiaquía no diagnosticada) (Krzywicka et al., 2014) e hipertransaminasemia (40-50 % de los pacientes no tratados), que pueden atribuirse a la translocación de antígenos bacterianos y alimentarios que alcanzan el hígado debido al aumento de la permeabilidad intestinal (Volta et al., 1998). Una amplia gama de síntomas neurológicos, como dolor de cabeza, parestesia, neuroinflamación, ansiedad y depresión, pueden detectarse en los individuos con celiaquía. La presentación

clínica también puede incluir cambios en la función reproductiva caracterizados por menarquia tardía, amenorrea, abortos espontáneos recurrentes, parto prematuro, menopausia temprana y cambios en el número y movilidad de los espermatozoides. En particular, estas manifestaciones pueden revertirse cuando los pacientes comienzan una dieta libre de gluten estricta (Caio et al., 2019).

La celiaquía también presenta una forma subclínica, la cual incluye pacientes con síntomas por debajo del umbral de identificación clínica, los que suelen ser diagnosticados solo después de la apreciación de los efectos beneficiosos inducidos por el apego a una dieta libre de gluten. Un ejemplo típico de casos subclínicos son aquellos pacientes sometidos a un ensayo serológico por ser familiares de pacientes celíacos.

La EC puede asociarse con diferentes enfermedades autoinmunes e idiopáticas, incluida la dermatitis herpetiforme (que, como manifestación única, debe indicar la evaluación de celiaquía), diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, deficiencia selectiva de IgA, alopecia areata, enfermedad de Addison, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades cromosómicas (Down, Turner y síndromes de William), enfermedades neurológicas (ataxia cerebelosa, neuropatía periférica, epilepsia con y sin calcificaciones occipitales), enfermedades autoinmunes hepáticas y miocardiopatía dilatada idiopática (Caio et al., 2019; Calado y Verdelho Machado, 2022; Volta et al., 2014). La importancia de diagnosticar la celiaquía asociada a estas enfermedades concomitantes es doble ya que el seguimiento de una dieta libre de gluten puede resolver síntomas, prevenir complicaciones y mejorar algunas de estas enfermedades asociadas (Caio et al., 2019; Volta et al., 2014).

También existe una manifestación clínica de la celiaquía denominada refractaria, que se caracteriza por síntomas persistentes y atrofia de las vellosidades intestinales aún después de al menos 1 año de seguimiento de una dieta libre de gluten estricta.

1.1.4. Diagnóstico

El estándar de oro para el diagnóstico de celiaquía está dado por la combinación de cambios en la mucosa intestinal detectados a través de una biopsia duodenal y por la positividad de las pruebas serológicas (anticuerpos antiTG, anticuerpos antiendomiso (EmA), y anticuerpos de péptido de gliadina desamidada (DGP)). A pesar del progreso realizado en serología, no existe una prueba serológica con una sensibilidad y especificidad del 100 % por lo que se requiere de la biopsia intestinal como complemento clave para establecer un diagnóstico correcto. Para la realización de estas pruebas diagnósticas, es imprescindible que el paciente continúe siguiendo una dieta con inclusión de gluten, ya que, de lo contrario, los resultados serológicos e histológicos perderían validez.

En casos excepcionales debe realizarse la tipificación de los haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Este estudio solamente sirve para descartar la posibilidad de poseer celiaquía, dado que la ausencia de los mismos indicaría una probabilidad muy baja de padecer celiaquía. Los test genéticos se realizan en casos en donde el test serológico haya dado negativo, pero con detecciones de atrofia leve en la biopsia. También se suelen realizar en pacientes que estén realizando una dieta libre de gluten sin test previos y pacientes con serología e histología discrepantes.

El diagnóstico de la celiaquía muchas veces resulta complicado debido a la presencia de distinto tipo de manifestaciones (intestinales y extraintestinales). Por este motivo, es que se suele hablar del “modelo del iceberg” para explicar las distintas formas en las que se puede presentar la celiaquía (Figura 2).

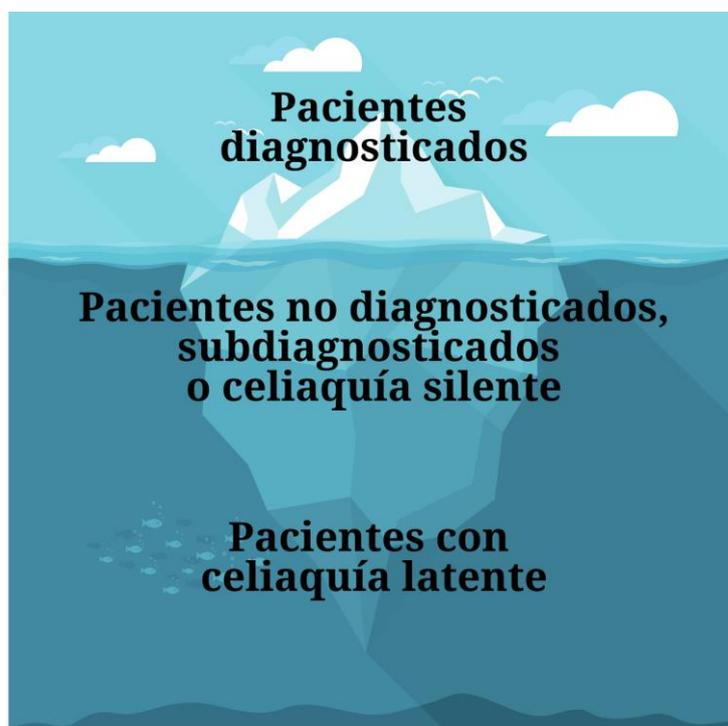


Figura 2. Modelo del iceberg para la celiaquía. Adaptada de Gallagher y colaboradores (2004)

Por un lado, hay cierta cantidad de individuos que son diagnosticados debido a que presentan síntomas sugestivos, son de riesgo o tienen antecedentes familiares. Estos casos forman la parte visible del iceberg (celiaquía clásica). Sin embargo, hay otros individuos que presentan manifestaciones mínimas o incluso ausentes por lo que no son diagnosticados, estos forman la parte sumergida del iceberg (celiaquía silente, pero con atrofia vellositaria). Como estos casos no son diagnosticados entonces no se tratan y quedan expuestos al riesgo de complicaciones a largo plazo. En la parte inferior del iceberg se encuentran aquellas personas que no poseen síntomas gastrointestinales ni manifestaciones extraintestinales, pero

poseen la predisposición genética para poseer la celiacía (celiacía latente) (Gallagher, Gormley y Arendt, 2004).

La "línea de agua", es decir, la proporción de casos diagnosticados a no diagnosticados, depende de la solicitud del médico para realizar el análisis serológico en situaciones de baja sospecha clínica.

1.1.5. Otras patologías asociadas al consumo de gluten

El gluten puede causar otras patologías con sintomatología similar a la celiacía, pero sin pruebas serológicas e histológicas positivas. Una de ellas es la sensibilidad al gluten no celíaca, la que se estima puede presentarse en el 6% de la población y da lugar a la aparición de los síntomas típicos de la celiacía, los cuales desaparecen luego del seguimiento de una dieta libre de gluten. Para su diagnóstico no hay una prueba, más que la realización de una dieta sin gluten por un tiempo y de obtenerse resultados positivos, se debe introducir nuevamente el gluten para verificar si hay una reaparición de los síntomas.

Otra patología debido a la ingesta de gluten es la alergia alimentaria al gluten, se encuentra en alrededor del 0,1% de la población y el diagnóstico se realiza mediante la determinación de los niveles de inmunoglobulina E específica y una prueba cutánea.

1.2. Productos panificados con harina de trigo

Los cereales y los productos a base de cereales han constituido el principal componente de la dieta humana en todo el mundo desde tiempos remotos (Hui y Corke, 2006; Tebben, Shen y Li, 2018). Los cereales son fuente de energía, proporcionando 10-20 veces más energía que la mayoría de las frutas y verduras.

El trigo y el arroz son los cereales más importantes para la nutrición humana y representan el 55 % de la producción total de cereales. Nutricionalmente, son fuentes importantes de proteínas, carbohidratos, vitaminas del grupo B, vitamina E, hierro, minerales y fibra.

El término productos panificados incluye múltiples productos alimenticios hechos a base de harina (típicamente harina de trigo) que varían en complejidad, partiendo de productos simples como el pan hasta productos como pasteles, galletas, budines, bizcochuelos, etc. Entre los productos panificados, el pan se ha mantenido como base de la alimentación en diferentes culturas, proporcionando energía, principalmente debido a su alto contenido de almidón, siendo bajo en grasas y azúcares. Mientras que productos como los pasteles y galletas son ricos en grasas y azúcares, pero representan una excelente opción para el consumo indulgente (“un permitido”) (Martinez y Gomez, 2019). Si bien el pan puede ser un excelente alimento portador de compuestos bioactivos, proteínas y fibra dietaria, entre otros, el esfuerzo por mejorar las propiedades nutricionales de tortas, galletas y productos relacionados, se ha centrado en la eliminación o reducción de grasas y azúcares.

Los productos de panadería también se caracterizan por tener un bajo contenido proteico, aunque su alto consumo hace que supongan una fracción importante de la ingesta proteica total recomendada.

La importancia de los productos panificados para la población argentina queda demostrada por el hecho que, en el año 2010, el consumo anual per cápita de pan se estimaba en 70,6 kg para pan artesanal y 4,6 kg para pan industrial (Lezcano, 2011a).

1.2.1. Pan

El gluten presenta un papel clave en la producción de pan de trigo, no así en otros productos panificados a base de harina de trigo. Con el término de gluten se designa a la red que forman las gluteninas y gliadinas del trigo cuando son hidratadas y sometidas a un trabajo mecánico (amasado). Estas proteínas son las proteínas de reserva del grano de trigo y constituyen el 80- 85% de las proteínas totales. En el amasado, estas proteínas se despliegan y estabilizan mediante enlaces disulfuro, interacciones hidrofóbicas y formación de puentes de hidrógeno. De esta forma, se obtiene como resultado una red proteica tridimensional, elástica y cohesiva, denominada tecnológicamente como gluten (Figura 3).

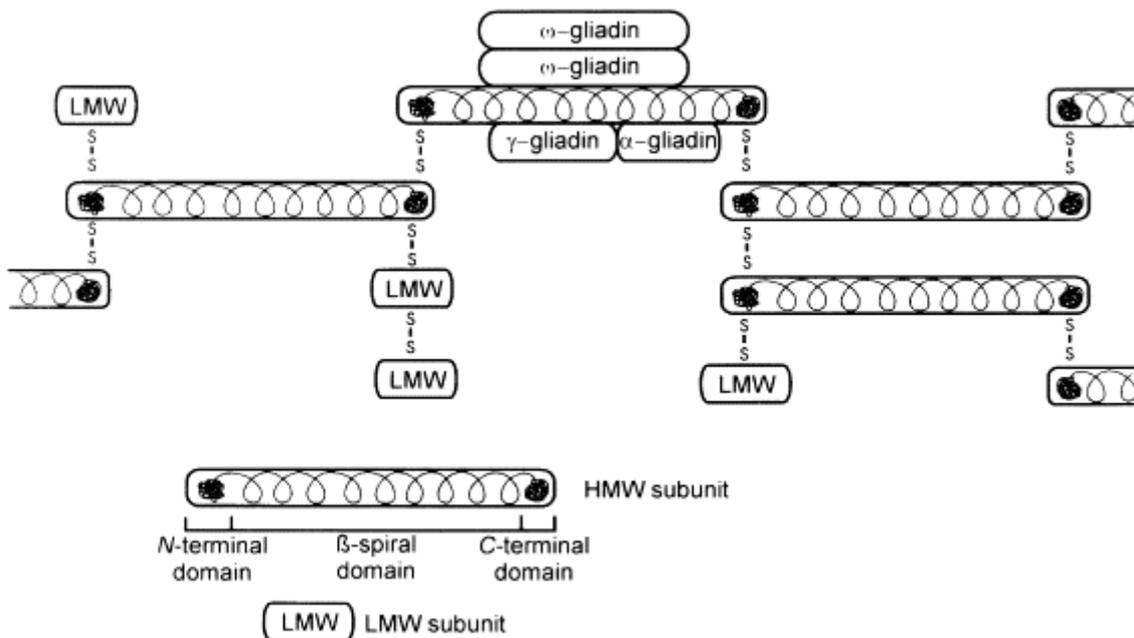


Figura 3. Modelo estructural propuesto para el gluten. Fuente: (Shewry et al., 2000)

El gluten es el responsable de las propiedades viscoelásticas únicas de la masa de trigo y, por lo tanto, del excepcional potencial de panificación (Hager et al., 2012). La red de gluten es necesaria para la retención del gas carbónico generado durante la fermentación y su capacidad de hacerlo se verá reflejado en la esponjosidad del pan (Arendt y Dal Bello, 2011).

1.2.2. Productos batidos

Con la denominación genérica de productos batidos se designa a un conjunto amplio de productos panificados, entre ellos, bizcochuelos, vainillas, magdalenas y budines. A este tipo de productos también se los puede designar como productos de vertido porque necesitan de un recipiente que los contenga, del cual adoptan su forma luego del horneado. Estos productos están incluidos en el Código Alimentario Argentino (C.A.A.), en el Capítulo IX bajo el título “galletas, galletitas y facturas de panadería” (artículos 760, 760 bis, 762 y 766).

Cuentan en su formulación con harinas de cereales, leche y huevos y, suelen presentar altos niveles de azúcar y grasa, pero bajos de fibra dietaria (Belorio y Gómez, 2020). Se los suele consumir entre comidas como snacks o por placer. En este tipo de productos, la red de gluten no suele desarrollarse debido, en parte a la presencia de otros ingredientes, como azúcar o grasas, que interrumpen el desarrollo de la red de gluten, a la menor cantidad de harina de trigo utilizada y a la baja energía mecánica aplicada durante el mezclado (Cauvain y Young, 2006).

Según un informe del año 2011 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, en el año 2010, el consumo anual per capita en la Argentina de productos batidos se estimó en 860 gramos, habiéndose observado un incremento del 37,5% respecto al año 2006. Este incremento se atribuyó a una mayor oferta de presentaciones, sabores y a la presencia de nuevos productos. Estos productos son consumidos por todas las clases sociales. Sin embargo, como no integran la canasta básica de alimentos, en épocas de recesión su consumo se reduce fuertemente. Con respecto al consumo de budines, informaron que el 53,8% de las ventas en kilogramos de budines en los supermercados se realizaron en el mes de diciembre

de 2010 dado que su consumo se relaciona con las fiestas de fin de año. Asimismo, en ese año los budines tuvieron una variación positiva del 19%, respecto del anterior (Lezcano, 2011b).

1.3. Alimentos libres de gluten

El Código Alimentario Argentino (C.A.A (Art 1338), 2011) en el Artículo 1383 del Capítulo XVII, define como alimento libre de gluten el que está preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de elaboración (que impidan la contaminación cruzada) no contiene prolaminas procedentes del trigo, de todas las especies de *Triticum*, como la escaña común (*Triticum spelta* L.), kamut (*Triticum polonicum* L.), de trigo duro, centeno, cebada, avena ni de sus variedades cruzadas. También define el contenido máximo de gluten tolerable para este tipo de productos en 10 mg/kg y establece que se deberá determinar a través de la metodología establecida en la Norma Codex STAN 118-79 (adoptada en 1979, enmendada en 1983; revisada en 2008- (Codex STAN 118-79, 1979)) enzimoimmuno ensayo ELISA R5 Méndez y toda aquella que la Autoridad Sanitaria Nacional evalúe y acepte.

Para favorecer su identificación, este tipo de productos deben rotularse con la denominación del producto seguido de la indicación libre de gluten e incluir la leyenda “Sin TACC” visible en su envase (Figura 4).



Figura 4. Símbolos “Sin TACC” admitidos. Fuente: (Código Alimentario Argentino, 2011)

1.3.1. Panificados libres de gluten

Los productos panificados son componentes básicos de la dieta debido a sus características sensoriales y su calidad nutricional. Al desarrollar productos sin gluten, el mayor desafío tecnológico surge al buscar elaborar un producto con las características del pan de trigo debido a que el gluten es el responsable de sus características típicas. Mientras que, en los productos batidos al no haber un desarrollo completo de la red de gluten, el desafío es algo menor (Belorio y Gómez, 2020).

Para la elaboración de productos panificados sin gluten se emplean harinas sin gluten, como arroz, sorgo, trigo sarraceno, amaranto, quinua, teff y maíz, almidones, productos lácteos, suplementos proteicos, hidrocoloides, ingredientes funcionales, y también tecnologías alternativas, como la fermentación de masa madre, el procesamiento enzimático y altas presiones (Zannini et al., 2012). Dado

que los almidones, féculas y harinas refinadas presentan un bajo valor nutricional, se busca desarrollar productos con un mejor perfil nutricional, a través del agregado de harinas no tradicionales, harinas integrales, subproductos ricos en fibra dietaria y derivados lácteos, entre otros (Ziobro et al., 2013).

Para suplir la ausencia del gluten se emplean sustancias poliméricas como los hidrocoloides, buscando que contribuyan a mantener la textura, el volumen, las características de la miga, la vida útil y la calidad sensorial (Šmídová y Rysová, 2022). Sin embargo, el pan sin gluten y otros productos panificados sin gluten son muy poco habituales para un consumidor acostumbrado al pan clásico de trigo (Toth, Vatai y Koris, 2020). Ya que los panes sin gluten suelen tener una miga menos flexible, que se endurece más rápido, y que es fácil de desmoronar. Además, el sabor de los productos sin gluten es diferente al de sus análogos con gluten, dependiendo de los ingredientes utilizados en su elaboración. Por otro lado, los productos sin gluten son fácilmente aceptados por personas que se encuentran bajo dieta libre de gluten desde la infancia mientras que cuando el diagnóstico se realiza en la adultez, la aceptación es más difícil (Šmídová y Rysová, 2022).

Así, al desarrollar productos panificados sin gluten, existen varios desafíos simultáneos: mejorar la calidad nutricional, tecnológica y sensorial, la aceptabilidad global y su vida útil.

1.3.2. Ingredientes

1.3.2.1. Harinas sin gluten y almidones

Históricamente, para el desarrollo de formulaciones sin gluten se empleaban harinas de maíz y arroz junto con almidones de maíz, papa, mandioca y proteínas e

hidrocoloides como agentes aglutinantes (Capriles y Arêas, 2014). En consecuencia, estos productos presentaban bajos niveles de fibra y micronutrientes en comparación con sus contrapartes que contienen trigo (do Nascimento et al., 2013; Thompson, 2000). En la actualidad, se usan también harinas de pseudocereales, legumbres, etc, lo que permite aumentar la variedad, la calidad nutricional y la palatabilidad de los productos sin gluten. En la Tabla 1 se enumeran harinas y almidones utilizados en panificación sin gluten.

Tabla 1. Harinas y almidones empleados en productos panificados sin gluten

Harinas y almidones convencionales	Alternativas				
	Harinas de cereales sin gluten	Harinas de pseudocereales	Harinas de raíces y tubérculos	Harinas de legumbres	Otras harinas
-Harina y almidón de arroz				-Soja	
-Harina y almidón de maíz	-Maíz	-Trigo Sarraceno		-Lenteja	-Lino
-Almidón de papa	-Sorgo	-Amaranto	Batata	-Algarroba	-Chía
-Almidón de mandioca	-Mijo	-Quinoa		-Garbanzo	-Castaña
				-Frijoles	-Banana verde

Adaptada de Capriles y colaboradores (2014)

El tipo de almidón utilizado en la formulación es importante debido a que presentan distinta capacidad de hinchamiento y retención de agua y aceite, así como también diferente comportamiento durante la gelatinización y posterior retrogradación dependiendo de su origen botánico, tamaño granular, contenido de amilosa/amilopectina y presencia o no de modificaciones químicas y físicas. También, la distribución de tamaño de las partículas de las harinas y almidones, la combinación de fuentes de almidón y otros ingredientes influyen en las

características de las masas y productos sin gluten (Capriles y Arêas, 2014; de la Hera et al., 2013; Sciarini et al., 2010).

Las masas sin gluten contienen más agua que las masas de trigo convencionales constituyendo sistemas semilíquidos complejos formados por polisacáridos y otros componentes formadores de estructura y que aumentan la viscosidad como proteínas e hidrocoloides. Estas masas líquidas se caracterizan por presentar una alta densidad y baja elasticidad (Cappelli, Oliva y Cini, 2020).

Los almidones se utilizan por su efecto gelificante y espesante, contribuyendo a las características de la masa o batido a través de la absorción de grandes cantidades de agua (Horstmann, Lynch y Arendt, 2017). Por lo que juegan un rol muy importante en las características reológicas de éstas. Además, contribuyen a la retención de humedad de los productos. En el proceso de cocción, los almidones, junto con las proteínas, contribuyen a la fijación de la estructura de los productos al gelatinizar. Dado que durante la cocción debe formarse una estructura suficientemente fuerte y flexible para mantener las burbujas de gas en expansión y no colapsar durante el horneado o el enfriamiento del producto y a que las harinas y los almidones sin gluten por sí solos no crean esa estructura, se agregan hidrocoloides en las formulaciones (Šmídová y Rysová, 2022).

1.3.2.2. Harina de Arroz

La harina de arroz se obtiene de la molienda del grano de *Oryza sativa* L. limpio, sano y exento de sus envolturas celulósicas (Código Alimentario Argentino (C.A.A Art 696, 2011)). Es la harina más comúnmente utilizada en las formulaciones sin gluten porque es un ingrediente accesible, económico, ampliamente disponible, de color blanco, sabor suave, fácil de digerir e

hipoalergénico. Además, presenta bajo contenido de sodio, grasa y fibra (Zannini et al., 2012) siendo el almidón el componente mayoritario. A pesar de estas ventajas, la harina de arroz presenta limitaciones tecnológicas cuando es empleada en panificación debido a las pobres propiedades funcionales de sus proteínas (Juliano, 1985). Por ello, se la utiliza junto con diferentes aditivos como hidrocoloides, proteínas, enzimas y emulsionantes para mejorar el volumen, la textura, la apariencia, la aceptación y la vida útil de los productos (Gujral y Rosell, 2004; Han et al., 2012).

Las características de la harina de arroz dependen de la variedad, las condiciones ambientales y de cultivo, el método de molienda y tratamientos previos realizados. Así, es posible obtener harinas de arroz con grandes variaciones en el contenido de amilosa/amilopectina, tamaño de partícula de la harina, etc, los que influyen en la absorción de agua, gelatinización, retrogradación y calidad final de los productos (Capriles y Arêas, 2014).

La harina de arroz tiene entre 6,3-7,1% de proteínas, presentando un alto contenido de glutelinas y una baja concentración de prolaminas (Marshall y Wadsworth, 1994), lo que determina que, aunque es deficiente en lisina presente un mayor contenido que otros cereales (Bechtel y Juliano, 1980). Los lípidos son un componente minoritario, sin embargo, contribuyen a las características nutricionales, sensoriales y funcionales.

1.3.2.3. Almidones

Entre las fuentes más comúnmente empleadas de almidón se encuentran el maíz (*Zea mays*), la papa (*Solanum Tuberosum*) y la mandioca (*Manihot esculenta*) (Roman, Belorio y Gomez, 2019; Zannini et al., 2012).

El almidón es el principal carbohidrato de reserva vegetal y se organiza en gránulos presentes en semillas, raíces y tubérculos, así como en tallos, hojas, frutos e incluso polen. Dependiendo del origen botánico, los gránulos presentan diferentes tamaños (0,1-200 μm) y formas (esferas, elipsoides, poligonales, etc) (Witczak et al., 2016). El almidón nativo en los gránulos es parcialmente cristalino, lo que influye en sus propiedades (Singh et al., 2003).

El almidón está compuesto por dos tipos de polímeros principales: la amilopectina ramificada y la amilosa lineal. En ambos casos, el bloque de construcción es un residuo de α -D-glucopiranososa, que forma enlaces α -1,4-glucosídicos en la estructura lineal de la amilosa (Figura 5) y ramificaciones adicionales a través de enlaces α -1,6-glicosídicos en las moléculas de amilopectina (Figura 6).

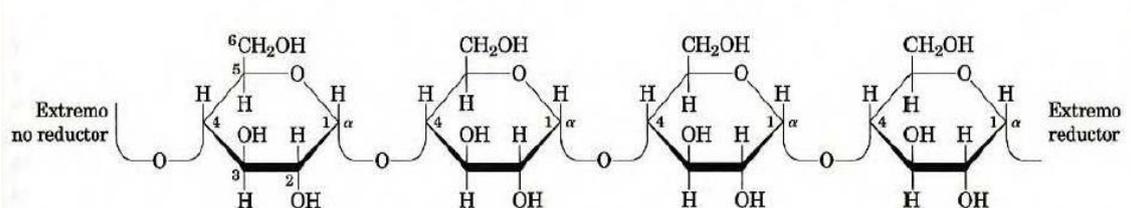


Figura 5. Fragmento de la cadena de amilosa. Fuente: (Lehninger, Nelson y Cox, 2005)

Las moléculas de amilosa poseen masas moleculares de alrededor de 10^6 Da y la organización de los residuos de α -D-glucopiranososa en la cadena de amilosa genera una estructura de forma helicoidal enrollada hacia la derecha. Por su parte, la amilopectina es una molécula de muy alta masa molecular, oscilando entre 10^7 y 5×10^8 Da con numerosas ramificaciones (Fennema et al., 2010). Las diferencias estructurales de ambos polímeros dan como resultado marcadas diferencias en sus propiedades. La amilosa es mucho más propensa al proceso de cristalización, llamado retrogradación, y puede formar geles duros y películas fuertes, mientras

que la amilopectina puede dispersarse en agua y retrogradar mucho más lentamente, lo que da como resultado geles blandos y películas débiles (Pérez y Bertoft, 2010).

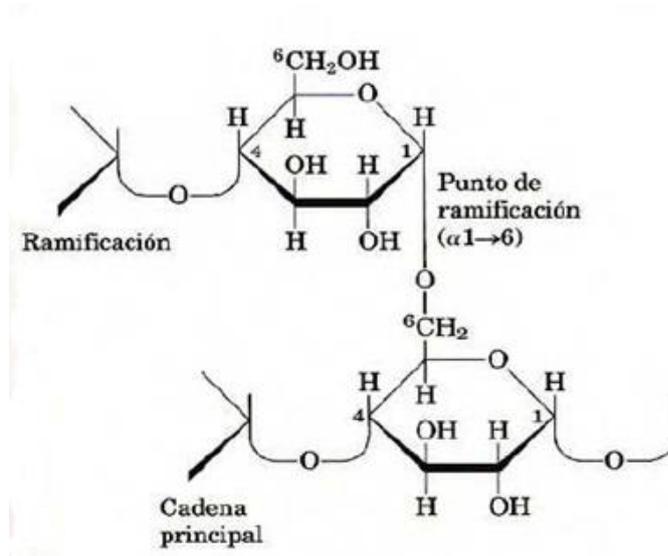


Figura 6. Tipos de unión en la amilopectina. Fuente: (Lehninger, Nelson y Cox, 2005)

Los gránulos de almidón están constituidos por regiones cristalinas, compuestas por moléculas ordenadas de amilopectina (regiones no ramificadas) y por regiones amorfas alternadas, compuestas principalmente por ramificaciones de amilopectina y por cadenas de amilosa. Debido a estas características el almidón es considerado un sólido semicristalino (Figura 7) (Pérez y Bertoft, 2010).

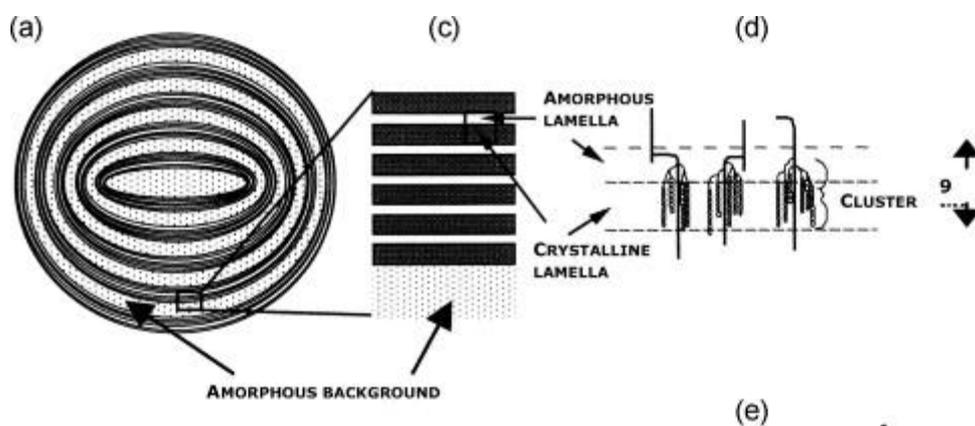


Figura 7. Estructura semicristalina del gránulo de almidón. Fuente: (Goesaert et al., 2005)

Al preparar una suspensión de almidón, el agua provoca el hinchamiento de los gránulos cuya extensión depende del origen botánico de los mismos. Así se ha visto que la absorción de agua es mayor en el almidón de papa, que en el de trigo, maíz y arroz (Witczak et al., 2016). Si en cambio, una suspensión de almidón (> 30_%) se calienta en agua a una temperatura de entre 60 y 75 °C ocurre la incorporación de agua por las zonas amorfas dando lugar a la pérdida de la cristalinidad e hinchazón irreversible de los gránulos, proceso denominado gelatinización. En este proceso, también ocurre la lixiviación de la amilosa del gránulo, la cual puede formar posteriormente complejos de inclusión si hay lípidos presentes.

Si en cambio, los gránulos de almidón se someten a un calentamiento en presencia de un exceso de agua y con la realización de un esfuerzo mecánico, se genera una pasta viscosa, la cual consiste en una fase continua de amilosa y/o moléculas de amilopectina y otra fase, discontinua constituida por gránulos de almidón rotos. Cuando esta pasta se enfría, la amilosa y la amilopectina se vuelven a asociar, alcanzando un estado de mayor orden, cristalino, este proceso es denominado retrogradación. La velocidad con la que retrogradan la amilosa y la amilopectina no es igual. La amilosa retrograda formando una estructura de dobles hélices que luego de unas horas dan lugar a un gel cristalino altamente estable. Mientras que la amilopectina retrograda más lentamente. De este modo, a la retrogradación de la amilosa se le atribuye la firmeza inicial del gel de almidón formado, mientras que a la retrogradación de la amilopectina el desarrollo a largo plazo de las estructuras del gel (Šmídová y Rysová, 2022).

Los almidones son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como gelificantes, espesantes, por su capacidad para retener humedad, emulsionar, formar películas y texturizar. En los productos panificados sin gluten el almidón podría mejorar la consistencia de los batidos durante el mezclado/amasado, contribuir a la suavidad de la miga, y controlar la fijación de la estructura de la miga durante la cocción (Gallagher, Gormley y Arendt, 2004). En el horneado, el almidón sufre una gelatinización parcial, en donde los gránulos se hinchan y parte de la amilosa es lixiviada. Luego del horneado, el pan se enfría y ocurre la retrogradación de la amilosa, atribuyéndosele a ésta la dureza inicial de los productos panificados frescos. Posteriormente, cuando los productos envejecen, ocurre el endurecimiento de la miga, la cual se atribuye, en parte, a la cristalización de la amilopectina (Figura 8) (Cheftel y Cheftel, 1992).

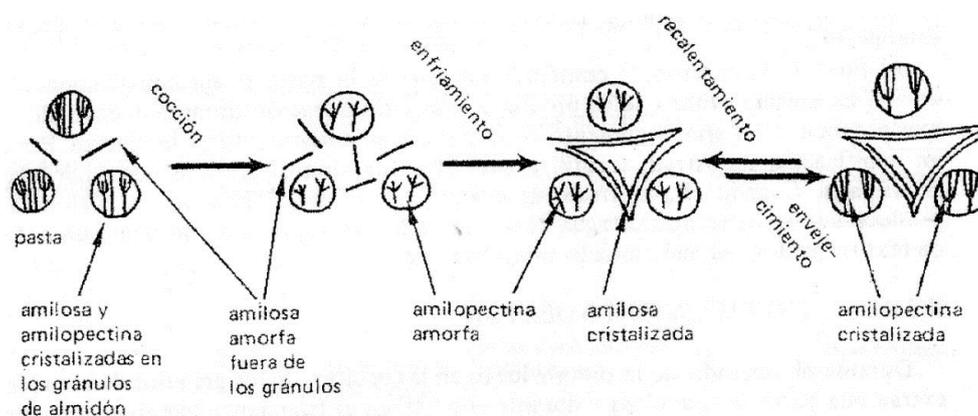


Figura 8. Envejecimiento del pan. Fuente: (Cheftel y Cheftel, 1992)

1.3.2.4. Hidrocoloides

La ausencia de gluten en los productos sin gluten presenta grandes desafíos tecnológicos porque las masas sin gluten tienen una consistencia líquida (Cauvain, 2007). Por lo tanto, se requieren sustancias poliméricas para lograr que los batidos presenten las características viscoelásticas adecuadas para el desarrollo de productos panificados sin gluten de buena calidad, para mejorar las características

estructurales, la sensación en la boca, la aceptabilidad, y la vida útil (Zannini et al., 2012). Los hidrocoloides o gomas son polisacáridos hidrofílicos de cadena larga y alto peso molecular, extraídos de plantas, algas marinas y fuentes microbianas, gomas derivadas de exudados de plantas y biopolímeros obtenidos por tratamiento químico de celulosa (Dickinson, 2003). Estos compuestos son ávidos de agua, presentan propiedades coloidales y muchos son capaces de producir geles. Generalmente, los hidrocoloides mejoran la textura, la apariencia y el volumen de los productos. Sin embargo, su acción depende del tipo de hidrocoloide, estructura química, dosis utilizada y de la posible interacción con otros polímeros e ingredientes presentes en las formulaciones. Entre los hidrocoloides más utilizados están la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la goma xántica, psyllium y goma guar (Roman, Belorio y Gomez, 2019). Particularmente, se destaca la HPMC (Figura 9) por los mayores volúmenes específicos alcanzados con su utilización, lo cual se relaciona con su capacidad de formar geles termorreversibles. Estos geles se forman al calentarse durante el horneado (porque se deshidrata lo que favorece las interacciones hidrofóbicas) y contribuyen a estabilizar la estructura de la miga gelatinizada, pero luego al enfriarse los productos, estos geles revierten, reduciendo la firmeza de la miga después del horneado (Crockett, Ie y Vodovotz, 2011).

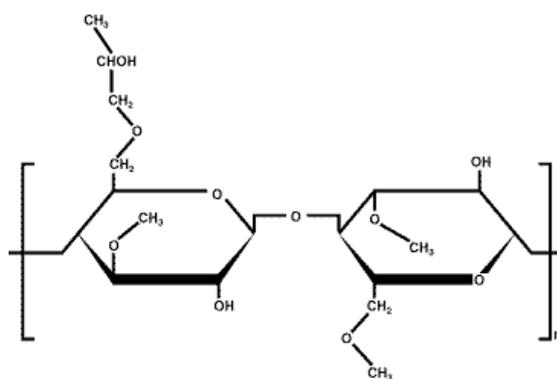


Figura 9. Fórmula de la HPMC. Fuente: Dow Chemical

1.3.2.5. Proteínas y harinas como fuentes proteicas

Dado que las harinas y almidones que se emplean más frecuentemente para la elaboración de productos sin gluten tienen un bajo contenido proteico, se suelen agregar proteínas como tales o bien harinas con mayor contenido de proteínas. Entre las fuentes proteicas más comúnmente utilizadas se encuentran el suero de leche, la leche entera o descremada, el huevo y la clara de huevo. Además, también se suelen utilizar harinas de leguminosas y de pseudocereales. Las proteínas se agregan, por un lado, para mejorar el perfil nutricional y sensorial y por otro, por una función estructural. Con su adición se busca formar una red que puede imitar algunas de propiedades del gluten, mejorando las propiedades reológicas de los batidos y las características estructurales, sensoriales y la vida útil de los productos finales (Capriles y Arêas, 2014).

Proteínas del huevo

La clara de huevo está formada principalmente por agua (88 %) así como por proteínas (11 %) de alto valor biológico, carbohidratos (1 %) y minerales (0,5 %). Estas proteínas contienen a los nueve aminoácidos esenciales, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina; lo cual es de gran importancia nutricional ya que estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por el hombre, sino que deben ser ingeridos (Santana-Portbén, 2008; Sayar, 2014).

Las proteínas principales de la clara de huevo son la ovoalbúmina (54 %) y la ovomucina (11 %). Asimismo, la clara del huevo contiene vitaminas y también posee factores antinutricionales, el inhibidor de tripsina y avidina, pero éstos son

termolábiles, por lo que se destruyen cuando la clara es sometida a un tratamiento térmico (Santana-Porbén, 2008).

En la producción de panificados libres de gluten estas proteínas contribuyen a través de la formación de films viscoelásticos, fuertes y cohesivos que mejoran la retención de gas (Zannini et al., 2012). La clara de huevo no sólo se adiciona a los productos alimenticios para aumentar su valor nutricional, sino también permite mejorar la emulsión, el batido, así como la formación de espuma del producto y las propiedades de gelificación (Arendt et al., 2008). Por ende, la incorporación de la clara de huevo permite la obtención de productos panificados con una mejor calidad y estructura y a su vez mejoran el perfil nutricional de los productos.

Proteínas lácteas

La utilización de proteínas lácteas es otra estrategia empleada para mejorar la calidad de los productos sin gluten. Varios trabajos han abordado su inclusión en sistemas sin gluten, demostrando que tienen propiedades funcionales similares al gluten ya que son capaces de formar una estructura tipo red (Gallagher et al., 2003). Los ingredientes lácteos se aplican para obtener beneficios tanto nutricionales como tecnológicos, entre ellos, mejora del sabor y textura y reducción del envejecimiento (Arendt et al., 2008). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el daño que causa la celiaquía en las vellosidades intestinales deja a algunos individuos intolerantes a la lactosa. Por lo tanto, la lactosa puede limitar la aceptación de estos productos.

1.3.2.6. Materia grasa

Las grasas y aceites son un componente importante en la elaboración del pan, ya que contribuyen a alcanzar mayores volúmenes y al retraso del endurecimiento.

Además, proporcionan ternura, lubricación, mayor transferencia de calor y sensación agradable al paladar (Roman, Belorio y Gomez, 2019; Smith y Johansson, 2005).

1.4. Productos panificados sin gluten dulces

Los productos panificados tales como bizcochuelos, magdalenas y budines son productos relativamente densos con miga tierna y sabor dulce. Estos productos se consumen en gran medida en el desayuno o merienda.

Los batidos a partir de los cuales se obtienen pueden ser considerados como una emulsión de aceite en agua con una fase acuosa continua que contiene los ingredientes secos disueltos o suspendidos (Ronda et al., 2011). La viscosidad de estos batidos es determinante de su capacidad para retener el aire incorporado durante la etapa de mezclado y batido (Sahi y Alava, 2003). Así, las características de calidad de los productos finales dependen de la aireación alcanzada durante el batido y de la estabilidad de las burbujas de gas durante el horneado, ya que esto va a definir el volumen final alcanzado y las características texturales de la miga. Asimismo, el volumen final también depende en gran medida de la temperatura de gelatinización del almidón. Una mayor temperatura de gelatinización da lugar a una mejor expansión de la masa y por ende a mayores volúmenes específicos (Gularte et al., 2012). Otros factores que impactan sobre la calidad tecnológica son el tipo de harina y el tamaño de partícula, el método de molienda y la presencia de otros ingredientes y aditivos como fibra dietaria, gomas, emulsificantes, etc (Xu et al., 2020).

1.5. Subproductos de la industria alimentaria

A nivel mundial anualmente la industria alimentaria genera gran cantidad de “residuos” o subproductos, muchos de los cuales no son aprovechados o sólo se utilizan para alimentación animal. Es tal el volumen de subproductos generados que pueden constituir un problema serio para las industrias que los generan ya que éstas les deben suministrar un tratamiento adecuado para su disposición. Por otro lado, estos subproductos son proclives al deterioro microbiano por lo que su aprovechamiento de manera eficiente, con bajo costo y a través de procesos amigables con el ambiente reviste cada vez mayor importancia (Schieber, Stintzing y Carle, 2001). Es así que en los últimos años ha surgido, el concepto de economía circular basado en el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar el aprovechamiento de los recursos y para la eliminación del concepto de “residuo” a lo largo de la cadena de suministro. En este modelo, los materiales se reciclan, un proceso en el que los desechos se transforman en productos de valor agregado al convertirlos en elementos de entrada para otros productos (Ancuța y Sonia, 2020).

Una solución para reducir los desperdicios de alimentos es aprovechar los subproductos ya que estos suelen contener compuestos con numerosos beneficios para la salud y que podrían emplearse en distinto tipo de productos. Los subproductos alimentarios son variados y difieren en su origen, entre ellos podemos enumerar: cáscaras de frutas, tallos, hojas, semillas, salvado, granos, orujo, torta de aceite, etc. (Martins, Pinho y Ferreira, 2017).

Por otro lado, en la actualidad cada vez existe mayor conciencia por parte de los consumidores sobre la importancia de proteger el medio ambiente y de

desarrollar un sistema alimentario sostenible por lo que se requieren conductas que apoyen este tipo de iniciativa.

1.6. Subproducto de la extracción de aceite

En el proceso de obtención de aceite de nuez, se obtiene una torta de prensado que es rica en lípidos de buena calidad y presenta, además, un alto contenido de proteínas, fibra, minerales y otros compuestos bioactivos. A través de un proceso de molienda de la torta de prensado es posible obtener harina de nuez. Para esta harina, se han informado valores de lípidos entre 5-41%, proteínas entre 24 – 39.% cenizas entre 3,7- 6,1 % y de carbohidratos entre 31-50 %, lo cual depende del método de extracción utilizado (solventes o prensado) (Labuckas, Maestri y Lamarque, 2014; Rabadán, Pardo, Gómez, et al., 2018a). De este modo, aunque la mayor parte de los lípidos son extraídos, la harina obtenida contiene todavía una fracción lipídica significativa caracterizada por ser rica en ácidos grasos poliinsaturados y por contener un alto contenido de vitamina E. Además, la harina presenta un elevado contenido de proteínas con un buen balance de aminoácidos esenciales (Mao y Hua, 2012), diversos compuestos bioactivos como melatonina, serotonina y polifenoles y un alto contenido de minerales (Martínez et al., 2010). Por lo tanto, este “residuo” de la obtención de aceite contiene componentes que permitirían incrementar el valor nutricional de aquellos alimentos en los cuales se utilice como ingrediente. Con lo cual se estaría agregando valor a este subproducto, lo que podría aportar beneficios económicos para quienes lo producen (Elleuch et al., 2011). Existen registros del uso de harina de nuez en productos cárnicos, lácteos y panificados, en los cuales se observó un efecto positivo desde el punto de vista sensorial (Ayo et al., 2008; Cofrades et al., 2008; Martínez et al., 2010).

Si bien la obtención de aceite de nuez es un proceso aún incipiente en nuestro país, dado que los consumidores están cambiando su forma de ver y elegir a los alimentos, cada vez más buscan consumir productos saludables, lo cual hace probable que crezca aún más la demanda de productos como el aceite de nuez (Niamh, 2016).

Capítulo 2: Objetivos

Capítulo 2

2.1. Objetivo general:

Establecer las características fisicoquímicas y nutricionales de la harina de nuez y el efecto de la adición de dicha harina de nuez en la calidad de los budines libres de gluten.

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar la composición química de la harina de nuez, su microestructura, las interacciones con otros componentes y su estabilidad durante el almacenamiento.
- Evaluar el efecto ocasionado por la incorporación de harina de nuez sobre los cambios térmicos, reológicos, termoreológicos y microestructurales experimentados por los batidos libres de gluten.
- Optimizar el uso de harina de nuez en el desarrollo de budines libres de gluten, frescos y almacenados, aceptables desde el punto de vista tecnológico, nutricional y sensorial.

Capítulo 3:

Caracterización de la

harina de nuez

Capítulo 3

3.1. Introducción

La harina de nuez se obtiene a través de la molienda del subproducto de la obtención de aceite de nuez. Entre los métodos empleados para la extracción de aceite a partir de la nuez se encuentran la extracción con solventes como el hexano, la extracción por prensado (prensa hidráulica o tornillo) y la extracción supercrítica (Martínez, 2014). La extracción con solventes da lugar al mayor rendimiento industrial, pero aceites de peor calidad mientras que la extracción con fluidos supercríticos da lugar a aceites de buena calidad, pero con un costo elevado (Roncero et al., 2016). Por lo tanto, la obtención de aceite por prensado en frío se ha identificado como la más conveniente ya que permite la obtención de aceites de buena calidad y a bajo costo (Rabadán, Pardo, Gómez, et al., 2018a)

En todos los casos, la producción de aceite de nuez (*Juglans regia* L.) lleva a la obtención de una torta parcialmente desgrasada cuya composición depende del método de extracción utilizado (Labuckas, Maestri y Lamarque, 2014) pero generalmente contiene un alto contenido de lípidos poliinsaturados y también proteínas, fibra, minerales y compuestos bioactivos (Mao y Hua, 2012). Además del método de extracción, las variedades de cultivo y condiciones de cosecha relacionadas con las condiciones medioambientales impactan en las características de los productos obtenidos (Rabadán, Pardo, Pardo-Giménez, et al., 2018).

Es así que las características composicionales de este subproducto muestran su potencial para ser utilizado como suplemento en productos dietéticos o como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales.

3.2. Objetivos del capítulo

3.2.1. Objetivo general del capítulo

Evaluar las características fisicoquímicas y el valor nutricional de harina de nuez, como un subproducto de la industria aceitera.

3.2.2. Objetivos específicos del capítulo

- Determinar la composición nutricional, la actividad antioxidante y las propiedades tecno-funcionales de la harina de nuez.
- Determinar la estabilidad oxidativa de los lípidos presentes en la harina de nuez.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Materiales caracterizados

Para la experimentación se utilizó harina de nuez (*Juglans regia* L.) empacada al vacío y provista por Grupo Aceites del Desierto SRL (Provincia de Córdoba, Argentina).

3.3.2. Composición proximal

El contenido de humedad, proteínas, lípidos, fibra dietaria total y carbohidratos fueron determinados según los siguientes métodos.

3.3.2.1. Contenido de humedad

La determinación de humedad se realizó por secado en estufa al vacío hasta peso constante. En cajas de Petri pequeñas se pesó aproximadamente 1,5 gramos de harina de nuez por triplicado. Las muestras se llevaron a estufa de vacío (Arcano, China) a 70°C conectada a una bomba de diafragma PC500 Series-CVC 3000 (Vacuubrand GMBH + CO KG, Alemania) a una presión de 50-55 mbar hasta alcanzar peso constante. El cálculo de la humedad de las muestras se realizó según la Ecuación 1.

$$\text{Humedad} \left[\frac{g}{100g} \right] = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_3)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde m_1 es la masa de la caja de Petri con la muestra [g], m_2 es la masa de la caja de Petri con la muestra luego del secado [g] y m_3 es la masa de la caja de Petri sin muestra [g].

3.3.2.2. Contenido de lípidos

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas predominantemente hidrófobas que tienen diversas funciones, portadores de energía, estructuradores de la membrana celular, protectores de órganos, mediadores hormonales, entre otras (Burdge y Calder, 2014). Dado que en el fruto entero (nuez) los lípidos son el componente mayoritario (Amaral et al., 2003; Martínez, Mattea y Maestri, 2006), su cuantificación en el subproducto es de suma importancia. La determinación se realizó de acuerdo al método AACC 30-25.01, con ligeras modificaciones, empleando un equipo Soxhlet. La muestra se colocó en un cartucho de papel de filtro y como solvente de extracción se usó una mezcla de éter sulfúrico: éter de petróleo (1:1); se llevaron a cabo 7 sifonadas consecutivas. Luego, se cuantificó gravimétricamente la materia grasa una vez eliminados los solventes. El ensayo se realizó por triplicado y para el cálculo se usó la Ecuación 2

$$\text{Lípidos} \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{m_2 - m_1}{m} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde m_2 es la masa del balón con la materia grasa seca [g], m_1 es la masa del balón vacío [g] y m es la masa de muestra utilizada [g].

3.3.2.3. Contenido de proteínas

La importancia de las proteínas en los sistemas alimentarios es notable. Poseen propiedades funcionales que ayudan a establecer la estructura y propiedades finales del producto alimenticio (Badui Dergal, 2016). Para determinar el contenido de proteínas se utilizó el método de Kjeldahl (AACC 46-12.01), en el que se cuantifica el contenido de nitrógeno total de la muestra. Para la harina de nuez se usó el factor de conversión de nitrógeno a proteína 5,3,

recomendado para nueces (Mariotti, Tomé y Mirand, 2008), obteniéndose así el contenido de proteína bruta de la muestra. Se pesó con exactitud 1 g de HN en balanza analítica. Se trasvasó a un tubo de digestión/destilación de Kjeldahl y se agregaron H₂SO₄ 98 % p/p, mezcla catalizadora (CuSO₄·5H₂O: K₂SO₄ proporción 1:10) y plato poroso, una vez armado el equipo, se colocaron los tubos en el digestor. La digestión persigue la liberación del nitrógeno, que permanece solubilizado en forma de NH₄⁺ en el ácido sulfúrico y al mismo tiempo la eliminación del carbono en forma de CO₂, esto por la acción de altas temperaturas en medio ácido. Posteriormente, el material digerido se diluyó con agua destilada en proporción 1:1, y se destiló previa alcalinización con NaOH 32 % p/p. La alcalinización permite la volatilización del nitrógeno en la forma de NH₃. Para la destilación se empleó un equipo semiautomático Büchi K350 (Suiza). El NH₃ destilado fue recogido en un Erlenmeyer conteniendo H₃BO₃ 4 % p/p e indicador Mortimer (rojo de metilo y verde de bromocresol en solución alcohólica). El medio ácido del ácido bórico solubiliza nuevamente el NH₃, esto produce un cambio de color en el indicador, de anaranjado rojizo a turquesa conforme el nitrógeno es atrapado durante la destilación. Para cuantificar el contenido de nitrógeno recogido durante la destilación se realizó una titulación ácido-base con HCl 0,1N valorado. El cálculo del porcentaje de proteína se realizó según la Ecuación 3. Conjuntamente con las muestras se corrió un blanco. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

$$Proteínas \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{(V_m - V_b) \cdot N \cdot F_c P_{eqN}}{m} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde V_m es el volumen de titulante gastado para titular la muestra [L], V_b es el volumen de titulante gastado para titular el blanco [L], N es la normalidad del

titulante [eq/L], F_c es el factor de conversión de nitrógeno a proteínas, P_{eqN} es el peso equivalente del N [g/eq] y m es la masa de muestra [g].

3.3.2.4. Contenido de cenizas

La cuantificación de cenizas se realizó siguiendo el método AACC 08-01.01. Para esto, se pesaron con exactitud aproximadamente 3 g de muestra sobre cápsulas de porcelana previamente pesadas. Se carbonizaron las muestras bajo campana usando un mechero. Una vez carbonizadas, las cápsulas se llevaron a una mufla (Hornos Eléctricos S.A., Argentina) y fueron calcinadas a 550 °C hasta observarse cenizas de color grisáceo, las cápsulas fueron pesadas una vez frías. El ensayo se realizó por triplicado y para el cálculo se usó la Ecuación 4

$$\text{Cenizas} \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde m_2 es la masa de la cápsula con los residuos de ceniza [g], m_1 es la masa de la cápsula vacía [g] y m_3 es la masa de la cápsula con la muestra [g].

3.3.2.5. Contenido mineral

Se determinó el contenido de Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe, Mn, Mo, Se y Zn por espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo. La HN se sometió a una digestión por microondas con HNO₃, se filtró y se determinó el contenido mineral según el método EPA 6010D (2014).

3.3.2.6. Contenido de fibra dietaria total

Es posible definir a la fibra dietaria total como los carbohidratos no digeribles y ligninas, que son intrínsecos en las plantas, junto con los carbohidratos no digeribles que tienen efectos fisiológicos benéficos para los seres humanos

(Elleuch et al., 2011). Otros autores, incluyen en esta definición a los carbohidratos sintéticos no digeribles y a fibra de origen animal (Borderías, Sánchez-Alonso y Pérez-Mateos, 2005). Se cuantificó el contenido de fibra dietaria total de acuerdo al método AACC 32-05.01, método enzimo-gravimétrico, con el empleo de un kit comercial (“Total Dietary Fiber Kit Assay” de Megazyme U.C., Irlanda). Para lo cual, se pesaron por duplicado y con exactitud 1 g de muestra en vasos de precipitados Berzelius de 500mL. Se añadieron, a cada vaso, 50mL buffer fosfato (0,08 M; pH 6,0) tras corroborar pH $6,0 \pm 0,1$ se añadieron 50 μ L de solución de α -amilasa termoestable. Los vasos fueron cubiertos con papel aluminio y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 30 min, agitándolos con cuidado cada 10 min. Una vez transcurrida la media hora, los vasos fueron enfriados a temperatura ambiente, se ajustó el pH a $7,5 \pm 0,1$ y se añadieron 100 μ L de solución de proteasa, los vasos se cubrieron nuevamente y se calentaron a 60 °C en baño de agua con agitación magnética durante 30 min. Tras lo cual, los vasos se volvieron a enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a $4,5 \pm 0,2$. Se añadieron 200 μ L de solución de amiloglucosidasa y se calentaron nuevamente a 60 °C en baño de agua con agitación magnética durante 30 min. Transcurrida esta media hora, a cada vaso se añadieron 270 mL de alcohol 96 % precalentado a 60 °C. Los vasos se cubrieron nuevamente con papel aluminio y se dejaron decantar por 60 min. Después de lo cual, se filtró el contenido de los vasos usando crisoles de vidrio fritado, previamente tarados, y una capa de celite como lecho filtrante. La filtración se llevó a cabo en el equipo de filtrado CSF 6 (Velp Scientifica Srl, Italia). Los crisoles con el residuo de fibra se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante. Después de registrar los pesos, se cuantificaron cenizas (AACC 08-01.01) y proteínas (AACC 46-12.01) de los residuos, las determinaciones se realizaron al menos por

duplicado y se utilizó la Ecuación 5 para calcular el contenido de fibra dietaria total en las muestras.

$$\text{Fibra Dietaria Total} \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{((R_1 - R_2)/2) - P - C}{((m_1 + m_2)/2)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde R_1 y R_2 son la masa de los residuos de las muestras 1 y 2 [g], m_1 y m_2 son las masas de las muestras 1 y 2 [g] y P y C son los pesos de proteína y cenizas de los residuos, respectivamente.

3.3.2.7. Contenido y composición de carbohidratos

Se calculó el contenido de carbohidratos totales diferentes de fibra, con la Ecuación 6

$$\text{Carbohidratos} \left[\frac{g}{100 g} \right] = 100 - (\%H + \%P + \%L + \%C + \%F) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde $\%H$, $\%P$, $\%L$, $\%C$ y $\%F$ son los contenidos de humedad, proteína, lípidos, cenizas y fibra dietaria total, respectivamente.

Por otra parte, la composición de carbohidratos simples se determinó por HPLC utilizando un cromatógrafo Waters 1525 (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un detector de índice de refracción (Waters 2414, Massachusetts, EE.UU.) y equipado con una columna C18-amida (4,6 × 150 mm) de 3,5 μm de tamaño de partícula (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, EE.UU.). La fase móvil fue una solución isocrática de acetonitrilo: agua (75:25) con 0,2 % de etilendiamina (caudal: 1,0 mL/min). Los azúcares solubles se extrajeron con agua Milli-Q y, a continuación, con las soluciones Carrez I y II, preparadas al disolver 3,6 g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ en 100 mL de agua y 7,2 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 mL de agua, respectivamente. El contenido de almidón se

determinó tras la hidrólisis total con HCl a reflujo. Se utilizaron estándares externos (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.) de fructosa, glucosa y sacarosa. Los cromatogramas se integraron utilizando el software PeakFit (versión v4.12).

3.3.3. Antioxidantes

Entre los compuestos prooxidantes están los radicales libres. Un radical libre es una especie química, capaz de existir de forma independiente, con uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior y que posee una alta e indiscriminada reactividad (Halliwell et al., 1995). Asimismo, existen los compuestos antioxidantes con la habilidad para quelar metales, inhibir o potenciar una actividad enzimática y/o atrapar radicales libres. Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden ayudar a prevenir algunos procesos dañinos (Vilaplana, 2007). Existen pruebas consistentes de que las dietas altas en frutas, hortalizas y otros alimentos vegetales (e. g. los frutos secos) se asocian con menores tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Stanner et al., 2004)

3.3.3.1. Obtención del extracto para determinar la actividad antioxidante

Se mezcló HN (1,5 g) con 10 mL de acetona, se agitó durante 15 min y luego se centrifugó (15 min, 1333×g). El pellet insoluble obtenido se volvió a extraer dos veces más con una mezcla acetona: agua (70:30 v/v). Posteriormente, todos los sobrenadantes se combinaron, se agitaron en un tubo con cloroformo (2:1 cloroformo: acetona) y se almacenaron durante la noche (4 °C). La fase acuosa se recogió y la acetona residual se evaporó en un rotavapor (R-124 BÜCHI, Suiza) (Guardianelli, Salinas y Puppo, 2019).

3.3.3.2. Contenido de polifenoles totales

A partir del extracto acuoso antes mencionado, se determinó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Donde los compuestos polifenólicos reducen, en medio básico, al reactivo de Folin- Ciocalteu (compuesto por los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico), obteniéndose un compuesto de coloración azul susceptible de ser determinado espectrofotométricamente a 765.nm. Se empleó como estándar el ácido gálico y los resultados se expresaron como μmol de equivalentes de ácido gálico por gramo de HN.

3.3.3.3. Actividad antioxidante

De igual forma, a partir del extracto obtenido en 3.3.3.1 se realizaron los siguientes ensayos:

✓ Capacidad de reducción del ion férrico (FRAP por sus siglas en inglés): Se realizó según la metodología descrita por Benzie y Strain (1999). Este método permite evaluar la capacidad de una muestra para reducir el catión Fe^{+3} a Fe^{+2} dando lugar a la formación de un complejo de color azul con el ligando presente en el reactivo (TPTZ). Para preparar el reactivo de FRAP se mezclaron cloruro férrico, TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) y buffer acetato (pH 3,6). Luego, 1800 μL de este reactivo recién preparado, se mezclaron con 200 μL del extracto antioxidante de HN y se agitó la mezcla vigorosamente. Después de 90 minutos en la oscuridad, se midió la absorbancia a 593 nm. Se preparó un blanco de reactivo con solución FRAP y agua Milli-Q en lugar del extracto antioxidante. Se preparó una curva de calibración utilizando FeSO_4 .

✓ Capacidad de secuestrar al catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$: Este método permite evaluar la capacidad antioxidante de una muestra a través de la

donación de un átomo de hidrógeno o un electrón al catión radical ABTS^{•+}. El ABTS^{•+} es de color azul-verdoso y presenta un máximo de absorción a 734nm, registrándose una disminución de la absorbancia en presencia de antioxidantes en la muestra en estudio.

El radical catiónico ABTS^{•+} se produjo por la oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolino-6-sulfónico) con peroxidisulfato de potasio (K₂S₂O₈). La solución se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso (1 h). Se añadió un volumen de 1000 µL de solución de ABTS^{•+} a 50 µL del extracto. La absorbancia se midió a los 6 minutos después de la mezcla inicial. Se preparó una curva de calibración utilizando Trolox. La actividad antioxidante se expresó en equivalentes de Trolox (TEAC) como TEAC µmol /g de harina.

✓ Capacidad de secuestrar al radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH): El DPPH es un radical libre estable de color púrpura que se convierte en un compuesto descolorido en presencia de antioxidantes que pueden transferir un electrón o donar un átomo de hidrógeno. Este cambio de color se mide espectrofotométricamente a 517 nm. La eficacia antioxidante se informa como IC50: la concentración de extracto necesaria para disminuir a la mitad la concentración inicial de DPPH. La estimación del valor IC50 se realizó mediante una curva dosis-respuesta (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995).

3.3.4. Calidad lipídica

De particular interés es evaluar la composición de los lípidos presentes en la harina de nuez. Dado que las nueces poseen una considerable cantidad de lípidos monoinsaturados y altas cantidades de lípidos poliinsaturados (Parra, 2008), los

que pueden ofrecer beneficios para la salud. Cuando se consumen en cantidades suficientes, protegen al sistema cardiovascular y contribuyen a disminuir los niveles de colesterol total en la sangre. Asimismo, algunas investigaciones muestran que los lípidos monoinsaturados pueden regular los niveles de insulina y ayudar a controlar el nivel de glucosa en la sangre, lo que puede ser especialmente útil en personas con diabetes tipo 2 (Zeratsky, 2021).

3.3.4.1.Extracción de aceite de la harina de nuez

Para la extracción del aceite remanente en HN se utilizó el método de Folch (1957) que utiliza una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) como solventes. Para evaporar la mezcla de solventes y recuperar el aceite se usó un rotavapor Büchi R-124, (Büchi Labortechnik AG, Suiza) a 40 °C y 200 Torr de presión.

3.3.4.2.Perfil de los ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en los triglicéridos difieren en la longitud de la cadena hidrocarbonada y en la presencia, número y posición de los dobles enlaces en la cadena. La distribución de los ácidos grasos influye en sus propiedades funcionales y en la forma en la que se metabolizan (Burdge y Calder, 2014). Para caracterizar dicha distribución es útil determinar el perfil de ácidos grasos.

La determinación del perfil de ácidos grasos de la harina de nuez se realizó por cromatografía gaseosa. En primer lugar, se realizó la derivatización de los ácidos grasos, con el fin de aumentar su volatilidad, para lo cual se colocaron 150 µL de aceite de HN y 4 mL de HCl 5 % en metanol (con Na₂SO₄) en tubos hach. Los tubos se calentaron, en un baño de agua a ebullición, durante 10 minutos, cuidando que estuvieran bien cerrados. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfriaron y se

añadieron 2 mL de agua miliQ junto con 1 mL de hexano calidad HPLC y se homogenizó la mezcla. Los metil-ésteres de los ácidos grasos se encuentran disueltos en el hexano, por ello con la finalidad de separar las fases, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos usando una centrifuga Rolco CM 2036 Duron (Rolco Srl, Argentina). Inmediatamente después, el hexano se separó y filtró (0,45 µm) directo a viales color ámbar. Finalmente, las muestras se analizaron en un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890A. (Agilent Technologies, EE.UU.) con detector de ionización de llama (temperatura del inyector, 250 °C) usando una columna capilar DB-23 (30.m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor) y un estándar externo Supelco 37 component FAME MIX, (Sigma Aldrich, EE.UU). Bajo las siguientes condiciones de corrida: temperatura inicial 50 °C durante 1 minuto, rampa de temperatura 1: 25 °C/minuto hasta 175 °C, rampa de temperatura 2: 4.°C/minuto desde 175 °C hasta 230 °C y temperatura final 230 °C durante 15 minutos.

3.3.4.3. Estabilidad oxidativa

La autooxidación es la principal causa de deterioro de la calidad de los lípidos comestibles y su velocidad de reacción determina su vida útil. Al comienzo, la reacción es lenta hasta que se produce una acumulación suficiente de especies reactivas que promueven el aumento de la velocidad de reacción (Farhoosh, 2007). Es así que el seguimiento de la estabilidad oxidativa de los lípidos es de suma importancia en la industria alimentaria, con el fin de controlar y optimizar el proceso de producción y predecir la vida útil de los productos finales en los cuales el contenido lipídico es importante (Zaanoun et al., 2014). Se han desarrollado varios métodos para determinar la estabilidad oxidativa de los lípidos: están los

ensayos acelerados (Rancimat), los ensayos químicos (índices de peróxidos y de acidez) y los ensayos espectrofotométricos (índice de anisidina), entre otros.

3.3.4.3.1. *Ensayo estabilidad acelerada por Rancimat*

Entre los ensayos acelerados para probar la resistencia de los lípidos comestibles a la oxidación están los que utilizan temperaturas elevadas. Esto porque se sabe que la velocidad de la reacción está relacionada exponencialmente con la temperatura (Reynhout, 1991). Uno de ellos es el ensayo con Rancimat, debido a su reproducibilidad y su relativa facilidad de uso. Este ensayo permite determinar el tiempo de inducción (t_i) o índice de estabilidad oxidativa, que es el tiempo que transcurre antes de que se produzca un rápido deterioro de los lípidos (Zaanoun et al., 2014). Tiempo que es comparable con el nivel de rancidez que genera un cambio detectable por el consumidor en las características del producto (Mizrahi, 2004). Como se observa en la Figura 10, el software provisto con el equipo Rancimat (Metrohm, Herisau, Suiza) detecta la inflexión en la curva de conductividad vs tiempo, esto es, detecta el punto de intersección de las tangentes a las secciones rectas extendidas de la curva (Metrohm AG, 2009).

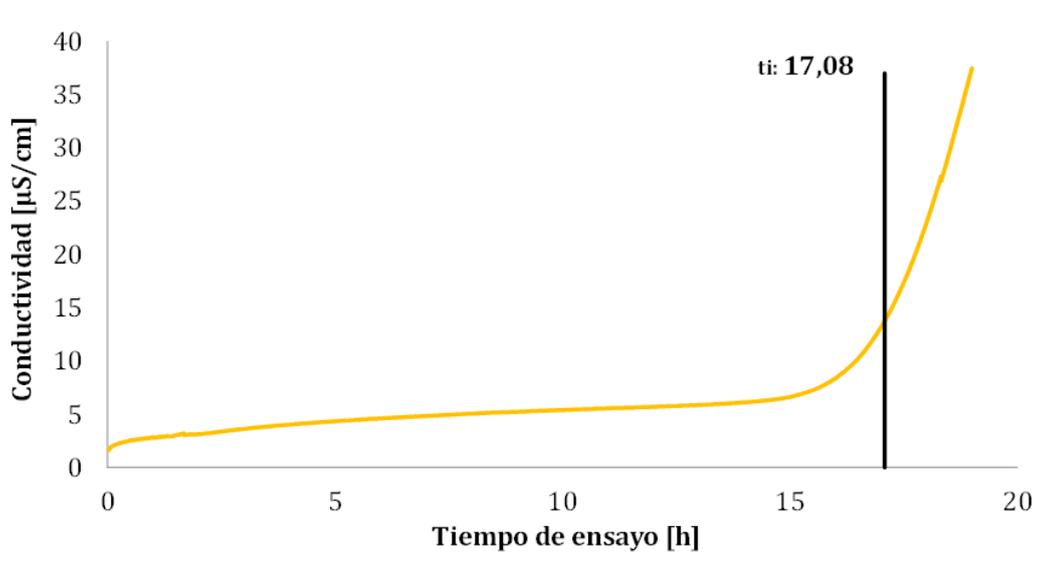


Figura 10. Determinación del tiempo de inducción de harina de nuez a 100 °C usando Rancimat

Se determinó el tiempo de inducción (t_i) para la harina de nuez a 4 temperaturas: 100, 110, 115 y 120 °C, en un equipo Rancimat (Metrohm, Herisau, Suiza). Se pesaron $0,90 \pm 0,01$ g de harina de nuez dentro del tubo de reacción, se cerró el sistema y se inyectó aire filtrado a un flujo de 20 L/hora, midiéndose la conductividad del agua contenida en el tubo recolector. El equipo detecta un aumento en la conductividad del agua debido a la presencia de compuestos volátiles generados por la oxidación de los lípidos en la HN. A partir de este ensayo de estabilidad acelerada es posible obtener, en un tiempo relativamente corto, la información necesaria para estimar la vida útil de la harina de nuez. Esto mediante la determinación de parámetros cinéticos que tienen en consideración la dependencia del tiempo de inducción con la temperatura.

Parámetros cinéticos para la predicción de la vida útil

Una herramienta conveniente para establecer el efecto de la temperatura en la estabilidad oxidativa de una muestra es utilizando el modelo ampliamente conocido de Arrhenius. Así, es posible despejar la energía de activación (E_A), que es una medida de la sensibilidad de la reacción a la temperatura, es decir, cuanto más rápido se llevará a cabo la reacción si se eleva la temperatura.

$$k = k_0 e^{\left(\frac{-E_A}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde k es la constante de velocidad y k_0 es el factor pre-exponencial o factor de frecuencia (indica la frecuencia con la que se producen las colisiones entre moléculas), E_A = energía de activación, R = la constante de los gases y T = temperatura absoluta [°K]. Debido a que la obtención del tiempo de inducción se llevó a cabo en condiciones isotérmicas es posible asignar a k el valor de la

Ecuación 8. Este enfoque es posible porque se considera que el t_i [segundos] es el tiempo crítico que marca el final de la vida útil del producto (Mizrahi, 2004).

$$k = \frac{1}{t_i} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siguiendo la metodología usada por Labuza (1984), se graficó $\ln-k$ en segundos⁻¹ contra el inverso de la temperatura absoluta. Obteniéndose una línea recta cuya ecuación es:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad \text{Ecuación 9}$$

A partir de la pendiente de la recta se obtuvo la energía de activación.

En el campo de la ciencia de los alimentos, otro parámetro útil a la hora de hablar de deterioro es Q_{10} , siendo el coeficiente de velocidad de deterioro de un alimento al sufrir un aumento de 10 °C en su temperatura de almacenamiento. Estableciendo Q_{10} en relación a la ecuación de Arrhenius se tiene:

$$Q_{10} = e^{\left(\frac{10 \cdot E_A}{R \cdot T \cdot (T+10)} \right)} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde T es la temperatura absoluta [°K].

Es así que, conociendo los tiempos de inducción en ensayos acelerados (temperaturas altas) es posible calcular un tiempo estimado de vida útil a temperaturas inferiores. Para lo cual se despeja la ecuación (Espinoza, 2017)

$$t_{ve(T_1)} = t_{i(T_2)} \cdot Q_{10}^{\left(\frac{T_2 - T_1}{10} \right)} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde t_{ve} es el tiempo de vida útil esperado a temperatura T_1 , t_i es el tiempo de inducción a temperatura T_2 y Q_{10} es el factor calculado a partir de las ecuaciones antes mencionadas.

3.3.5. Calidad proteica: Evaluación del perfil aminoacídico

Dado que las harinas que se emplean habitualmente para la elaboración de productos libres de gluten presentan bajo contenido proteico, cuando se quiere introducir un nuevo ingrediente, es importante evaluar no sólo la cantidad, sino que también la calidad de sus proteínas. La calidad proteica de HN fue determinada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa. Para la cuantificación de aminoácidos se procedió de acuerdo a la metodología planteada por Alaiz et al. (1992) y modificada por Cian et al. (2015). Se pesaron 25 mg de HN y en tubos de ensayo con tapa. Se agregaron 200 μ L de ácido D,L- α -aminobutírico, como patrón interno, sumado a 4 mL de HCl 6N. A continuación se insufló N₂ y se taparon los tubos. La mezcla se sonicó por 10 min y se mantuvo a 107 °C por 24 horas en estufa. Transcurrido ese tiempo, se neutralizó con NaOH 8N y se llevó a 25mL con buffer borato de sodio (1N pH9 con 0,02 % de azida de sodio). Para la derivatización, se tomaron alícuotas de 4,5 mL a las que se agregaron 4,2 μ L de etoximetilenmalonato de dietilo (EMMDE) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) y se incubaron a 50 °C por 60 minutos. Finalmente, las muestras se filtraron (0,45 nm de NYLON) directo a viales ámbar.

Para la determinación de triptófano se empleó una hidrólisis alcalina propuesta por Yust y colaboradores (2004). Se pesaron 25 mg de la harina de nuez y se agregaron 4 mL de NaOH 4 N. A continuación se insufló N₂ y se taparon los tubos. Inmediatamente se incubaron a 107 °C por 4 horas. Luego de lo cual, las muestras fueron neutralizadas con HCl 6N y llevadas a 25 mL con el buffer borato de sodio para luego ser filtradas (0,45 nm de NYLON).

Para las curvas de calibración se utilizaron patrones de aminoácidos individuales (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). En general, se ensayaron niveles de concentración entre 50 y 4000 pmol por 20 µL con la excepción de la cisteína y el triptófano donde se emplearon concentraciones más bajas.

Para la cromatografía se utilizó un equipo Waters 1525 (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) con detector de longitud de onda variable VW, equipado con una columna de fase reversa Symmetry C18 column (150 mm × 4.6 mm ID, 5 µm) a 25 °C. Para la elución se manejó un flujo de 0,9 mL/min con una combinación de: buffer acetato de sodio (25 mM) con azida de sodio 0,02 % pH 6,0 (A) y acetonitrilo (B). El gradiente binario de las fases móviles se detalla en la Tabla 2. Los aminoácidos eluidos fueron detectados a 280 nm.

Tabla 2. Gradiente de elución de buffer acetato de sodio (A) y acetonitrilo (B)

Tiempo [min]	Gradiente lineal (A:B)
0-3	(91:9) a (86:14)
3-13	(86:14)
13-30	(86:14) a (69:31)
30-35	(69:31)

Finalmente, la calidad proteica se evaluó mediante la puntuación química de aminoácidos (PQAA), calculada como en la Ecuación 12. Se adoptaron los valores de los niños en edad preescolar como patrón de puntuación para todas las edades (WHO/FAO, 2007). La puntuación de aminoácidos más baja indica el aminoácido limitante para dicha proteína.

$$PQAA = \frac{[\text{mg de aminoácidos esenciales (AAE)}/\text{g de proteína}]}{[\text{mg de AAE}/\text{g de patrón de proteína requerido por la FAO}]} \quad \text{Ecuación 12}$$

3.3.6. Propiedades fisicoquímicas de harina de nuez

3.3.6.1. Determinación de color instrumental

La apariencia de los ingredientes afecta la percepción del consumidor hacia los alimentos, de ahí la importancia de medir el color instrumental de la harina de nuez. Generalmente, el color instrumental se expresa mediante coordenadas de color en el espacio. La *CIE* (International Commission on Illumination, en inglés) desarrolló el espacio de color por coordenadas triestímulo XYZ (*CIE* 1931 XYZ) y el espacio de color $L^* a^* b^*$ (*CIE* 1976 $L^* a^* b^*$) (Stinco et al., 2012). En la Figura 11 se representan estos espacios de color. Ambos forman sólidos tridimensionales y cualquier color se representa con un punto concreto. El espacio triestímulo *CIE* XYZ está formado por los ejes (X, Y y Z) a partir de 3 colores primarios imaginarios. Por otro lado, en el espacio *CIE* $L^* a^* b^*$ el eje de luminosidad (L^*) toma valores en el rango de 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que a^* toma valores positivos para el rojo y negativos para el verde, y b^* toma valores positivos para el amarillo y negativos para el azul. A partir de estos parámetros es posible calcular la tonalidad de color (Ecuación 13) y el croma o saturación (Ecuación 14). Estos dos parámetros junto con la luminosidad son los que corresponden a la percepción visual de los colores (Negueruela, 2012).

$$h^{\circ}_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \text{ cuando } a^* \text{ y } b^* > 0 \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde h°_{ab} es la tonalidad y a^* y b^* son las coordenadas de *CIE* $L^* a^* b^*$.

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde C^*_{ab} es el croma y a^* y b^* son las coordenadas de *CIE* $L^* a^* b^*$.

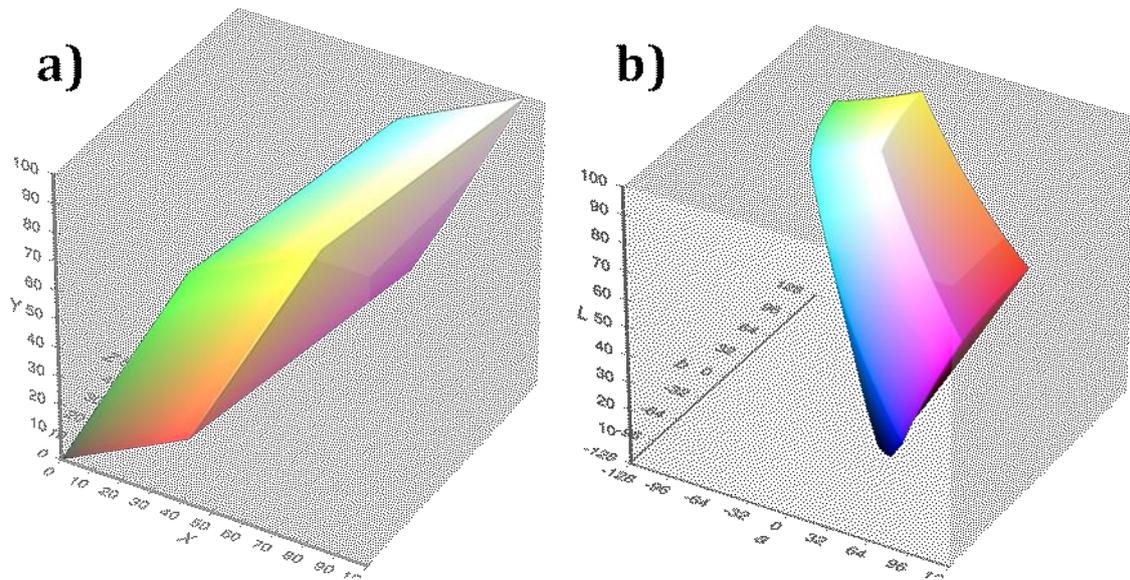


Figura 11. Representación de gamas de color en distintos espacios. A) CIE XYZ y B) CIE L* a *b*. Fuente: (Horvath y Lipka, 2017)

Para medir el color se pesaron 3 g de HN en una caja de Petri y se utilizó un colorímetro triestímulo Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Inc., Japón), con su respectivo cristal del tubo de proyección de luz y previa calibración con el patrón blanco provisto por el fabricante ($Y = 93,2$; $x = 0,3133$, $y = 0,3192$). Se realizaron 20 mediciones individuales y se utilizó el espacio de color CIE L*, a^* , b^* con iluminación C.

3.3.6.2. Actividad acuosa de la harina de nuez

Las mediciones actividad acuosa, a_w , se realizaron a 25 °C en un equipo AquaLab (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EE.UU.). El ensayo se realizó por triplicado.

3.3.6.3. Parámetros físicos de retención

El estudio de la capacidad de interacción de un nuevo ingrediente con el agua o el aceite presentan relevancia ya que brinda una idea de cuál podría ser el

comportamiento de dicho ingrediente al ser introducido en un alimento. Con esta finalidad se evaluaron la capacidad de retención de agua (CRA), la capacidad de absorción de aceite (CAA) y la capacidad de retención de moléculas orgánicas (CAMO) de la harina de nuez.

3.3.6.3.1. *Capacidad de retención de agua*

Una de las propiedades más importantes desde el punto de vista tecnológico es la capacidad de retener el agua (CRA). Esta se determinó según Abugoch et al. (2009) con pequeñas modificaciones. En un tubo de centrifuga, se agregaron HN y agua destilada (1:10). La mezcla se agitó en vortex e inmediatamente se mantuvo en reposo por 20 minutos a 20 °C. Luego, la mezcla se centrifugó a 2000×g durante 20 minutos. Se pesó el pellet (m_2) y se calculó el CRA según la Ecuación 15.

$$CRA = \frac{m_2 - (m_1 - m_3)}{m_1 * \rho} \quad \text{Ecuación 15}$$

Dónde: m_1 es la masa de HN [g], ρ es la densidad del agua [g/mL] y m_3 es la cantidad de proteína soluble [g] determinada usando ensayo Bradford (Bradford, 1976).

3.3.6.3.2. *Capacidad de absorción de aceite*

Otros ingredientes ampliamente usados en la industria alimentaria, son las materias grasas. Con la finalidad de evaluar la capacidad de absorción de aceite (CAA) de la harina de nuez, en un tubo de centrífuga, se mezcló HN con aceite de girasol (1:10). Esta mezcla se agitó con un vortex y se la mantuvo en agitación constante a 750 rpm a 25 °C durante 30 minutos (Thermo Mix DLAB: HM100-Pro, China). A continuación, se centrifugó la mezcla a 3000×g durante 10 minutos y, por último, se pesó el pellet. La CAA se expresó en gramos de aceite por gramo de HN.

3.3.6.3.3. Capacidad de absorción de moléculas orgánicas

Este parámetro se relaciona con la habilidad que poseen fracciones de fibra dietaria para ligar ácidos biliares, sustancias carcinogénicas y mutagénicas (Mora et al., 2013). Para determinar la capacidad de absorción de moléculas orgánicas (CAMO) de la harina de nuez, se procedió como en el ensayo anterior (CAA) pero la muestra se dejó reposar durante 24 horas a 20 °C antes de ser centrifugada. La CAMO se expresa en gramos de aceite por gramo de HN.

3.3.6.4. Distribución del tamaño de partícula de la harina de nuez

La determinación por difracción láser permite obtener las distribuciones de tamaño de partículas (Figura 12). Para esto, un láser atraviesa la muestra suspendida en un medio líquido (dispersión) y se miden las variaciones de la intensidad y del ángulo de la luz dispersada. La luz se dispersa más intensamente y en ángulos más pequeños en las partículas más grandes que en las pequeñas.

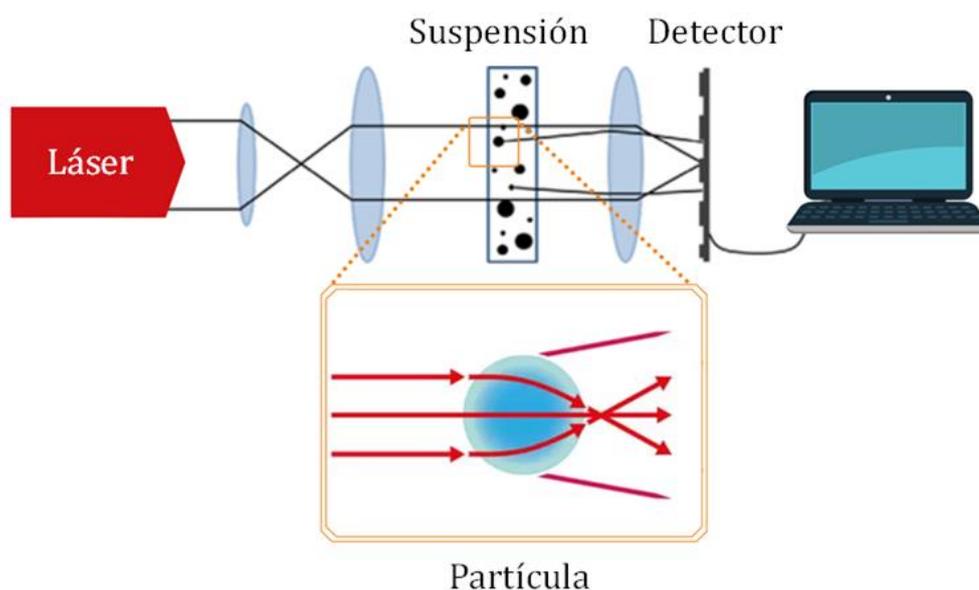


Figura 12. Esquema de funcionamiento de un difractómetro láser. Adaptado de Arp(2019) y McClements (2001)

La luz difractada es la que cambia de ángulo al impactar con los bordes de la partícula y la refractada cambia de ángulo al atravesar la partícula. Ambas son

útiles para determinar los tamaños y distribuciones de las muestras analizadas. La luz absorbida y reflejada se debe considerar para reducir al mínimo una posible interferencia en la medición (Horiba Scientific, 2018; McClements, 2001; Rodriguez y Kajiyama, 2020).

Se utilizó un equipo Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) equipado con el accesorio Hydro 2000 MU (velocidad de la bomba: 2000 rpm) para evaluar la distribución del tamaño de partículas presentes en la harina de nuez. La muestra se suspendió en agua destilada [100 mL/L H₂O] y se aplicó un tratamiento ultrasónico (desplazamiento ultrasónico 10 µm durante 10 s) para favorecer su dispersión. El tamaño de partícula se estimó en términos de D(0,5) o percentil 50 que indica el tamaño en el cual el 50 % de la población de las partículas presentan un tamaño mayor a este valor y el otro 50 % de la población presentan tamaños inferiores. El valor de D(0,5) se obtuvo a partir de la distribución ponderada en superficie utilizando el software Mastersizer 2000E (v5.54). El ensayo se realizó por duplicado.

3.3.7. Microestructura de harina de nuez

3.3.7.1. Microscopía láser confocal de barrido (CSLM)

En la Figura 13 se muestra el funcionamiento básico de un microscopio confocal. La microscopía láser confocal de barrido o CSLM por sus siglas en inglés (Confocal laser scanning microscopy) es una técnica de análisis óptico útil para el análisis de muestras complejas. Una fuente de luz de alta intensidad (láser) ilumina una región puntual de la muestra y el detector recibe la radiación de dicha región. Las micrografías se construyen por el barrido sincronizado de la fuente y el detector, es decir, se producen punto a punto en el plano de la micrografía a partir

de los correspondientes puntos de iluminación del plano de la muestra. Asimismo, la presencia de diafragmas o pinholes filtran la luz fuera de foco, lo que contribuye a la nitidez de la imagen (Claxton, Fellers y Davidson, 2006).

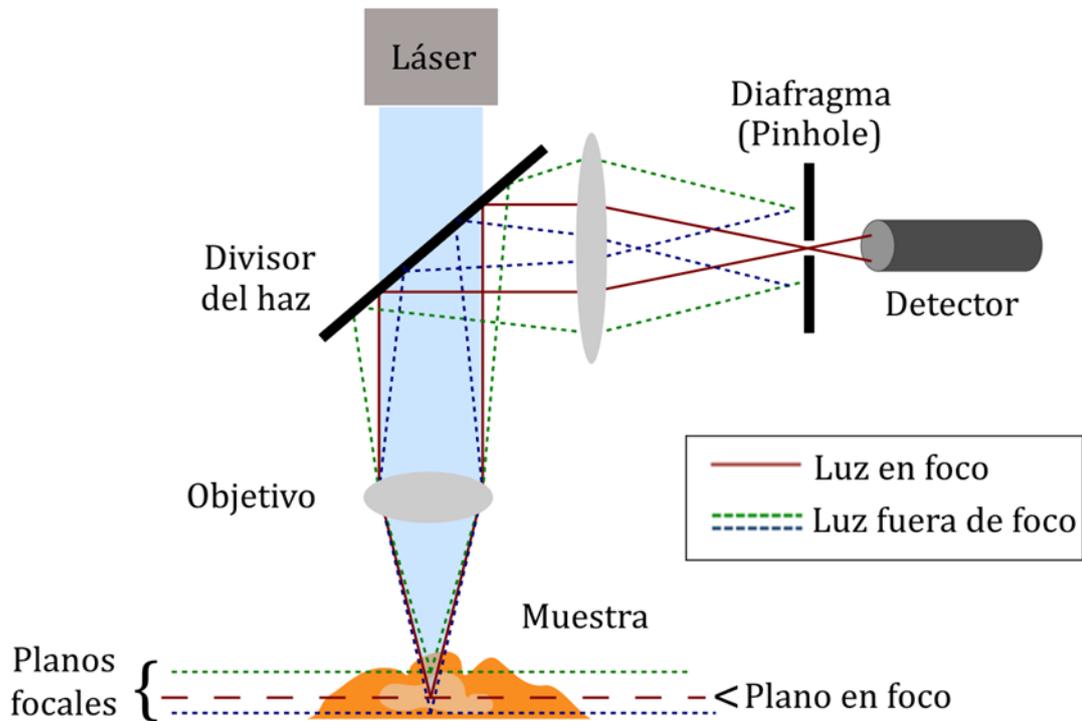


Figura 13. Esquema del funcionamiento básico de un microscopio confocal. Adaptada de (STTI, 2011)

La tinción por fluorescencia es la característica más importante de las microscopias confocal de barrido y de campo amplio. Todos los colorantes de fluorescencia tienen una afinidad específica para teñir y visualizar diferentes sustancias como proteínas, lípidos o paredes celulares. Se pueden detectar así, partes, regiones y estructuras específicas de las muestras (Faltermaier et al., 2015). Además, cada colorante de fluorescencia tiene un determinado espectro de excitación y emisión. Los microscopios de campo amplio recogen la luz emitida de múltiples planos focales (enfocados y fuera de foco). El diafragma de los microscopios confocales bloquea la captación de la mayoría de luz fuera de foco y

permite la detección de un único plano, lo que mejora la calidad de la imagen. Esta diferencia en la ruta de luz se observa en la Figura 14.

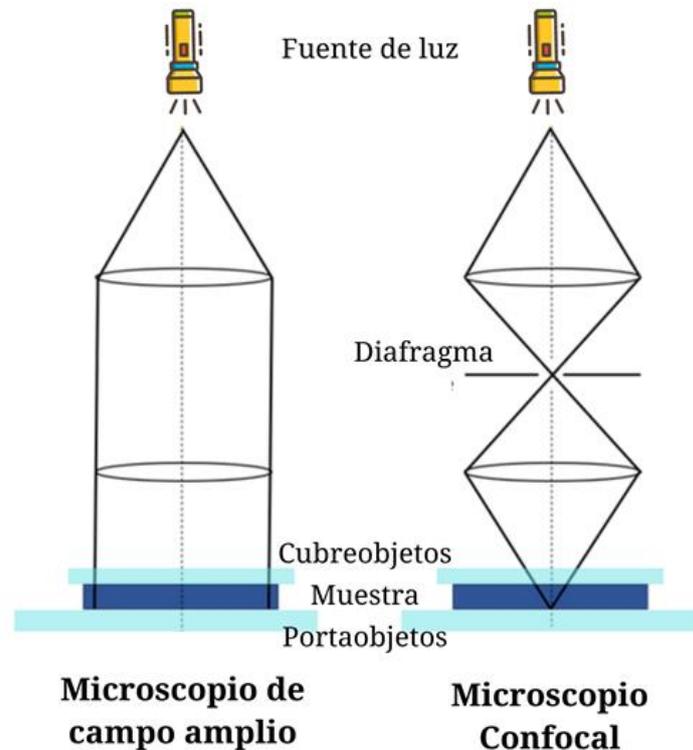


Figura 14. Diferencia de las rutas de la luz en microscopía de campo amplio y en confocal. Adaptada de Proteintech (sin fecha)

Para la observación por CSLM se realizó una tinción no covalente de las muestras. Se emplearon los siguientes cuatro fluoróforos: rodamina B [10 mg/L], calcoflúor white [0,1 g/L], isotiocianato de fluoresceína (FITC) [0,1 g/L] y rojo Nilo (NR) [1 g/L]. El FITC y el NR no se utilizaron juntos. Se colocó una pequeña porción de harina de nuez sobre un portaobjetos de vidrio y luego se añadió una solución que contenía una mezcla de los fluoróforos. Las muestras se dejaron reposar durante una hora en la oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. A continuación, se observó con un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón) utilizando las longitudes de onda de excitación 488 nm, 568 nm y 347 nm, y las de emisión

518 nm, 625 nm y 450 nm para (FITC y NR), rodamina B y calcoflúor white, respectivamente (Burbano, Cabezas y Correa, 2022). Las micrografías se tomaron a 20x y se comprobó que las muestras sin tinción no mostraran autofluorescencia.

3.3.7.2. Microscopia electrónica de barrido

En la microscopia electrónica de barrido (SEM: Scanning electron microscopy), se emplea un haz de electrones, en lugar de un haz de luz, (Figura 15) para producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra y se utilizan las interacciones electrón-materia para formar la imagen del objeto observado. La generación del haz de electrones se realiza a través de una fuente como un filamento de tungsteno, hexaboruro de lantano o un emisor de efecto de campo. Al calentarse el filamento de tungsteno, aumenta la energía de los átomos y cuando se produce la suficiente energía los electrones escapan de sus átomos para luego ser dirigidos hacia la muestra por los lentes con condensador electromagnéticos. Para generar el barrido o escaneo las bobinas de desviación dirigen el haz de electrones en su recorrido sobre la superficie de la muestra. Finalmente, cuando el haz impacta con la muestra se producen principalmente dos tipos de electrones: los electrones secundarios y los electrodispersados. Los secundarios son de baja energía y proporcionan una valiosa información topográfica de la muestra. Por otro lado, los electrones retrodispersados se ven influenciados por el número atómico de la muestra. Por esta razón, se utilizan para obtener un mapa con información sobre la composición superficial de la muestra (Goldstein, 2003; Stokes y Royal Microscopical Society, 2008).

Las muestras para ser observadas por microscopia electrónica pueden necesitar, en algunos casos, una preparación especial. En ella, se busca aumentar la

conductividad eléctrica y estabilidad, para que puedan soportar las condiciones de alto vacío (SEM) y el haz de electrones. La observación por microscopía electrónica se puede realizar en distintos modos: alto vacío (SEM), bajo vacío (LVSEM por low vacuum) y ambiental (ESEM por environmental). En este último, la cámara se evacua de aire, pero el vapor de agua se retiene cerca de su presión de saturación y la presión residual permanece relativamente alta, lo que permite el análisis de las muestras sin una preparación especial previa.

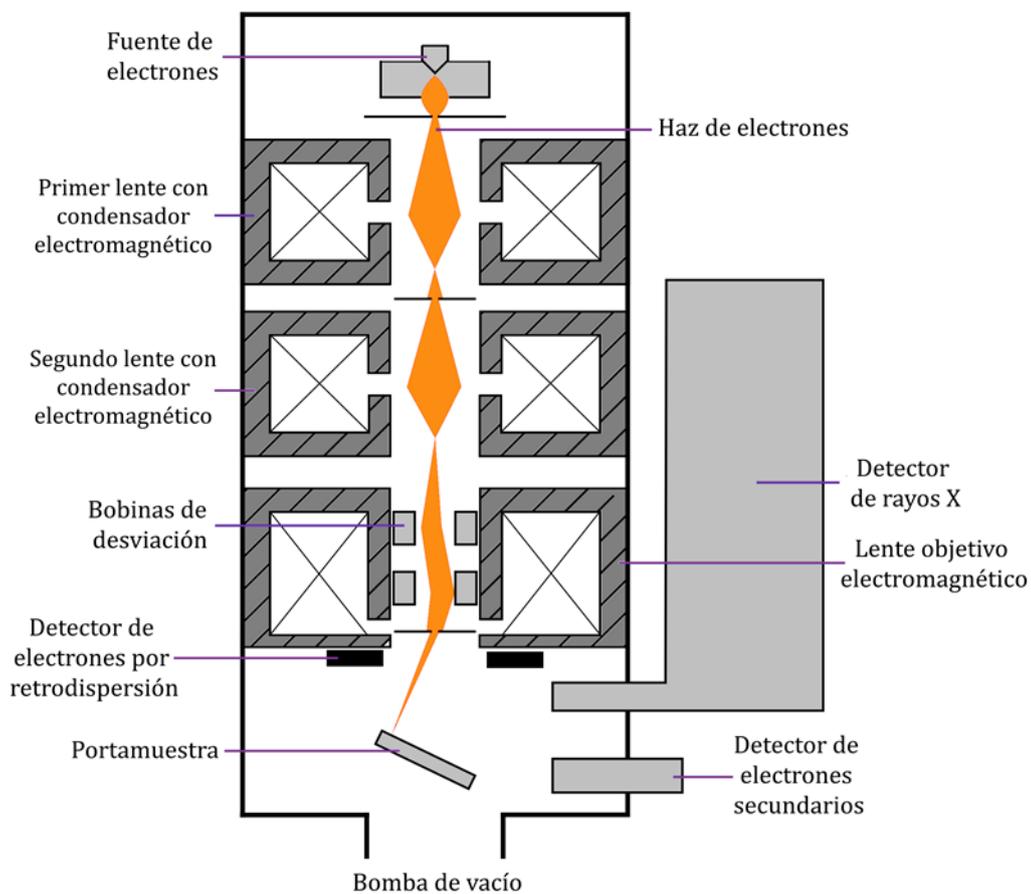


Figura 15. Esquema de un microscopio electrónico de barrido. Adaptada de Steff (2016)

La harina de nuez y harina de nuez desgrasada (HN y HND, respectivamente) se observaron con un microscopio FEI Quanta 200. La HN se observó en el modo ambiental (ESEM) (399,97 Pa y 10 °C), y la HND en el modo de bajo vacío (LVSEM)

a 130 Pa. Se tomaron micrografías de campos seleccionados al azar a 1000x, 2000x y 4000x de aumento. Las micrografías fueron adquiridas en el Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFi-LIMF) de la Facultad de Ingeniería, UNLP, Argentina.

3.3.8. Ensayo de almacenamiento de la harina de nuez

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas susceptibles a sufrir procesos de deterioro durante el procesamiento, almacenamiento y/o manipulación de los alimentos. Estos procesos pueden dar origen a distintos compuestos indeseables que pueden afectar físicoquímica, nutricional y sensorialmente a los alimentos. Dentro de estos, los lípidos insaturados, es decir que poseen uno o más dobles enlaces en su composición, son altamente susceptibles a oxidarse (Pignitter y Somoza, 2012).

La oxidación de los lípidos es autocatalítica una vez iniciada, la reacción es autopropagable y se autoacelerada (Schaich, 2005). Este proceso puede ocurrir mediante tres mecanismos principales: auto-oxidación no enzimática dada por radicales libres (reacción entre el oxígeno atmosférico y los lípidos), fotooxidación no enzimática y oxidación enzimática (Laguerre, Lecomte y Villeneuve, 2007). En este caso nos enfocaremos en la autooxidación, esta se divide en tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

Un esquema de la cinética de acumulación de productos de oxidación de lípidos insaturados se muestra en la Figura 16, donde se observan las tres etapas. Es así que, en la iniciación el radical lipídico se forma a partir de una molécula de lípido, generalmente por el ataque de radicales, luz, calor, radiaciones o trazas de metales. Este radical lipídico reacciona con oxígeno para dar lugar a un radical

peroxilo, el cual puede atacar a otra molécula de lípido y sustraer un átomo de hidrogeno para formar un hidroperóxido y un nuevo radical lipídico, propiciando que más lípidos se oxiden hasta hidroperóxidos. Este ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, donde los radicales libres e hidroperóxidos son finalmente descompuestos para generar moléculas estables, volátiles y no volátiles, tales como aldehídos, cetonas, ácidos y un sin número de compuestos nitrogenados y sulfurados que alteran el olor y sabor de los alimentos (Frankel, 2005; Rojano, 1997).

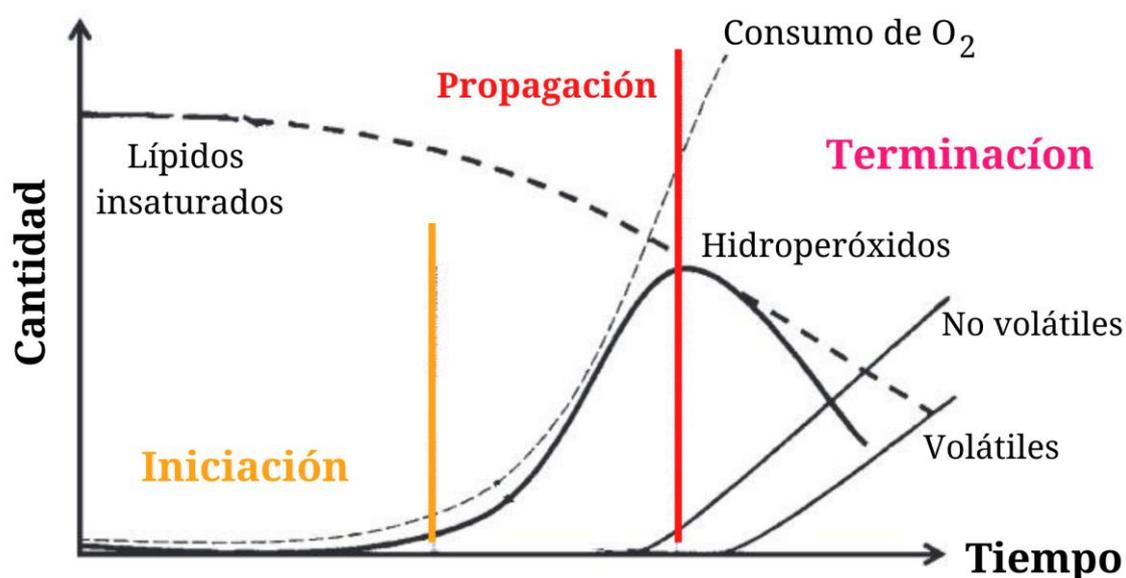


Figura 16. Esquema de la cinética de acumulación de productos de oxidación de un lípido insaturado. Adaptado de Pignitter y Somoza (2012)

Al ser la harina de nuez un subproducto con 55 % de lípidos (base seca) es necesario analizar su estabilidad durante el almacenamiento. Para este análisis, durante el almacenamiento, se midieron distintos parámetros fisicoquímicos característicos de HN: color instrumental, porcentaje de humedad, a_w , perfil de ácidos grasos, índices de peróxidos, iodo y p-anisidina.

Se almacenaron 12 g de HN en bolsas para vacío de Poliamida (Nylon) Polietileno PA/PE (15×25 cm y 90 micrones). Las bolsas fueron selladas al ambiente y al vacío (Figura 17) y se almacenaron a 20, 0 y -20 °C protegidas de la luz directa. La HN fue analizada cada dos meses y el ensayo transcurrió por diez meses. Es importante agregar que, el ensayo sólo llegó a los diez meses, debido a un incendio en el sótano donde se encontraban las cámaras de almacenamiento, hizo que se perdieran los demás puntos experimentales. En la Tabla 3 se muestran las condiciones de almacenamiento de las bolsas con harina de nuez. Una limitación experimental fue la humedad relativa de las cámaras de almacenamiento debido a que solamente fue posible registrarla.



Figura 17. Fotografía de la harina de nuez en la bolsa sellada al vacío para el ensayo de almacenamiento

Tabla 3. Condiciones experimentales del almacenamiento

Tratamiento	Temperatura [°C] ; Humedad Relativa [%]
NV20 _t	20,4 ±0,4 ; 57 ±3
V20 _t	
NV0 _t	0,6 ±1,7 ; 92 ±6
V0 _t	
NV-20 _t	-18 ±2 ; 76 ±10
V-20 _t	

t: mes del muestreo. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas al vacío

3.3.8.1. Parámetros fisicoquímicos

La determinación del color instrumental (3.3.6.1), el porcentaje de humedad (3.3.2.1), la *aw* (3.3.6.2) y el perfil de ácidos grasos (3.3.5) se realizó de la misma manera que para la harina de nuez fresca.

Por otro lado, la cuantificación de peróxidos se realizó directamente con la HN y el índice de iodo se calculó a partir del perfil de ácidos grasos. Mientras que, para determinar el índice de p-anisidina se realizó una extracción del aceite remanente en HN por el método de Folch (1957) que utiliza una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) como solvente. Para evaporar la mezcla de solventes y recuperar el aceite se usó un rotavapor Büchi R-124, (Büchi Labortechnik AG, Suiza) a 40 °C y 200 Torr de presión.

3.3.8.2. Índice de peróxidos

Los peróxidos son compuestos primarios de oxidación lipídica que se forman durante el almacenamiento. Para su determinación se utilizó el método del hierro-tiocianato descrito por la International Dairy Federation (IDF 74- ISO 2006), con algunas modificaciones (Jensen et al., 2011). La cuantificación de peróxidos por este método se basa en la capacidad de los peróxidos para oxidar el ion ferroso (Fe (II)) a ion férrico (Fe (III)). Posteriormente, se forma un complejo coloreado entre

el tiocianato y el Fe (III). Se prepararon tres soluciones. La solución 1 se preparó mezclando 0,4 g de BaCl₂ en 50 mL de agua con 0,5 g de FeSO₄·7H₂O en 50 ml de agua, y a continuación se filtró. Al filtrado se le añadieron 2 mL de HCl (10 M). La solución 2 se preparó añadiendo 3 g de tiocianato de amonio en 10 mL de agua. La solución 3 fue una mezcla de cloroformo: metanol (1:1, v/v). Se preparó una solución final de hierro (II)/tiocianato mezclando las soluciones 1, 2 y 3 en la proporción 1:1:98, v/v. Se disolvió 1 g de HN en 2,5 mL de CaCl₂ al 2,5 %, más 5 mL de la solución 3. A continuación, el extracto se agitó durante 60 s y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos usando una centrifuga Rolco CM 2036 Duron (Rolco Srl, Argentina). De la fase inferior se transfirió 1 mL a un tubo de Eppendorf y se mezcló con 0,2 mL de solución de hierro (II)/tiocianato. Después de 5 min exactos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Se utilizó como blanco puro la solución 3. Finalmente, para comprobar interferencias se midió la absorbancia de la solución 3 y la muestra pero sin tiocianato, y también de la solución final de hierro (II)/tiocianato pero sin muestra. Para la curva de calibración se utilizó una solución de FeCl₃ (10 mg/mL) como estándar. Se pesaron 0,1 g de Fe⁰ al cual se le agregaron 10 mL de HCl (10 M) y 0,4 mL de H₂O₂ (30 % p/v) para oxidar al hierro. El exceso de peróxido de hidrógeno se eliminó por calentamiento hasta ebullición por 10 min. Una vez que la mezcla se enfrió se llevó a volumen final de 100 mL en matraz con agua destilada. Finalmente, se tomó 1 mL de la solución obtenida (1000 µg/mL) y se llevó a un volumen final de 100 mL con la solución 3. El índice de peróxidos (IP) se expresó como mili equivalente de oxígeno por kg de harina de nuez [mequi O₂/kg de HN], de acuerdo a la concentración de Fe (III) calculada a partir de la curva de calibración.

3.3.8.3. Índice de Iodo

El índice de iodo es un valor que está relacionado con el grado de insaturación total de las muestras lipídicas. Existen diversos métodos para su determinación, normalmente se lo realiza por el método de Wijs (AOAC Método 993,20). Sin embargo, aprovechando que se determinó el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa durante el almacenamiento. Se optó por calcular el índice de iodo (II) usando la siguiente fórmula (Martínez y Maestri, 2008):

$$II = (\% AO \times 0,899) + (\% AL \times 1,814) + (\% ALN \times 2,737) \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde AO es ácido oleico, AL es ácido linoléico y ALN es ácido linolénico. Los distintos porcentajes de ácidos grasos están en base a ácidos grasos totales.

3.3.8.4. Índice de p-anisidina

Durante almacenamientos prolongados se producen compuestos secundarios de oxidación a partir de los hidroperóxidos de los ácidos grasos. El índice de p-anisidina es una buena alternativa para su determinación, en especial para aceites de origen vegetal. Este método cuantifica la cantidad de aldehídos alfa y beta insaturados en grasas y aceites por reacción en solución de ácido acético de los aldehídos con la p-anisidina y la posterior medición espectrofotométricamente a 350 nm (AOCS, 2017; Chapman et al., 1996).

Se procedió según el método oficial Cd 18-90 de la AOCS, para lo cual se preparó una solución de p-anisidina pesando 0,1275 g y se agregaron 50 mL de ácido acético en un vaso cubierto con agitación durante 15 minutos. En cuanto a la muestra, se pesó 1 g de aceite extraído (por Folch) de la harina de nuez y se agregaron 25 mL de hexano en matraz cubierto con aluminio. Se tomaron dos

alícuotas de 5 mL en tubos hach. A la primera se añadió 1 mL de la solución de p-anisidina, a continuación, se agitaron los tubos en vortex y se dejó reaccionar por 10 minutos antes de medir la absorbancia a 350 nm. Y a la segunda se le midió la absorbancia sin agregar la p-anisidina. Para descartar interferencias se usaron dos blancos uno de hexano puro y otro de hexano y p-anisidina pero sin muestra. Se determinó el índice de p-anisidina (IA) a partir de la siguiente fórmula

$$IA = \frac{25(1,2 Abs_a - Abs_b)}{m} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde el Abs_a es la absorbancia del aceite de harina de nuez y Abs_b es la absorbancia de la solución del aceite sin p-anisidina y m es la masa del aceite.

3.3.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza entre los distintos tratamientos experimentales y/o muestras y la prueba LSD para determinar la existencia de medias estadísticamente diferentes (α : 0,05). Todas las pruebas se realizaron con el programa Statgraphics - Centurion - XVII Versión-17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc, EE.UU.).

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Composición proximal

En la Tabla 4 se muestra la composición proximal de la harina de nuez (HN). HN presentó bajo contenido de humedad ($4,5 \pm 0,2$ %). El orden de los componentes de la HN en base seca fue: lípidos > proteínas > contenido en fibra dietaria total > hidratos de carbono disponibles y cenizas. Los hidratos de carbono disponibles están compuestos principalmente por glucosa (0,63 %), fructosa (0,52 %), sacarosa (6,09 %) y almidón (0,36 %). El contenido calórico aportado por 100 g de HN es de 649 Kcal, lo que demuestra que HN es de alta densidad energética debido principalmente a su alto contenido en aceite. A pesar de que la composición proximal de la torta de prensado depende de diferentes variables como el genotipo, el año de cultivo y el método de extracción del aceite, se ha informado de una composición comparable de la HN (Labuckas, Maestri y Lamarque, 2014).

Tabla 4. Composición proximal de la harina de nuez (HN)

	Composición proximal [%]					CC
	Lípidos	Proteínas	FDT	Cenizas	Carb.	
HN	55,7±0,5	24,6±0,1	9,4±0,2	2,7±0,1	7,6±0,6	649

Promedio \pm desvío estándar. Carb.: carbohidratos calculados por diferencia, CC: contenido calórico [kcal/100 g solidos], FDT: fibra dietaria total

3.4.2. Composición mineral

Los minerales se clasifican según las cantidades que requiere el organismo como macroelementos o microelementos. Los macroelementos incluyen el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio, el cloruro y el azufre, mientras que el yodo, el zinc, el selenio, el hierro, el manganeso, el cobre, el cobalto, el molibdeno, el flúor, el cromo

y el boro se catalogan como microelementos. La Tabla 5 recoge la composición mineral de la harina de nuez y, a efectos de comparación, los contenidos minerales de harinas de trigo duro y arroz. Además como referencia la ingesta recomendada de nutrientes (IRN) para hombres y mujeres (19-65 años) (OMS y FAO, 2004) y el porcentaje de IRN que aportan 100 gramos de HN.

Tabla 5 Composición mineral de harina de nuez (HN)

Elementos [mg/kg] de HN*	Harina de trigo duro** [mg/kg]	Harina de arroz *** [mg/kg]	Ingesta recomendada de nutrientes (IRN)†	Porcentaje de IRN en 100 g de HN*
Macroelementos				
Ca	1524 ± 43	159,5	73	1000 mg 15,2 %
K	7276 ± 257	826,2	590-1310	4700 mg 15,5 %
Mg	2318 ± 43	301,2	190-353	260 mg 89,2 %
Na	619 ± 79	46	170-410	2400 mg 2,6 %
Microelementos				
P	5157 ± 97	3498		700 mg 73,7 %
Cu	22 ± 1	1,4	2,1-2,2	900 µg 243 %
Fe	89 ± 8	13,2	4,9-10,3	14 mg 63,5 %
Mn	49 ± 0	5,2	5,9-6,8	2.3 mg 212,1 %
Mo	≤ld	-	-	45 µg -
Se	≤ld	-	-	34 µg -
Zn	38 ± 1	30,8	11,1-14,8	7 mg 54,7 %

Promedio ± desvió estándar. HN: harina de nuez. * base seca; ** (Ragae, Abdel-Aal y Noaman, 2006). *** (Rybicka y Gliszczyńska-Świgło, 2017). † (WHO y FAO, 2004). ld: límite de detección. Límites de detección para Mo (0.021 mg/L) y para Se (0.008 mg/L)

De los minerales analizados, el calcio y el fósforo son los principales componentes de los huesos y dientes. El contenido de calcio de la HN fue varias veces superior a los valores presentes en harinas de diferentes fuentes botánicas. El contenido de Ca en HN fue 2,1, 2,3, 3, 4,4, 26,2 y 55,8 veces superior a los valores presentados por harinas de cebada, trigo, mijo, centeno, arroz y sorgo, respectivamente. Asimismo, el contenido de fósforo también fue mayor en la HN que en estas harinas (Ragae, Abdel-Aal y Noaman, 2006; Rybicka y Gliszczyńska-

Świgło, 2017). Sin embargo, el porcentaje de IRN de Ca cubierto por una porción de 100 g de HN es bajo (15,2 %). El bajo contenido de Ca en los alimentos es habitual, por lo que el IRN es difícil de alcanzar en ausencia de productos lácteos. El fósforo constituye alrededor del 1 % del peso corporal y además de formar tejidos, es fundamental para muchos procesos biológicos como el almacenamiento de energía (ATP) o la codificación de información (ADN y ARN), entre otros (Gutiérrez, 2020). En el caso de este mineral, HN cubriría el 73,7 % del IRN. Afortunadamente el P se encuentra en gran cantidad de alimentos y sus deficiencias son raras.

En cuanto a los demás macroelementos, HN cubre el 89,2 % del IRN de magnesio, casi el 15,5 % del IRN de potasio y el 2,6 % del IRN de sodio. Debido a su bajo contenido en Na, HN podría utilizarse para el desarrollo de productos reducidos en sal.

Además, en HN los valores de hierro, manganeso, cobre y zinc son mayores que en las harinas más populares utilizadas para la fabricación de pan. La cantidad de Mn y Cu en 100 g de HN es más del doble de la IRN, mientras que, en el caso del Fe y el Zn, cubriría el 63,5 % y el 54,7 % de la IRN, respectivamente. La ingesta de Fe es especialmente preocupante por su relación con la anemia. El Fe es esencial en la síntesis de hemoglobina y por lo tanto en la adquisición, distribución, almacenamiento y utilización del oxígeno (Aggett, 2020). Mientras que el zinc es importante porque forma parte de la insulina, de numerosas enzimas, y está relacionado con la síntesis del ADN y varias proteínas (Gupta y Gupta, 2014).

Las harinas refinadas, comúnmente utilizadas en panificación, tienen un bajo nivel de minerales porque la mayoría de ellos se eliminan junto con el salvado

durante la molienda. Por lo tanto, el uso de HN podría ser una buena estrategia para mejorar el valor nutricional de los productos de panadería con y sin gluten.

3.4.3. Actividad antioxidante

La torta de prensado, resultante de la obtención de aceite de nuez, es rica en la piel marrón que recubre los frutos secos y que es importante para proteger los ácidos grasos de la oxidación. Esta acción está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos (Salcedo, López de Mishima y Nazareno, 2010). El contenido fenólico total encontrado para la HN ($10,9 \pm 0,3$ mg GAE/g HN) es similar a los valores reportados previamente por otros autores (Labuckas et al., 2008; Santos et al., 2018). En cuanto a la composición de los compuestos fenólicos, los taninos hidrolizables y los flavonoides son los principales componentes (Slatnar et al., 2015). La actividad antioxidante se estimó mediante tres métodos complementarios. El método FRAP determina la capacidad de un compuesto para donar un electrón al complejo férrico-tripiridiltriazina. Mientras que los ensayos de ABTS y DPPH combinan los mecanismos de transferencia de electrones y de transferencia de átomos de hidrógeno. La capacidad antioxidante de HN expresada en términos de FeSO_4 y equivalentes trolox fue de 339 ± 2 $\mu\text{mol/g}$ y 232 ± 8 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente. Asimismo, la concentración necesaria para disminuir a la mitad la concentración inicial de DPPH fue de $0,14 \pm 0,006$ mg HN/mL de extracto. Los valores aquí informados son comparables con los encontrados por otros autores en nueces de nogal (Pycia, Kapusta, y Jaworska, 2019; Santos et al., 2018). En la harina de nuez, la actividad antioxidante medida está probablemente relacionada con el contenido fenólico total de la piel marrón que recubre al fruto, ya que la contribución de capacidad antioxidante del aceite de la nuez es

insignificante (Arranz, Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2008). Estos resultados, demuestran que la harina de nuez conserva los compuestos antioxidantes presentes en la nuez, tras el prensado en frío.

3.4.4. Calidad lipídica

3.4.4.1. Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de la harina y del aceite de nuez se muestra en la Figura 18. Los principales ácidos grasos de HN son el ácido linoléico ($18:2\Delta^{9,12}$, $\omega 6$), el ácido oleico ($18:1\Delta^9$, $\omega 9$) y el ácido α -linolénico ($18:2\Delta^{9,12,15}$, $\omega 3$), que juntos representan el 90 % de los lípidos. Este perfil es similar al encontrado en el aceite de nuez, mostrando que la torta de prensado tiene casi la misma proporción de ácidos grasos que la nuez en fruto. Asimismo, en la harina de nuez la relación $\omega 6/\omega 3$ es de 4, el mismo valor que se ha informado para la nuez (Tabla 6). Esta proporción se considera óptima, mientras que un $\omega 6/\omega 3$ elevado se relaciona con enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Tapia et al., 2013).

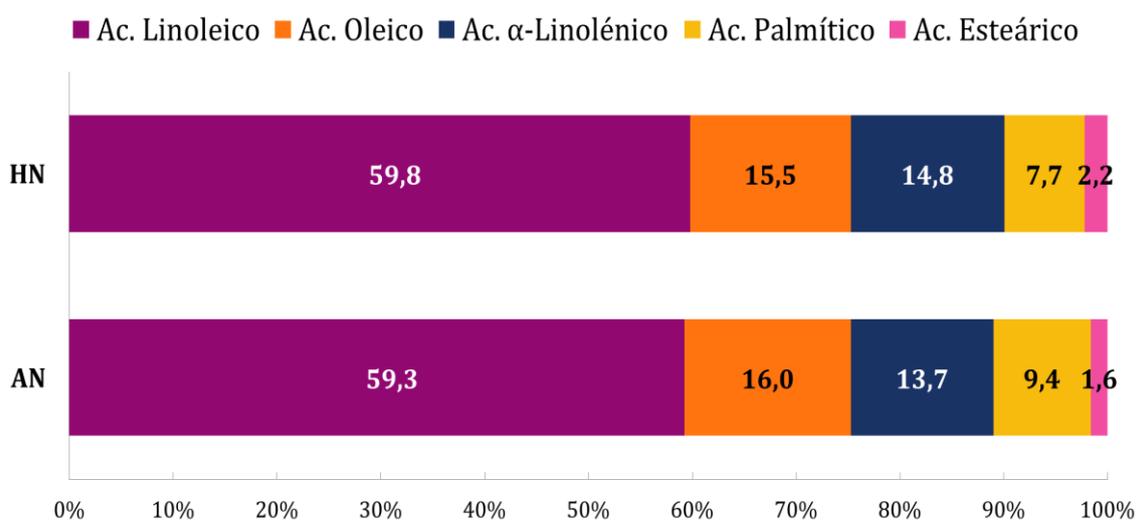


Figura 18. Perfil de ácidos grasos de harina (HN) y aceite (AN) de nuez en porcentaje en base de ácidos grasos totales

En HN la proporción de ácidos grasos insaturados/saturados es de 9 a 1, siendo ligeramente más alta que la del aceite de nuez (Tabla 6), ambos valores son más altos que los previamente reportados para varias muestras de aceite de oliva (Mossoba et al., 2013). Asimismo, esta proporción (9 a 1) guarda concordancia con los valores reportados para varios genotipos de nueces cultivadas en Argentina (Martínez y Maestri, 2008).

Tabla 6. Proporciones provenientes del perfil de ácidos grasos de la harina y del aceite de nuez

	Harina de nuez	Aceite de nuez
Σ SFA [%]	9,93	10,98
Σ MUFA [%]	15,47	16,04
Σ PUFA [%]	74,60	72,98
Proporción: ω 6/ ω 3	4,04	4,32
Proporción: Σ UFA / Σ SFA	9,07	8,11

SFA, UFA, MUFA, PUFA: ácidos grasos saturados, insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

3.4.4.2. Estabilidad oxidativa acelerada por rancimat

El alto contenido de lípidos insaturados presentes en la harina de nuez, hacen pensar que el proceso de oxidación lipídica será el limitante de su vida útil. Los lípidos que sufren degradación oxidativa provocan la pérdida de parámetros de calidad como el sabor, el aroma y el valor nutricional. En la Tabla 7 se muestran los tiempos de inducción de la harina y el aceite de nuez a distintas temperaturas. En ambos casos, como era de esperar, se observa una disminución del tiempo de inducción a medida que se aumenta la temperatura de calentamiento. Si comparamos a igual temperatura, la estabilidad oxidativa [horas] de la HN es significativamente mayor que la del aceite de nuez, en todos los casos (Tabla 7).

Esta situación, probablemente se encuentre relacionada con el alto nivel de antioxidantes presentes en HN y a la protección extra que confieren las estructuras tisulares remanentes. Estos resultados muestran que la harina de nuez, cuando se somete al calentamiento en presencia de una corriente de aire continua, resiste varias horas antes de presentar un estado de oxidación avanzado.

Tabla 7 Estabilidad oxidativa de harina y aceite de nuez

		Harina de nuez	Aceite de nuez
Tiempo de inducción [horas]	100 °C	17,08 ± 0,4 ^b	4,58 ± 0,11 ^a
	110 °C	7,10 ± 0,8 ^b	2,06 ± 0,00 ^a
	115 °C	4,41 ± 0,1	Nd
	120 °C	3,18 ± 0,1 ^b	1,31 ± 0,01 ^a
Energía de activación [kJ/mol]		103,7 ± 3,3 ^b	94,7 ± 2,4 ^a
Q ₁₀		2,28 ± 0,08 ^a	2,18 ± 0,06 ^a
Vida útil a 20 °C [meses]		16,4 ± 1,3 ^b	3,2 ± 0,1 ^a

Promedio ± desvió estándar; nd: no determinado; Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante el horneado, el tiempo de cocción suele ser inferior a una hora, y sólo la corteza se somete a temperaturas superiores a 100 °C, mientras que en la miga, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno son mucho menores que en la corteza. Esto demuestra que sólo la corteza sería más vulnerable a la oxidación. En varios trabajos se ha reportado que cuando se utilizan aceites o harinas con alto contenido de lípidos insaturados como de chía o de castaña, para productos de panadería, la calidad de los lípidos se conserva o incluso mejora. Además, estos productos presentan una buena aceptabilidad sensorial (Costantini et al., 2014; Paciulli et al., 2018).

Teniendo en cuenta el modelo de Arrhenius, se calculó la energía de activación y el factor de aceleración de temperatura (Q_{10}). La energía de activación es una medida de la sensibilidad a la temperatura de la reacción y el factor Q_{10} predice el aumento de la tasa de oxidación con un aumento de 10 °C en la temperatura. En la Tabla 7 se detallan ambos valores para la harina y el aceite de nuez. La energía de activación y el factor Q_{10} para HN fueron mayores que para el aceite, demostrando que la harina de nuez es más estable que el aceite ante un aumento de temperatura.

Finalmente, la vida útil estimada para el almacenamiento de HN y de AN a 20 °C fue de 16 y 3 meses, respectivamente. Estos resultados demuestran que el aceite contenido en HN está protegido por los antioxidantes y probablemente por las estructuras remanentes de los cotiledones.

3.4.5. Calidad proteica de la harina de nuez

La Tabla 8 enlista el perfil de aminoácidos de las proteínas de HN y la puntuación química de aminoácidos (PQAA). La puntuación química se calculó como $[\text{mg de aminoácidos esenciales (AAE)}/\text{g de proteína}]/ [\text{mg de AAE}/\text{g de patrón de proteína requerida por la FAO}]$. Se adoptaron los valores de los niños en edad preescolar como patrón de puntuación para todas las edades (WHO/FAO, 2007), ya que son los más estrictos en todos los rangos de edad a excepción de lactantes. Para los seres humanos, los AAE son leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, triptófano, metionina, fenilalanina e histidina. Por lo tanto, estos aminoácidos tienen que ser ingeridos en los alimentos. En las proteínas de la nuez, los aminoácidos más abundantes son asparagina, glutamina y arginina. Esta última se considera un AAE condicional, cuando la capacidad endógena de síntesis del

aminoácido se ve excedida por condiciones de estrés y en estados catabólicos (Morris et al., 2017). En el caso de HN, los aminoácidos limitantes son los sulfurados, cisteína y metionina. Sin embargo, la HN contiene niveles relativamente altos de arginina y una relación lisina/arginina igual a 0,345. El bajo valor de esta relación se ha relacionado con un efecto antiaterogénico mediado por el óxido nítrico (NO) del que la arginina es un precursor. El NO es un vasodilatador que puede inhibir la adhesión y agregación de las plaquetas (Feldman, 2002).

Tabla 8. Perfil aminoacídico de las proteínas de la harina de nuez

Aminoácidos	[mg AA/g proteína de nuez]	Aminoácidos	[mg AA/ g proteína de nuez]	PQAA*
Asparagina	172,0 ± 3,3	Alanina	53 ± 4,2	-
Glutamina	256,0 ± 3,7	Valina *	28,5 ± 0,3	0,68
Serina	69,2 ± 2,2	Histidina*	17,5 ± 1,5	0,97
Metionina (Met)	2,6 ± 0,3	Isoleucina*	64,5 ± 2,4	2,08
Glicina	33,0 ± 2,9	Leucina*	62,7 ± 3,2	1,00
Prolina	25,1 ± 1,3	Lisina*	36,2 ± 5,9	0,70
Arginina	104,9 ± 7,5	Treonina*	17,1 ± 5,6	0,63
Fenilalanina(Phe)	26,3 ± 1,2	Triptófano*	9,1 ± 1,8	1,23
Tirosina (Tyr)	21,0 ± 2,2	Met+Cys*	3,9 ± 0,3	0,15
Cisteína (Cys)	1,3 ± 0,00	Phe+Tyr*	47,3 ± 2,5	1,02

Promedio ± desvío estándar; *PQAA: puntaje químico correspondiente a los aminoácidos con asterisco. El PQAA fue calculado como [mg de aminoácidos esenciales (AAE)/g de proteína]/ [mg de AAE/g de patrón de proteína requerido por la FAO].

3.4.6. Propiedades fisicoquímicas de harina de nuez

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la harina de nuez con el objetivo de evaluar cómo la HN podría afectar a la formulación de un nuevo

producto. La HN presentó un bajo valor de actividad del agua ($0,565 \pm 0,02$), lo que demuestra que el crecimiento de los microorganismos no se ve favorecido.

Con respecto al color de la HN en la Figura 19 se muestra la harina de nuez en una caja de Petri y junto, como complemento, los parámetros de color. Se obtuvieron los siguientes parámetros $L^*=52,9 \pm 1,5$; $a^*= 2,8 \pm 0,2$; $b^*=16,2 \pm 0,8$, y los valores calculados de tonalidad (h°_{ab}) y croma (C^*_{ab}) fueron $80,1 \pm 0,8$ y $14,3 \pm 0,8$, respectivamente. Los valores de luminosidad y h°_{ab} fueron inferiores a los informados anteriormente por otros autores (Rabadán, Pardo, Gómez, et al., 2018b). Pero estas discrepancias están probablemente relacionadas con la cantidad de aceite en la HN. Dado que la mayoría de los pigmentos se extraen junto con el aceite, cuanto mayor sea el contenido de aceite, menores serán los valores de L^* y h°_{ab} . Estos resultados sugieren que, si se añade la HN a un producto de panadería, el color probablemente cambiará, lo que podría ser deseable en productos de panadería sin gluten.

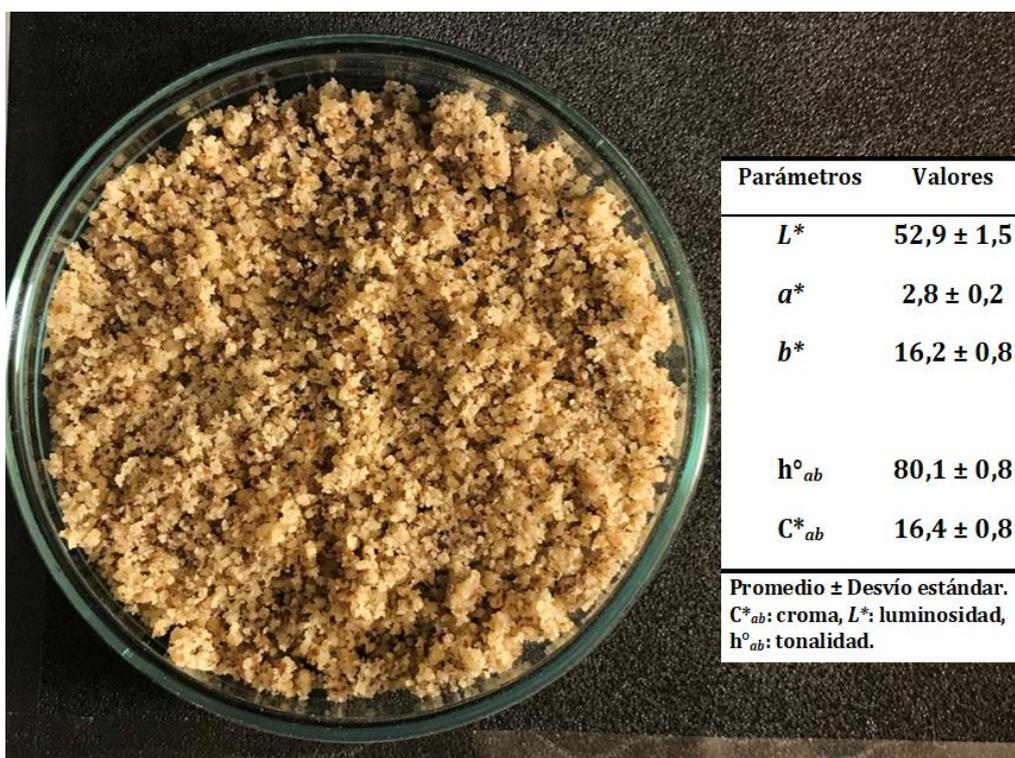


Figura 19. Fotografía de la harina de nuez y los parámetros de color instrumental

3.4.6.1. Parámetros físicos de retención de la harina de nuez

La capacidad de retención de agua (CRA) está relacionada con la habilidad de una matriz para atrapar agua. El valor encontrado para la CRA fue de $2,58 \pm 0,1$ mL/g HN. La absorción y retención de agua por parte de las harinas es relevante en el proceso de panificación porque está relacionada con parámetros como el tiempo de cocción y la textura después de la cocción. La capacidad de absorción de aceite (CAA) fue de $0,72 \pm 0,05$ g de aceite / g de HN, que es inferior a los valores comunicados para las fracciones de fibra dietética de la chía (Vázquez Ovando et al., 2009). Se desconoce el mecanismo de adsorción del aceite, pero las propiedades superficiales y la naturaleza hidrofóbica de las partículas son importantes (Betancur-Ancona et al., 2004). Los bajos valores de CAA se han relacionado con el bajo contenido de fibra dietética soluble. No obstante, la capacidad de adsorción de moléculas orgánicas (CAMO) fue de $0,77 \pm 0,09$ g de aceite / g de HN, y se han notificado valores cercanos a 1 como saludables (Vázquez-Ovando, Alfredo et al., 2009). La CAMO se asocia con la capacidad de la fibra dietética para interactuar con las sustancias carcinógenas y mutagénicas y con los ácidos biliares, lo que provoca un efecto hipocolesterolémico (Dhingra et al., 2012; Mora et al., 2013). Así, la adición de HN en una formulación de panadería aportaría beneficios fisiológicos.

3.4.6.2. Distribución de tamaño de partícula de la harina de nuez

La Figura 20 muestra la distribución ponderada por volumen de la HN con y sin tratamiento de sonicación. Además, se obtuvo el percentil 50 (D(0,5)) que indica el diámetro máximo de las partículas que incluye el 50% de la población.

La HN sin sonicación sólo presentó un pico centrado en 264,8 μm (D(0,5)). Mientras que cuando la HN fue sonicada, las partículas se desaglomeraron y se observó un pico definido (centrado a $\approx 0,15 \mu\text{m}$) junto con dos picos superpuestos y amplios. Además, se observó un desplazamiento hacia tamaños de partícula inferiores. En este caso, el D(0,5) fue de 13,4 μm . Este valor se aproxima a los diámetros de partícula de la harina de trigo (C.G. Arp, Correa y Ferrero, 2018). El efecto obtenido por la sonicación es relevante, ya que, si el tamaño de las partículas se modifica durante el procesamiento, las propiedades tecnológicas de HN pueden cambiar.

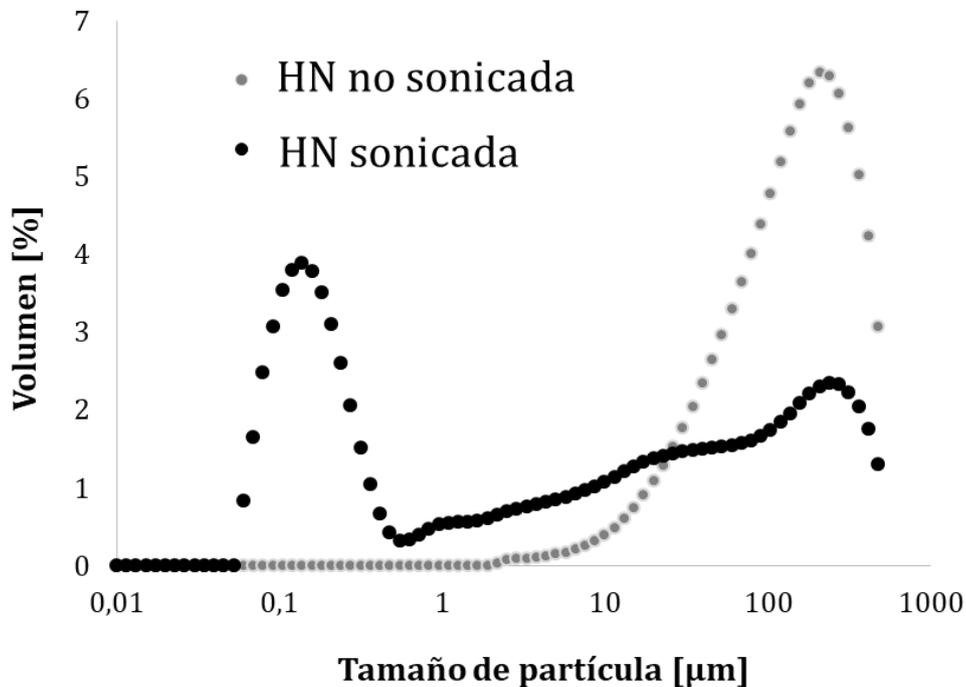


Figura 20. Distribución en volumen del tamaño de partícula de la harina de nuez con y sin tratamiento de sonicación

3.4.7. Microestructura de la harina de nuez

3.4.7.1. Microscopía láser confocal de barrido

Las imágenes de harina de nuez adquiridas mediante microscopía confocal láser de barrido a 20x se muestran en la Figura 21. Las imágenes a, b, c y d

proceden de la misma micrografía, pero los canales de los fluoróforos se encendieron y apagaron selectivamente para diferenciar más fácilmente los componentes. Las imágenes se tiñeron con una mezcla formada por rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor. La rodamina B es un colorante rojo que se une preferentemente a las proteínas (Correa et al., 2014a). El calcoflúor se une fuertemente a las estructuras que contienen celulosa (Öhgren, Lopez-Sanchez y Lorén, 2019), dando a la fibra un color azul y el rojo Nilo se une a los lípidos tiñéndolos de color verde (Nicholson y Marangoni, 2019).

La Figura 21a muestra todos los canales de fluoróforos encendidos. Donde se observa el predominio de los lípidos y proteínas, seguidos por las estructuras, en color azul, atribuibles a fragmentos de fibra dietaria. Cuando todos los canales se encuentran encendidos, la sobreposición de los canales correspondientes a los lípidos y las proteínas dan como resultado la coloración amarilla que se observa en la imagen, esto, evidencia que ambos componentes se encuentran juntos. La Figura 21b tiene el canal del calcoflúor encendido, facilitando la visualización de las estructuras fibrosas. Estos son las estructuras remanentes de la nuez aún después de la molienda. Por otro lado, la Figura 21c tiene el canal de rojo Nilo encendido, las estructuras verdes presentes ampliamente por toda la micrografía señalan la localización de los lípidos en la HN. Mientras que la Figura 21d tiene sólo el canal de rodamina B encendido, las estructuras rojas presentes por toda la imagen, muestran la gran proporción de proteínas en este subproducto de la industria aceitera.

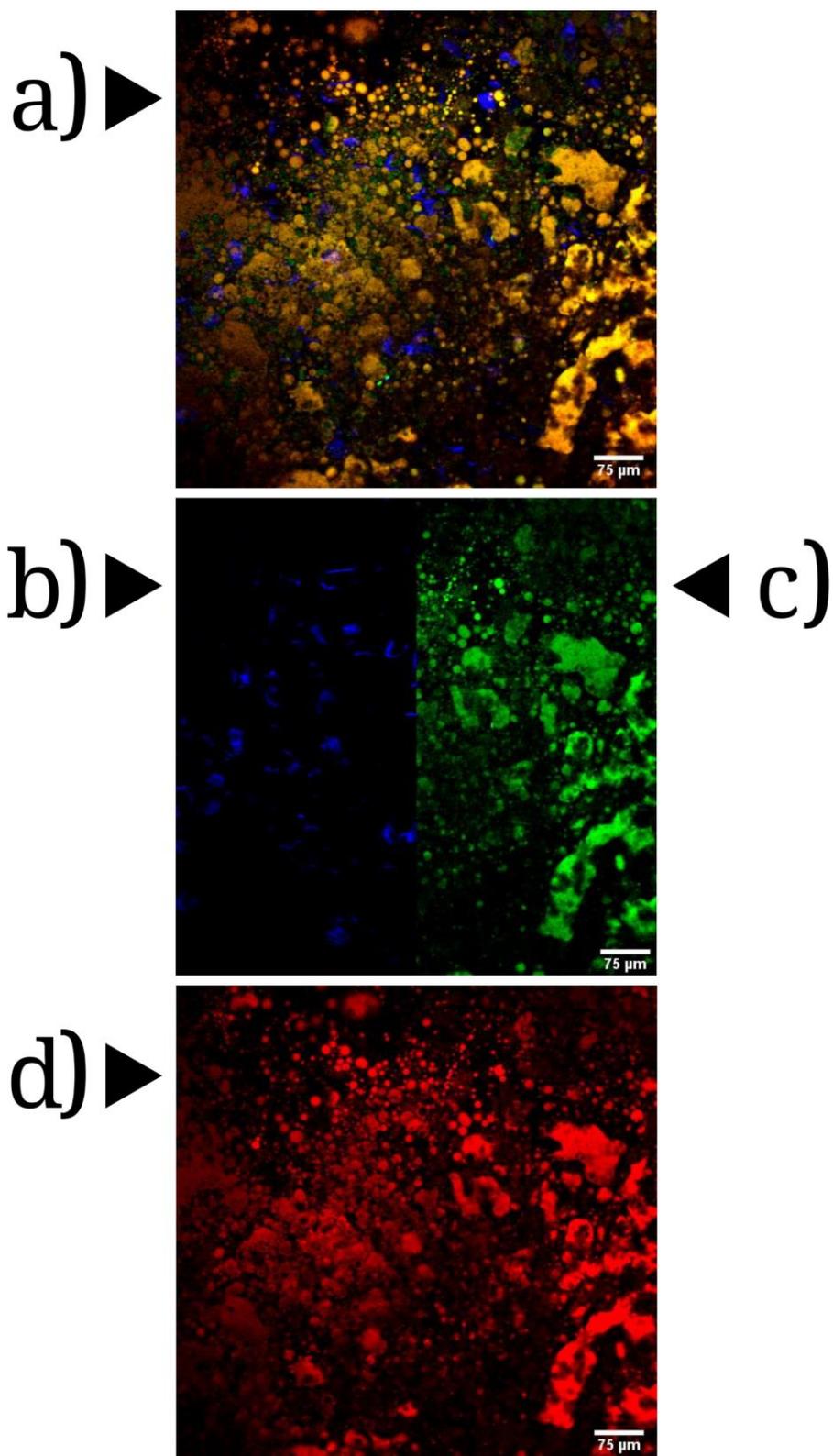


Figura 21. Micrografías de Harina de nuez mediante microscopía confocal láser de barrido a 20x. Imágenes a) todos los canales de fluoróforos encendidos (calcoflúor: CF, rojo Nilo: RN y rodamina B: RB), b) canal CF encendido, c) canal RN encendido y d) canal RB encendido

3.4.7.2.SEM y ESEM

Los tejidos del cotiledón del nogal (*Juglans regia* L.) están formados por células parenquimáticas compactas que son los depósitos de lípidos y proteínas. Los lípidos se organizan en cuerpos oleosos que están cubiertos por cuerpos proteicos (Dourado et al., 2004). Esta estructura se desorganiza por la presión en la extracción del aceite y luego, por la molienda para la obtención de la harina.

La Figura 22 corresponde a la harina de nuez observada por microscopia electrónica de barrido en modo ambiental (ESEM), los lípidos, al ser los componentes mayoritarios, cubren la muestra impidiendo la visualización de otros componentes. Además, los lípidos se funden debido al impacto del haz de electrones, y por eso la imagen no es clara. Por lo tanto, la evaluación de la microestructura de la HN se realizó en la HN desgrasada (HND) en modo de bajo vacío (Figura 23).

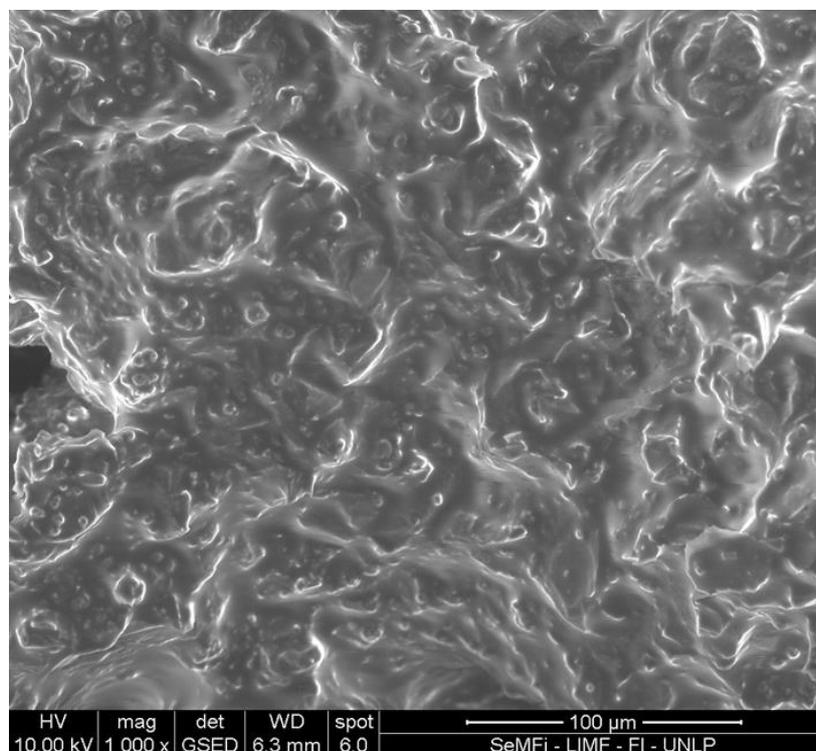


Figura 22. Micrografía electrónica de la harina de nuez observada en modo ESEM a 1000x

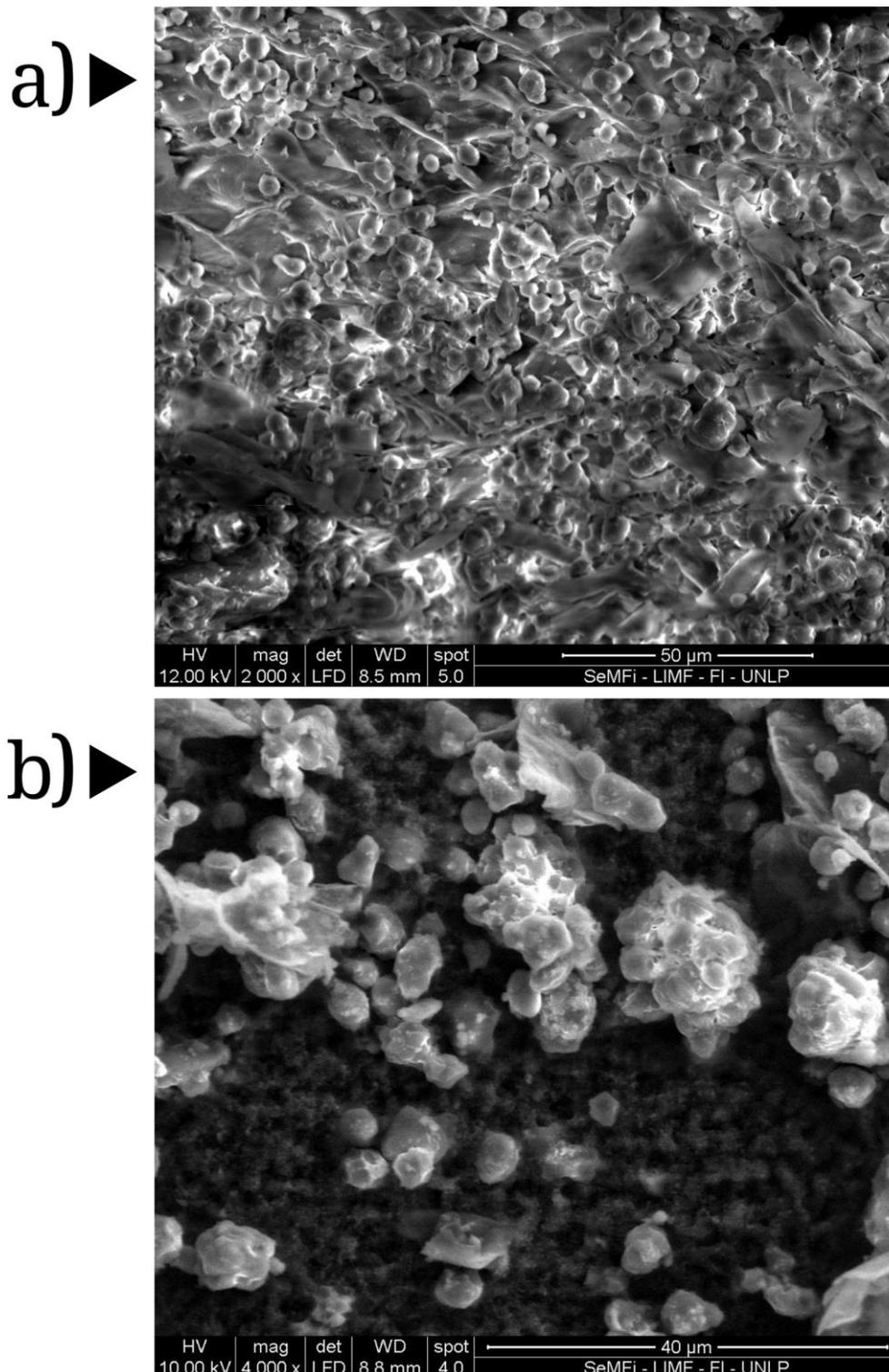


Figura 23. Micrografías electrónicas de harina de nuez desgrasada. a y b) observadas en modo de bajo vacío a 2000× y a 4000×, respectivamente

Como se esperaba, no se observaron células intactas. La HND está compuesta principalmente por finas capas de paredes celulares y cuerpos proteicos (Figura

23a). Estos cuerpos proteicos están aglomerados, y hay fantasmas de la red citoplasmática que una vez rodeó los cuerpos lipídicos (Figura 23b). El pequeño tamaño de las partículas y la ausencia de células intactas podrían contribuir a la bioaccesibilidad de los lípidos HN.

3.4.8. Estabilidad de la harina de nuez durante el almacenamiento

La harina de nuez al tener cerca de 55 % de lípidos (base seca) es susceptible a perder calidad durante el almacenamiento debido a procesos de oxidación lipídica. Por este motivo, se evaluó su estabilidad durante diez meses de almacenamiento en bolsas selladas con y sin vacío a tres temperaturas (20, 0 y -20 °C). Se midió, cada dos meses, la variación de los siguientes parámetros fisicoquímicos para seguir su estabilidad en el tiempo: color instrumental, porcentaje de humedad, a_w , perfil de ácidos grasos, índices de peróxidos, iodo y p-anisidina.

3.4.8.1. Parámetros físicos de la harina de nuez almacenada

En cuanto a los parámetros físicos de la harina de nuez, se midió el color debido a que este podría cambiar por la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento. Los parámetros luminosidad (L^*) y la variación total de color de HN durante el almacenamiento se muestran en la Tabla 9. Es importante recordar que, al comparar la luminosidad de la harina de nuez obtenida por distintos métodos, se encontró que a mayor contenido lipídico menores son los valores de luminosidad (D. Labuckas, Maestri y Lamarque, 2014). Durante el almacenamiento, el parámetro luminosidad varió muy poco durante todo el ensayo. Aunque, al octavo mes los valores de L^* aumentaron ligeramente. En cuanto al efecto ocasionado por la presencia de oxígeno y la temperatura de almacenamiento en los distintos tratamientos, no se observó una tendencia clara con respecto a la

luminosidad de HN. Además, se calculó la variación total de color (ΔE^*) para comparar los parámetros de color de los distintos tratamientos con los de HN al iniciar el ensayo. El parámetro ΔE^* se emplea para evaluar si los cambios de color pueden ser percibidos por el ojo humano a simple vista (Goswami et al., 2015). Se considera que la diferencia de color no es notoria para el ojo humano cuando ΔE^* es menor de 1, la diferencia podría ser visible para el ojo humano cuando ΔE^* toma valores entre 1 y 3 y la diferencia de color es obvia para el ojo humano cuando es mayor que $\Delta E^* > 3$. En este caso, ΔE^* presentó valores superiores a 3 en las muestras almacenadas durante 8 meses a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ con y sin aplicación de vacío y en las muestras sin vacío almacenadas a $20\text{ }^\circ\text{C}$ ($NV20_{t8}$).

Tabla 9. Variación del color de la harina de nuez almacenada

Mes	Tratamiento	Luminosidad (L*)	Variación total de color (ΔE^*)
Cero	HN	52,1 \pm 1,3	
	NV20	52,1 \pm 1,4 ^{bc}	1,9 \pm 0,7 ^{ab}
	V20	51,9 \pm 1,2 ^{bc}	1,5 \pm 0,4 ^a
Dos	NV0	52,2 \pm 1,3 ^c	1,9 \pm 0,7 ^b
	V0	51,2 \pm 0,9 ^{ab}	2,1 \pm 0,5 ^b
	NV-20	50,4 \pm 1,3 ^a	2,3 \pm 0,8 ^b
	V-20	51,9 \pm 1,2 ^{bc}	1,9 \pm 0,6 ^{ab}
	NV20	52,5 \pm 1,1 ^{abc}	1,3 \pm 0,6 ^a
	V20	51,9 \pm 0,9 ^a	1,9 \pm 0,9 ^b
Cuatro	NV0	53,1 \pm 1,1 ^c	1,9 \pm 0,7 ^{ab}
	V0	52,2 \pm 1,1 ^{ab}	2,2 \pm 0,6 ^{bc}
	NV-20	52,1 \pm 0,9 ^a	2,1 \pm 0,9 ^{bc}
	V-20	52,9 \pm 1,2 ^{bc}	2,6 \pm 0,9 ^c
	NV20	52,4 \pm 0,9 ^b	1,9 \pm 0,6 ^{ab}
	V20	52,4 \pm 0,8 ^b	1,8 \pm 0,6 ^a
Seis	NV0	51,4 \pm 1,2 ^a	2,4 \pm 0,6 ^{bc}
	V0	51,7 \pm 1,2 ^{ab}	2,4 \pm 0,6 ^{bc}
	NV-20	51,6 \pm 1,4 ^{ab}	2,4 \pm 0,8 ^c
	V-20	51,7 \pm 1,1 ^{ab}	2,7 \pm 0,7 ^c
	NV20	55,4 \pm 0,8 ^d	3,9 \pm 0,6 ^c
	V20	53,6 \pm 0,9 ^b	2,3 \pm 1,0 ^a
Ocho	NV0	52,4 \pm 1,1 ^a	1,7 \pm 0,8 ^a
	V0	52,6 \pm 0,9 ^a	2,2 \pm 0,7 ^a
	NV-20	54,6 \pm 1,1 ^c	3,1 \pm 1,1 ^b
	V-20	55,1 \pm 1,3 ^{cd}	3,5 \pm 1,1 ^{bc}
	NV20	53,2 \pm 0,9 ^c	2,6 \pm 0,8 ^b
	V20	53,3 \pm 0,9 ^c	2,0 \pm 0,8 ^{ab}
Diez	NV0	50,9 \pm 1,6 ^a	1,9 \pm 1,1 ^{ab}
	V0	51,9 \pm 1,8 ^{ab}	1,9 \pm 1,2 ^a
	NV-20	52,5 \pm 1,8 ^{bc}	2,1 \pm 1,1 ^{ab}
	V-20	52,8 \pm 1,7 ^{bc}	2,1 \pm 1,2 ^{ab}

Promedio \pm Desvío estándar. HN: harina de nuez. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas con vacío. Diferentes letras, en un mismo mes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Por otro lado, en cuanto a los parámetros relacionados con el agua. El valor inicial y la evolución del porcentaje de humedad de la harina se muestran en la Figura 24.

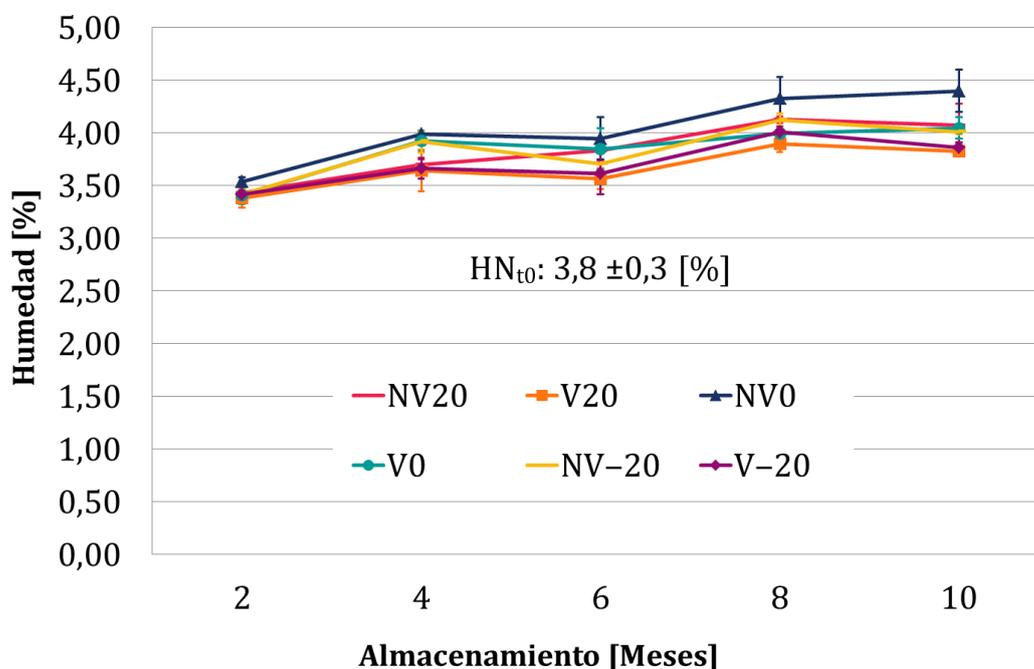


Figura 24. Variación del porcentaje de humedad de la harina de nuez durante el almacenamiento. HN_{t0} harina de nuez tiempo cero. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas al vacío. Las barras verticales indican el desvío estándar de las muestras

La HN es un alimento con un bajo contenido de humedad (HN_{t0} : $3,8 \pm 0,3$ [%]). Se observó que la humedad no varió en las muestras medidas al segundo mes pero luego, durante todo el tiempo ensayado de almacenamiento se observó un aumento moderado pero sostenido de la humedad independientemente del tratamiento experimental. Esta situación probablemente se debió a la alta humedad relativa en las distintas cámaras experimentales donde se realizaron los almacenamientos. La humedad relativa fue de 57 ± 3 , 92 ± 6 y 76 ± 10 % para las cámaras de 20, 0 y -20 °C, respectivamente. Por otro lado, al comparar el efecto del tipo de sellado (sin o con vacío) y la temperatura, se observó que las muestras de HN almacenadas en la cámara a 0 °C presentaron el mayor incremento,

independientemente del tipo de sellado. Esto debido a que esta cámara presentó la humedad relativa más alta. Un patrón similar fue observado por Vanhanen y Savage (2006) para harina de nuez almacenada por seis meses en distintos envases y a distintas temperaturas.

Otro factor importante para la estabilidad de HN es la actividad acuosa. Tanto la evolución, como el valor inicial de a_w se muestran en la Figura 25. La variación de la a_w no presentó una tendencia clara durante el transcurso de todo el ensayo. Excluyendo $V0_{t4}$, los demás tratamientos permanecieron relativamente estables desde el inicio hasta el sexto mes. En este lapso (mes 2, 4 y 6) aunque existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a un mismo tiempo, en la práctica estas variaciones son despreciables. La tendencia a valores levemente mayores de a_w se relaciona con la tendencia observada en el contenido de humedad durante el almacenamiento.

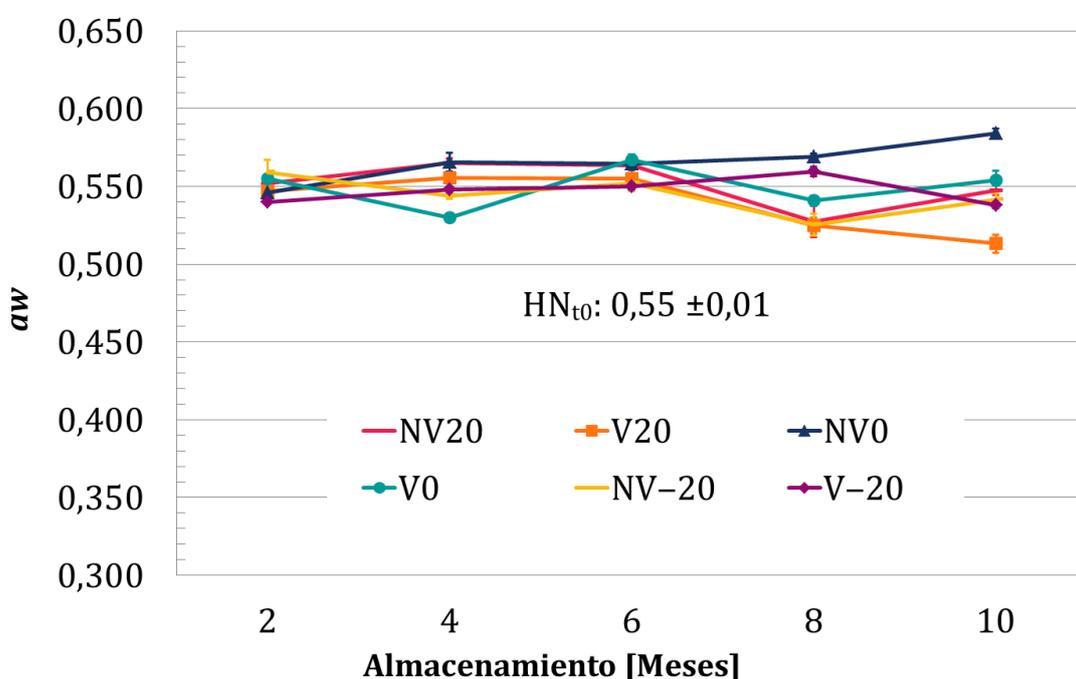


Figura 25. Variación de la actividad acuosa de la harina de nuez durante el almacenamiento. HN_{t0} harina de nuez tiempo cero. NV: bolsas sin vacío. V: bolsas al vacío. Las barras verticales indican el desvío estándar de las muestras

3.4.8.2. Estabilidad lipídica durante el almacenamiento

La estabilidad lipídica de la harina de nuez se evaluó por varios métodos. Se determinó, por cromatografía gaseosa, el perfil de ácidos grasos presentes en HN. La variación de los perfiles de la harina almacenada se muestra en la Tabla 10. En la harina de nuez fresca la proporción de ácidos grasos fue linoleico (18:2 n-6) > oleico (18:1 n-9) > α -linolénico (18:3 n-3) > palmítico (16:0) > y esteárico (18:0). Durante todo el almacenamiento y con los distintos tratamientos, se observó la misma proporción de ácidos grasos que presentó HN fresca. Labuckas y colaboradores (2011) reportaron disminuciones en cuanto a los ácidos grasos insaturados de harina de nuez almacenada en envases plásticos transparentes multicapa y con recubrimiento de aluminio a 25 °C. Sin embargo, al comparar, el efecto del almacenamiento, en las condiciones más drásticas (almacenamiento sin vacío y a 20 °C), entre los 2 y 10 meses (NV20_{t2} y NV20_{t10}) no se observaron grandes diferencias en el porcentaje de ácidos grasos presentes en HN. De igual modo, en las otras condiciones de almacenamiento tampoco se observaron grandes cambios por lo que no fue posible determinar una tendencia del efecto de la temperatura y de la presencia de oxígeno durante el almacenamiento. A pesar de que en algunos casos se observaron diferencias significativas, las variaciones nunca superaron el 1 %, por lo que se las puede catalogar como mínimas y sin un gran impacto en la calidad del producto. Es importante reiterar que las bolsas siempre estuvieron alejadas de la luz durante todo el ensayo experimental.

Tabla 10. Variación del perfil de ácidos grasos presentes en la harina de nuez almacenada

M	T	[% ácidos grasos/ ácidos grasos totales]				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
0	HN	7,72±0,01	2,23±0,02	15,5±0,3	59,8±0,3	14,80±0,04
2	NV20	8,33±0,01 ^a	1,79±0,01 ^{ab}	14,2±0,2 ^a	61,32±0,09 ^c	14,39±0,09 ^a
	V20	8,12±0,04 ^a	1,73±0,02 ^a	15,3±0,1 ^{bc}	60,18±0,04 ^b	14,73±0,06 ^b
	NV0	8,2±0,6 ^a	1,82±0,03 ^b	14,9±0,2 ^b	60,4±0,4 ^b	14,73±0,07 ^b
	V0	8,5±0,2 ^a	2,17±0,03 ^c	15,60±0,04 ^{cd}	59,2±0,2 ^a	14,55±0,06 ^{ab}
	NV-20	8,2±0,01 ^a	2,18±0,05 ^c	15,7±0,2 ^d	59,2±0,2 ^a	14,72±0,07 ^b
	V-20	8,1±0,01 ^a	2,19±0,01 ^a	15,75±0,02 ^d	59,2±0,2 ^a	14,7±0,2 ^b
4	NV20	8,06±0,09 ^a	2,08±0,08 ^a	15,5±0,2 ^{ab}	59,5±0,1 ^b	14,8±0,2 ^a
	V20	8,2±0,1 ^{abc}	2,13±0,09 ^{ab}	15,5±0,3 ^{ab}	59,5±0,3 ^b	14,7±0,2 ^a
	NV0	8,27±0,05 ^{bc}	2,14±0,02 ^{ab}	15,39±0,03 ^a	59,38±0,07 ^{ab}	14,82±0,09 ^a
	V0	8,3±0,1 ^{bc}	2,24±0,06 ^b	15,71±0,09 ^b	59,1±0,4 ^a	14,7±0,2 ^a
	NV-20	8,14±0,07 ^{ab}	2,1±0,1 ^{ab}	15,74±0,09 ^b	59,3±0,2 ^{ab}	14,7±0,2 ^a
	V-20	8,11±0,08 ^{ab}	2,21±0,02 ^b	15,74±0,04 ^b	59,4±0,1 ^{ab}	14,58±0,08 ^a
6	NV20	7,8±0,1 ^{ab}	2,19±0,06 ^{ab}	15,9±0,3 ^a	59,3±0,1 ^b	14,8±0,2 ^a
	V20	7,7±0,1 ^a	2,18±0,05 ^{ab}	16,1±0,2 ^a	59,4±0,1 ^b	14,65±0,09 ^a
	NV0	8,1±0,2 ^c	2,25±0,06 ^{bc}	15,85±0,06 ^a	59,05±0,05 ^a	14,8±0,2 ^a
	V0	8,2±0,2 ^c	2,31±0,09 ^c	15,9±0,3 ^a	58,9±0,1 ^a	14,6±0,2 ^a
	NV-20	7,9±0,2 ^{bc}	2,14±0,04 ^a	15,80±0,09 ^a	59,31±0,04 ^b	14,8±0,1 ^a
	V-20	8,06±0,07 ^c	2,28±0,03 ^c	15,9±0,2 ^a	59,0±0,1 ^a	14,7±0,2 ^a
8	NV20	8,0±0,2 ^a	2,28±0,04 ^b	16,18±0,03 ^c	59,19±0,08 ^c	14,3±0,1 ^a
	V20	7,9±0,1 ^a	2,29±0,04 ^b	16,09±0,02 ^c	59,21±0,08 ^a	14,44±0,04 ^{ab}
	NV0	8,19±0,02 ^a	2,19±0,04 ^{ab}	15,75±0,02 ^b	59,2±0,1 ^a	14,65±0,04 ^b
	V0	8,24±0,02 ^a	2,20±0,07 ^{ab}	15,67±0,06 ^{ab}	59,2±0,1 ^a	14,69±0,08 ^b
	NV-20	8,2±0,1 ^a	2,07±0,06 ^a	15,63±0,02 ^a	59,5±0,2 ^a	14,66±0,02 ^b
	V-20	8,2±0,2 ^a	2,1±0,1 ^{ab}	15,65±0,06 ^{ab}	59,4±0,2 ^a	14,7±0,2 ^b
10	NV20	8,1±0,1 ^a	2,2±0,1 ^{ab}	16,29±0,09 ^e	59,18±0,02 ^a	14,2±0,1 ^a
	V20	8,0±0,3 ^a	2,31±0,06 ^b	16,03±0,03 ^d	59,2±0,2 ^{ab}	14,42±0,04 ^b
	NV0	8,23±0,03 ^a	2,18±0,06 ^{ab}	15,81±0,06 ^c	59,22±0,06 ^a	14,57±0,03 ^c
	V0	8,25±0,05 ^a	2,22±0,05 ^b	15,68±0,09 ^{bc}	59,18±0,07 ^a	14,69±0,06 ^{cd}
	NV-20	8,16±0,06 ^a	2,05±0,04 ^a	15,62±0,04 ^{ab}	59,49±0,08 ^b	14,69±0,01 ^{cd}
	V-20	8,1±0,2 ^a	2,30±0,03 ^b	15,46±0,07 ^a	59,32±0,05 ^{ab}	14,79±0,06 ^d

Promedio ± Desvío estándar. HN: harina de nuez. M: mes. NV: bolsas sin vacío. T: tratamiento. V: bolsas con vacío. Diferentes letras, en un mismo mes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales (p<0,05).

Índice de peróxidos

Debido al elevado contenido de lípidos insaturados presentes en la harina de nuez, se midió el índice de peróxido de la harina de nuez para establecer si se produjo oxidación primaria en sus lípidos durante el almacenamiento. Para esto se optó por el método espectrofotométrico aprovechando la reacción entre hierro y tiocianato, es importante reiterar que la extracción del aceite de la harina se realizó al mismo tiempo que se determinaba el IP y no con una extracción previa por Folch. Es así que, en la Tabla 11 se muestran la evolución del índice de peróxidos de HN. El valor inicial de la harina fue de $0,019 \pm 0,006$ [miliequi O₂/kg de HN] valor que concuerda con el valor de 0,01 [miliequi O₂/kg de aceite de nuez] (Vanhanen y Savage, 2006) y el 0,015 [miliequi O₂/kg de aceite de nuez] usando la misma mezcla de solventes (Cloroformo:metanol) (Miraliakbari y Shahidi, 2008). Además, durante el segundo mes no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Como era de esperarse con el transcurso del tiempo los valores de índice de peróxidos aumentaron. Es así que, para el cuarto mes las muestras almacenadas a mayor temperatura (NV20_{t4}, V20_{t4}, NV0_{t4} y V0_{t4}) presentaron valores más altos, y dentro de estos los más altos fueron los tratamientos sin aplicación de vacío. Para los meses posteriores el aumento en los valores continuó, pero sin observarse una tendencia clara entre los tratamientos. Sin embargo, todos los valores obtenidos hasta los diez meses fueron muy bajos, esto demuestra que el aceite en el subproducto se encuentra protegido de la oxidación. Se cree que puede ser por una combinación de factores, entre ellos, menor área de contacto con el oxígeno, debido a que parte del aceite aún se encuentra atrapado en las partículas de harina. Al mismo tiempo, el alto contenido de antioxidantes presentes en HN protegerían a la materia grasa. En consecuencia,

los valores hallados para el índice de peróxidos en la presente investigación para la harina de nuez son muy inferiores a los 15 [miliequi O₂/kg de aceite] propuestos como límite para aceites obtenidos de prensado en frío (FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 1999).

Índice de Iodo

Con el fin de establecer si los dobles enlaces de los lípidos insaturados se oxidan durante el almacenamiento se calculó el índice de iodo a partir de los ácidos grasos presentes en la harina de nuez. Los valores obtenidos de índice de iodo se encuentran detallados en la Tabla 11. En cuanto a la harina de nuez fresca se obtuvo un valor de $164,3 \pm 0,2$, un valor alto al compararlo con aceites de otras fuentes vegetales como aceite de maíz (107-135) o el aceite de girasol (118-141) (Tiefenbacher, 2017), demostrando que HN posee una buena cantidad de ácidos insaturados. Sin embargo, su alto contenido de lípidos insaturados hace susceptible a HN de sufrir oxidación. Es por esto que se calculó el índice de iodo de HN durante el almacenamiento. Es así que se observó una leve disminución en los valores de las muestras almacenadas a mayor temperatura (NV20, V20). Las muestras a 20 °C pasaron de $\approx 164,5$ a $\approx 162,6$ en diez meses. Sin embargo, estos valores continúan siendo altos, sobre todo teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento transcurrido, y se encuentran dentro del rango de 150 -166 reportado para aceites de nuez por varios autores (Martínez et al., 2010)

Tabla 11. Variación de los índices de peróxidos e Iodo de la harina de nuez almacenada

Mes	Tratamiento	Índice de peróxidos [miliequi O ₂ /kg de HN]	Índice de Iodo
Cero	HN	0,019 ±0,006	164,3 ±0,2
	NV20	0,022 ±0,002 ^a	164,6 ±0,3 ^b
	V20	0,023 ±0,002 ^a	164,5 ±0,1 ^b
Dos	NV0	0,024 ±0,001 ^a	164,6 ±1,0 ^b
	V0	0,023 ±0,001 ^a	162,7 ±0,2 ^a
	NV-20	0,025 ±0,001 ^a	163,2 ±0,3 ^a
	V-20	0,021 ±0,001 ^a	163,3 ±0,2 ^a
	NV20	0,024 ±0,002 ^{cd}	163,8 ±0,2 ^c
	V20	0,021 ±0,001 ^{bc}	163,4 ±0,8 ^{bc}
Cuatro	NV0	0,029 ±0,003 ^d	163,5 ±0,1 ^{bc}
	V0	0,023 ±0,001 ^{bc}	162,8 ±0,3 ^a
	NV-20	0,019 ±0,02 ^{ab}	163,3 ±0,4 ^{abc}
	V-20	0,016 ±0,002 ^a	163,14 ±0,07 ^{ab}
	NV20	0,077 ±0,004 ^c	163,8 ±0,2 ^c
	V20	0,059 ±0,004 ^{ab}	163,8 ±0,2 ^c
Seis	NV0	0,065 ±0,004 ^b	163,2 ±0,6 ^{abc}
	V0	0,055 ±0,003 ^a	162,8 ±0,6 ^a
	NV-20	0,077 ±0,003 ^c	163,7 ±0,4 ^{bc}
	V-20	0,067 ±0,003 ^b	163,1 ±0,3 ^{ab}
	NV20	0,111 ±0,001 ^b	162,6 ±0,5 ^a
	V20	0,108 ±0,003 ^{ab}	162,8 ±0,3 ^a
Ocho	NV0	ND	163,09 ±0,09 ^a
	V0	0,104 ±0,003 ^a	163,09 ±0,04 ^a
	NV-20	0,106 ±0,002 ^{ab}	163,5 ±0,3 ^a
	V-20	0,104 ±0,001 ^a	163,3 ±0,8 ^a
	NV20	0,176 ±0,004 ^{abc}	162,4 ±0,4 ^a
	V20	0,161 ±0,002 ^a	162,8 ±0,4 ^{ab}
Diez	NV0	0,171 ±0,004 ^{ab}	162,9 ±0,1 ^{abc}
	V0	0,188 ±0,002 ^c	163,03 ±0,04 ^{abc}
	NV-20	0,18 ±0,01 ^{bc}	163,6 ±0,2 ^c
	V-20	0,162 ±0,003 ^a	163,4 ±0,3 ^{bc}

Promedio ± Desvío estándar. HN: harina de nuez. M: mes. ND: no determinado. NV: bolsas sin vacío. T: tratamiento. V: bolsas con vacío. Diferentes letras, en un mismo mes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales (p<0,05).

Índice de p-anisidina

Después de analizar la HN y determinar la poca presencia de compuestos que evidencien oxidación primaria es importante descartar que estos se hayan transformado en compuestos de oxidación secundaria. El índice de p-anisidina (IA) es útil para este objetivo. En la Figura 26 se observa los valores de p-anisidina encontrados en la harina de nuez almacenada por 10 meses. Es importante mencionar que durante todo el almacenamiento se determinó IA, cada dos meses, no obstante, los resultados fueron inconclusos o demasiado bajos para ser registrados. Sin embargo al décimo mes IA pudo ser determinado en todos los tratamientos experimentales. Como se observa en el gráfico, los tratamientos sin la aplicación de vacío (NV20_{t10}, NV0_{t10} y NV-20_{t10}) presentaron los valores más altos. No obstante, todos los valores son cercanos al 0,23 reportado para aceite fresco de nuez extraído con hexano (Miraliakbari y Shahidi, 2008).

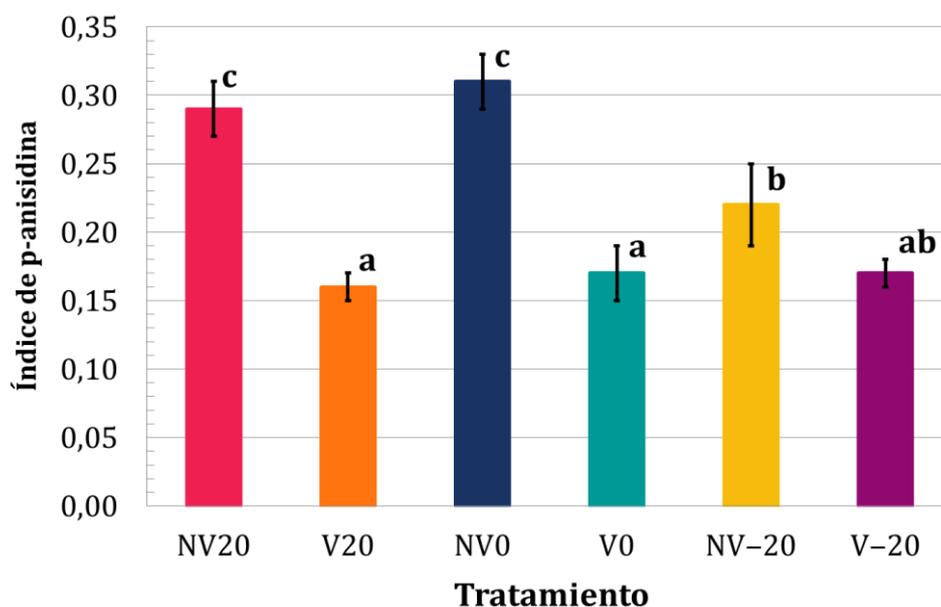


Figura 26. Índice de p-anisidina en la harina de nuez almacenada por diez meses. Las líneas negras representan el desvío estándar y letras diferentes entre los tratamientos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). NV y V son tratamientos sin y con aplicación de vacío, respectivamente. 20, 0 y -20 hacen referencia a sus respectivas temperaturas [°C] de almacenamiento

En general, estos resultados permiten concluir que la harina de nuez presentó estabilidad oxidativa durante el almacenamiento en las distintas condiciones ensayadas: sin y con aplicación de vacío y a 20, 0 y -20 °C. Estos resultados, aunque realizados en un lapso menor al de vida útil estimado a través del ensayo de oxidación acelerada (Rancimat), estarían apoyando a los mismos. La inesperada alta estabilidad oxidativa podría encontrarse relacionada con la presencia de un alto contenido de antioxidantes, la presencia de fragmentos tisulares que protegerían al aceite y la ausencia de luz durante la realización del ensayo. Además, las condiciones de prensado en frío (informadas por el proveedor) al realizar la extracción del aceite contribuirían en gran medida a la obtención de un producto de calidad y estabilidad en el tiempo.

3.5. Conclusiones parciales

Los resultados de este capítulo muestran que la harina de nuez (HN) conserva la mayor parte de las propiedades de la nuez y del aceite de nuez, siendo una buena fuente de micro y macroelementos (P, Cu, Mn y Mg) y de proteínas y fibra dietaria total, en comparación con algunas harinas utilizadas habitualmente en la panificación.

Al ser HN un subproducto de la obtención de aceite por prensado en frío, esta, presenta una muy buena relación de ácidos grasos insaturados/saturados (9,06), siendo mayoritario el ácido linoleico ($\approx 60\%$). Además HN presentó un buen perfil de aminoácidos (relación lisina/arginina: 0,345) y un importante contenido de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

Por otro lado, la HN mostró buenas propiedades tecno-funcionales, es decir, su incorporación podría mejorar las características nutricionales y tecnológicas de los nuevos alimentos. Asimismo, por microscopia confocal laser de barrido se logró observar la distribución de los componentes en HN mostrando el predominio de los lípidos y proteínas, seguidos de fibra dietaria.

Finalmente, teniendo en cuenta que la HN tiene una a_w relativamente baja (0,6) y un alto contenido en grasa, la estabilidad oxidativa es un factor determinante en su vida útil. Durante los diez meses de almacenamiento se evidenció que la proporción de ácidos grasos es comparable con la de HN fresca.

Asimismo, se obtuvieron bajos índices de peróxidos y p-anisidina. Los índices de p-anisidina siendo aún más bajos para los tratamientos sellados al vacío. Debido a esto, se recomienda siempre almacenar HN al vacío y alejada de la luz. Por último, la HN demostró ser más estable a la oxidación que el aceite de nuez, siendo la vida útil estimada a $20\text{ }^\circ\text{C}$ de casi 17 meses.

Capítulo 4: Batidos libres de gluten con harina de nuez

Capítulo 4

4.1. Introducción

Al elaborar productos panificados sin gluten, suelen obtenerse batidos en lugar de masas, debido a las características de las harinas empleadas y a la gran cantidad de agua que se requiere agregar para su elaboración. El almidón es el principal componente en los batidos para la elaboración de productos panificados y en productos dulces como tortas, muffins y budines, otros componentes importantes son el huevo, la grasa y el azúcar. El almidón junto con las proteínas juega un rol muy importante en la determinación de la estructura y calidad del producto final (Hesso, Loisel, et al., 2015). Durante la cocción, el almidón gelatiniza y las proteínas coagulan convirtiendo el batido en una espuma sólida (Guy y Pithawala, 2007). Por otro lado, durante la primera etapa del horneado, las proteínas del huevo contribuyen a la estabilización de las burbujas de aire al migrar desde la fase grasa a la fase acuosa. Las grasas cumplen diferentes roles, favoreciendo la incorporación de aire durante el batido, aumentando la transferencia de calor durante la cocción y otorgando al producto final una textura suave y sensación húmeda en la boca. Con respecto al azúcar, durante el batido ejerce un efecto abrasivo sobre la grasa dando lugar a la ruptura de agregados cristalinos, lo que favorece la incorporación de aire (Hesso, Marti, et al., 2015). Además, modifica la gelatinización del almidón y la desnaturalización proteica al restringir la disponibilidad del agua para la gelatinización del almidón e hidratación de las proteínas.

El estudio de las características y propiedades de los batidos es una tarea esencial para asegurar una buena calidad tecnológica del producto final. La

caracterización puede incluir aspectos texturales, reológicos, térmicos, estructurales y microscópicos. Estos parámetros del batido están relacionados con los atributos texturales del producto final que, a su vez, determinarán sus características sensoriales y la aceptabilidad por parte del consumidor (Bozdogan, Kumcuoglu y Tavman, 2019).

4.2. Objetivos del capítulo

4.2.1. Objetivos general del capítulo

Evaluar los efectos de la adición de harina de nuez sobre las propiedades reológicas, texturales, térmicas y microestructurales de batidos sin gluten destinados a la elaboración de budines.

4.2.2. Objetivos específicos del capítulo

- Determinar las propiedades de empaste de las premezclas control (harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca) y con harina de nuez.
- Establecer el efecto de la adición de la harina de nuez en las transiciones térmicas de los batidos libres de gluten.
- Describir el comportamiento reológico y textural de los batidos libres de gluten con harina de nuez.
- Establecer el efecto de la adición de la harina de nuez en la microestructura de los batidos libres de gluten.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Ingredientes usados para las premezclas y batidos

Harina de arroz (HA), almidón de maíz (AM) y fécula de mandioca (FM) (Santa María, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina), azúcar (Ledesma, Provincia de Jujuy, Argentina), sal comercial (Celusal, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina), aceite de girasol (Argentina), esencia de vainilla (Dos Anclas), leche entera fluida (La Serenísima), huevo deshidratado (Ovobrand, Brandsen, Provincia de Buenos Aires, Argentina), hidroxipropilmetilcelulosa HPMC F4M (Dow Chemical, Midland, MI, EE.UU.), agua destilada y la harina de nuez (HN).

4.3.2. Formulación de las premezclas y batidos

4.3.2.1. Premezclas

La premezcla control (PControl) se preparó mezclando harina de arroz (HA) [0,70 kg], almidón de maíz (AM) [0,15 kg] y fécula de mandioca (FM) [0,15 kg]. La harina de nuez se añadió en 10 %, 15 % y 20 % respecto a la premezcla control (PHN10, PHN15 y PHN20, respectivamente).

4.3.2.2. Batidos libres de gluten

Se empleó la siguiente mezcla de harinas 70 g de HA, 15 g de AM y 15 g de FM. Además, se añadieron los siguientes ingredientes: 66,4 g de agua destilada, 50 g de azúcar, 40 g de leche entera, 11,1 g de huevo deshidratado, 11 g de aceite de girasol, 2,2 g de HPMC, 1,1 g de sal, 0,5 g de polvo de hornear y 0,25 g de esencia de vainilla por cada 100 g de mezcla de harinas. La harina de nuez se añadió en tres niveles 10, 15 y 20 % en base a la mezcla de harinas (HN10, HN15 y HN20, respectivamente). Como la HN tiene un alto contenido de lípidos, la cantidad de

aceite de girasol utilizada se redujo progresivamente al aumentar el nivel de HN, para mantener el contenido en lípidos cerca de 11 % en todas las formulaciones.

4.3.3. Propiedades de empaste de las premezclas

El viscoamilógrafo rápido (RVA, por Rapid Visco Analyser) es un viscosímetro optimizado para analizar las propiedades viscosas de suspensiones de almidones, harinas y alimentos y que permite aplicar perfiles de calentamiento/enfriamiento y agitación variables. El RVA es fácil de manejar y versátil en cuanto a los procedimientos de ensayo. Además, se recomienda por su rapidez y su fuerte acción de cizalla, en comparación con un amilógrafo estándar (Zhou et al., 1998).

En la Figura 27 se muestra un perfil viscoamilográfico típico junto con la rampa de temperatura empleada. Además, se señalan los parámetros viscoamilográficos que pueden obtenerse a partir de la curva, los cuales se enumeran a continuación:

- ✓ Temperatura de empaste (T_e): temperatura a la cual comienza el aumento de la viscosidad debido al hinchamiento de los gránulos de almidón.
- ✓ Tiempo de empaste (t_e): tiempo en el cual comienza el aumento de la viscosidad.
- ✓ Viscosidad de pico (η_p): viscosidad máxima alcanzada durante el calentamiento isotérmico a 95 °C, se encuentra relacionada con la capacidad del almidón para ligar agua.
- ✓ Viscosidad mínima (η_{min}): viscosidad mínima registrada durante la etapa isotérmica a 95 °C, se encuentra relacionada con la tolerancia del almidón al esfuerzo de cizalla ejercido por la agitación y al calentamiento.

- ✓ Viscosidad final (η_f): viscosidad registrada al final del enfriamiento a 50 °C, se encuentra relacionada con la capacidad de gelificación del almidón.
- ✓ Inestabilidad o diferencia entre la viscosidad máxima y la mínima ($\eta_p - \eta_{min}$), se relaciona con la capacidad del almidón para resistir el calentamiento y el esfuerzo de corte.
- ✓ Asentamiento 1 o diferencia entre la viscosidad final y la mínima ($\eta_f - \eta_{min}$),
- ✓ Asentamiento 2 o diferencia entre la viscosidad final y la máxima ($\eta_f - \eta_p$), ambos asentamientos están relacionados con la tendencia a la retrogradación del almidón.

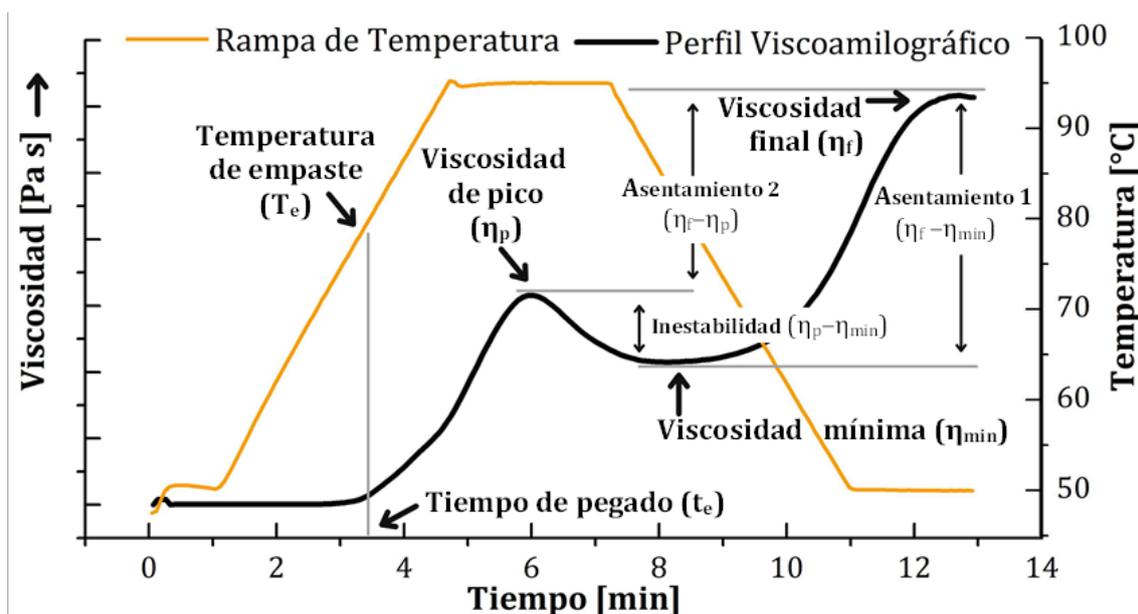


Figura 27. Ejemplo del perfil viscoamilográfico con rampa de calentamiento-isoterma y enfriamiento y los parámetros de empaste

Se evaluó el comportamiento viscoamilográfico de las materias primas (HA, AM y FM) y las premezclas (PControl, PHN10, PHN15 y PHN20) con un RVA 4500 (Perten Instruments, Sydney, Australia) utilizando el programa STD1 que se ajusta al método aprobado 76-21.01 (AACC, 2007). STD1 comprende los siguientes pasos:

1) temperatura inicial fijada a 50 °C con una homogenización a 960 rpm. 2) Mantenimiento a 50 °C durante 1 min 10 s con agitación a 160 rpm (agitación que se mantiene durante todo el ensayo). 3) Calentamiento hasta 95 °C durante 3 min 42 s. 4) Mantenimiento a 95 °C durante 2 min 30 s. 5) Enfriamiento hasta 50 °C durante 3 min 48 s y, por último, mantenimiento a 50 °C durante 2 min.

El ensayo consistió en pesar 3,0 g de muestra en un recipiente de aluminio y añadir 25,0 g de agua destilada (140 g/kg de base seca). Los componentes se mezclaron inmediatamente agitando verticalmente el agitador diez veces. A continuación, se colocó el recipiente en la posición de medición y se inició el programa STD1. Los parámetros de empaste se determinaron utilizando el software especializado Thermocline for Windows (TCW) v3.16.1. 387 (Perten Instruments, Sydney, Australia) suministrado con el instrumento. Cada muestra se analizó por triplicado.

4.3.4. Elaboración de los batidos

En una batidora planetaria Kenwood Major-1200W (Kenwood Ltd., Havant, Reino Unido) se batió el huevo reconstituido (velocidad 2 durante 30 segundos) y se añadieron la leche, el aceite y el agua (velocidad 2 hasta 2:30 min). Posteriormente, se añadieron en forma gradual los ingredientes sólidos (mezcla de harinas (HA, AM, FM), azúcar, sal y HPMC) (velocidad 2 hasta 6 min) y a continuación, se aumentó la velocidad a 3 hasta completar los 7:30 min de batido. En el caso del batido con harina de nuez, HN se humedeció con la mitad de la leche y se añadió junto con los ingredientes sólidos. Cada formulación de batido se preparó al menos por duplicado.

4.3.5. Distribución del tamaño de partícula del aceite en los batidos

Se utilizó un equipo Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) equipado con el accesorio Hydro 2000 MU (velocidad de la bomba: 2000 rpm) para evaluar la distribución del tamaño de partículas de aceite presentes en los batidos. Los batidos se suspendieron en agua destilada [100 mL/L H₂O] y se aplicó un tratamiento ultrasónico (desplazamiento ultrasónico 10 µm durante 10 s) para favorecer su dispersión. El tamaño de partícula se estimó en términos de D(0,5) (percentil 50) que se obtuvo a partir de la distribución ponderada en superficie utilizando el software Mastersizer 2000E (v5.54). El ensayo se realizó por duplicado.

4.3.6. Propiedades de hidratación de los batidos

4.3.6.1. Disponibilidad y contenido de agua

Actividad del agua (*a_w*): Las mediciones se realizaron a 25 °C en un equipo AquaLab (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EE.UU.). El ensayo se realizó por triplicado.

La determinación de humedad se realizó por secado en estufa (San Jor, San Martín, Argentina) a 105 °C hasta peso constante. El cálculo de la humedad de las muestras se realizó según la Ecuación 1. El ensayo se realizó por triplicado.

4.3.6.2. Relajación por resonancia magnética nuclear (¹H-RMN)

La resonancia magnética nuclear RMN es una de las mejores técnicas analíticas para evaluar la movilidad del agua dentro de una matriz. En este método, se aprovecha la cualidad de algunos núcleos de ser susceptibles a campos magnéticos externos. La medición por RMN implica dos fases: polarización y adquisición. En

primer lugar, los átomos de hidrógeno (protones de la muestra) se alinean en la dirección de un campo magnético estático externo (Figura 28a-b). En segundo lugar, los núcleos de hidrógeno (protones) son ladeados por una breve ráfaga de un pulso de radio frecuencia (RF) electromagnética (Figura 28c). Entonces, cuando se detiene la ráfaga de pulsos los protones tienden a volver a su estado de equilibrio alineándose nuevamente al campo magnético (Figura 28d).

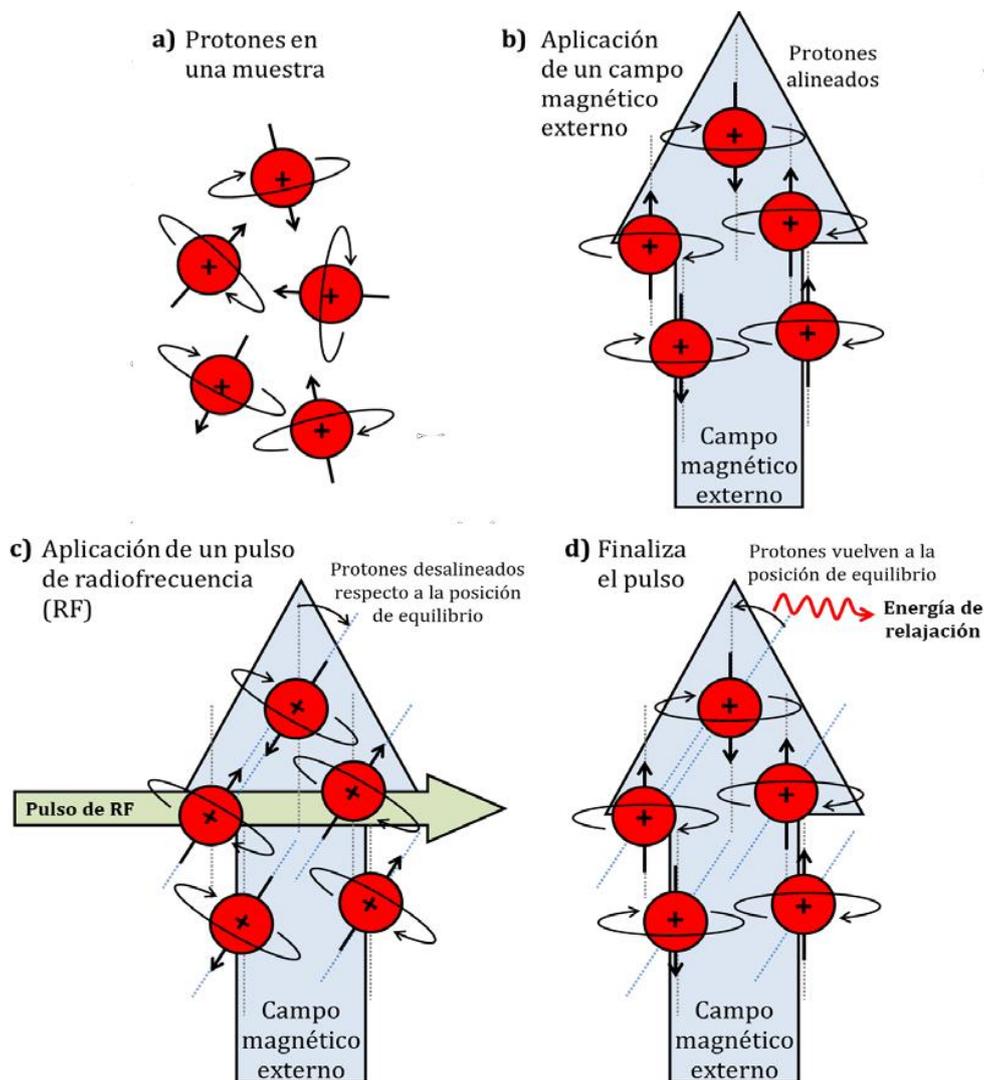


Figura 28. Explicación gráfica de las dos fases del H^1 -RMN. polarización (a-b) y adquisición (c-d). Fuente: (Arp, Ferrero y Correa, 2019)

Esta alineación genera una señal que es detectada por el espectrómetro. El proceso por el cual se recupera el estado de equilibrio mediante interacciones de

los núcleos con el entorno se conoce como relajación longitudinal (relajación espín-red) y está caracterizado por un tiempo T_1 , mientras que la relajación transversal, es decir la alineación debido a interacciones entre los mismos espines, se conoce como relajación transversal (relajación espín-espín) caracterizada por un tiempo T_2 . Estos tiempos de relajación (T_1 y T_2) describen la vía física por la que los núcleos alterados vuelven a su estado de equilibrio original (Garro Linck, 2016; Sacchi y Paolillo, 2007)

Los tiempos de relajación espín-espín ^1H (T_2) se determinaron con un espectrómetro MiniSpec pc120 de baja resolución (Bruker, Billerica, MA, EE.UU.) utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con un espaciado entre pulsos de 200 μs . Para ello, los batidos se prepararon por duplicado, y cada muestra se midió en varios tubos de RMN. Además, cada tubo se midió por duplicado, girándolo 90° entre las mediciones consecutivas (Carlos Gabriel Arp, Correa y Ferrero, 2018). Las curvas de relajación transversal se ajustaron con la siguiente ecuación exponencial (Ecuación 18):

$$I_{(t)} = I_o + \sum_i F_{Pi} \exp\left(-\frac{t}{T_{2i}}\right) \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde I_o es la intensidad de la señal de decaimiento residual, T_{2i} y F_{Pi} representan el tiempo de relajación y la fracción de protones que se relajan con el tiempo de espín T_{2i} , respectivamente.

En general, los tiempos de relajación (T_2) de los alimentos complejos presentan un comportamiento multicomponente, en el que los componentes individuales pueden interpretarse como representaciones de regiones con diferente movilidad de agua, que interactúan entre sí (Assifaoui et al., 2006).

4.3.7. Transiciones térmicas de los batidos por calorimetría diferencial de barrido

Cuando un alimento sufre variaciones térmicas (calentamiento o enfriamiento) sus constituyentes se ven alterados. Estas transiciones térmicas incluyen cambios de primer orden como la cristalización y fusión de agua, lípidos y azúcares, gelatinización y retrogradación del almidón, desnaturalización de proteínas y formación y disolución de complejos entre componentes. El cambio de segundo orden más analizado es la transición vítrea que ocurre en el sistema amorfo, cuando se separa (por congelación o evaporación) parte del agua que compone los alimentos (Larrosa, Califano y Zaritzky, 2014; Sandoval Aldana, Rodriguez-Sandoval y Fernandez Quintero, 2005).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés - Differential scanning calorimetry) es una técnica termoanalítica que permite monitorear los cambios en la energía térmica de una muestra. Para esto, en el calorímetro se someten simultáneamente, una cápsula conteniendo la muestra y una cápsula de referencia del mismo material vacía, a un barrido de temperatura entregando un determinado flujo de calor a cada una, de manera que la diferencia de temperatura entre ambas cápsulas sea nula. Cuando la muestra sufre transiciones térmicas, el equipo deberá entregar menor o mayor flujo de calor dependiendo de si las transiciones son exotérmicas o endotérmicas, respectivamente, para mantener la temperatura igual entre ambas cápsulas.

El calorímetro detecta y registra estas menores o mayores necesidades de flujo de calor (energía/tiempo) para generar el termograma correspondiente (Figura 29).

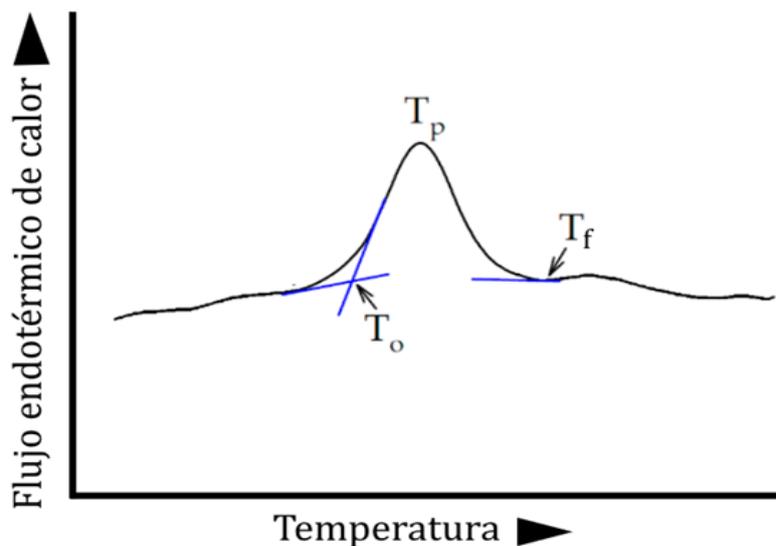


Figura 29. Representación de un termograma con temperaturas (T_o : onset, T_p : de pico y T_f : final). Adaptada de Bertrand y colaboradores (2019)

A partir de los termogramas es posible obtener información acerca de las transiciones térmicas de la muestra. Se considera como temperatura onset o T_o a la intercepción de dos líneas auxiliares (líneas azules en la Figura 29), en este caso, la línea auxiliar que pasa por la pendiente del pico y la línea extrapolada que sale de la línea base inicial. Asimismo, la temperatura de pico o T_p en la cual la transición se encuentra en su máxima extensión y por último la temperatura final o T_f cuando la transición finaliza. Igualmente importante es el cambio de entalpía asociado a la transición o ΔH que se obtiene de la integración del área y representa la cantidad de energía involucrada en el fenómeno.

Una transición térmica de interés es la transición vítrea, que es el paso de un estado termodinámico metaestable (estado vítreo), caracterizado por un alto grado de agregación y orden molecular, a otro estado termodinámico llamado estado gomoso o amorfo, donde las moléculas poseen mayor movilidad y, por lo tanto, menor estabilidad. Los alimentos son sistemas complejos con varios

componentes donde una determinada transición vítrea ocurre en un rango de temperaturas, por lo que se considera a la temperatura promedio como la temperatura de transición vítrea (T_g). Conocer el valor de T_g es relevante para poder predecir y controlar las condiciones óptimas de almacenamiento, con el fin de que esos alimentos mantengan al máximo sus características (Gutiérrez et al., 2014; Hui, 2006).

4.3.7.1. Transiciones de fase y estado de los batidos congelados

Las propiedades térmicas de los batidos se determinaron con un calorímetro de barrido diferencial DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.). Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada batido (sin polvo de hornear) en cápsulas herméticas de aluminio. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Las muestras se enfriaron de 5 a -50 °C a 5 °C/min, luego se mantuvieron isotérmicas durante 5 minutos, tras lo cual se calentaron hasta 10 °C a 5 °C/min. Se analizaron los termogramas durante el proceso de calentamiento utilizando el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.). En los batidos se evaluaron la transición vítrea (T_g), el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p), y las temperaturas de fusión del hielo (T_m , por melting) y del punto de congelación. Estas se tomaron como las temperaturas de inicio y pico, respectivamente (Ronda y Roos, 2008; Roos y Karel, 1991). Además, la fracción de agua congelada (F_{AC}) (g de hielo/kg de agua total) se obtuvo mediante la Ecuación 19

$$F_{AC} = \frac{\Delta H_f}{(\Delta H_{hielo} \cdot A_T)} \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde ΔH_f es la entalpía de fusión del hielo en el sistema de máxima concentración de congelación [J/kg de batido sólido], ΔH_{hielo} el calor latente de

fusión del hielo [333,9 J/g de hielo] y A_T es agua total en [kg de agua/kg de batido sólido].

4.3.7.2. Transiciones durante el calentamiento

Para las transiciones térmicas en la etapa de calentamiento se utilizó el mismo equipo y la misma cantidad de muestra detallada en la sección anterior (4.3.7.1). Los batidos se calentaron desde 10 °C hasta 160 °C a 10 °C/min. Los termogramas se analizaron con el programa Universal Analysis 2000 (TA Instruments-LLC Waters, EE.UU.). Se determinaron las temperaturas de inicio (T_0), de pico (T_p) y final (T_f) y las entalpías (ΔH) de gelatinización del almidón y de disociación del complejo amilosa-lípido. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

4.3.8. Características texturales de los batidos

Las características texturales de los batidos se estudiaron a través de un ensayo de compresión denominado back-extrusion o retro-extrusión debido a que el alimento se mueve en la dirección opuesta a la del émbolo o sonda. El ensayo consiste en aplicar una fuerza a un alimento hasta que éste fluye a través de una salida, generalmente el espacio libre entre la sonda y las paredes del recipiente contenedor. El alimento se comprime hasta que su estructura se rompe y este extrude a través del espacio libre. Por lo general, se determina la fuerza máxima necesaria para lograr la extrusión y se utiliza como índice de la calidad de la textura. Este tipo de prueba se utiliza en líquidos viscosos, geles, grasas y frutas y verduras frescas y procesadas (Bourne, 2002a; Osorio y Steffe, 1987).

La Figura 30 muestra una representación de un típico ensayo de back-extrusion. El batido es colocado en el recipiente contenedor y se sitúa el mismo

bajo la sonda, cuidando que esta quede concéntricamente ubicada dentro del recipiente, para que el ancho del espacio libre sea uniforme (Figura 30a). Cuando la sonda descende y comprime al batido este empieza a fluir y va perdiendo burbujas de aire (Figura 30b). La fase final (Figura 30c) muestra el momento de la extrusión *per se*, donde el batido se ve forzado a extrudir por el espacio libre.

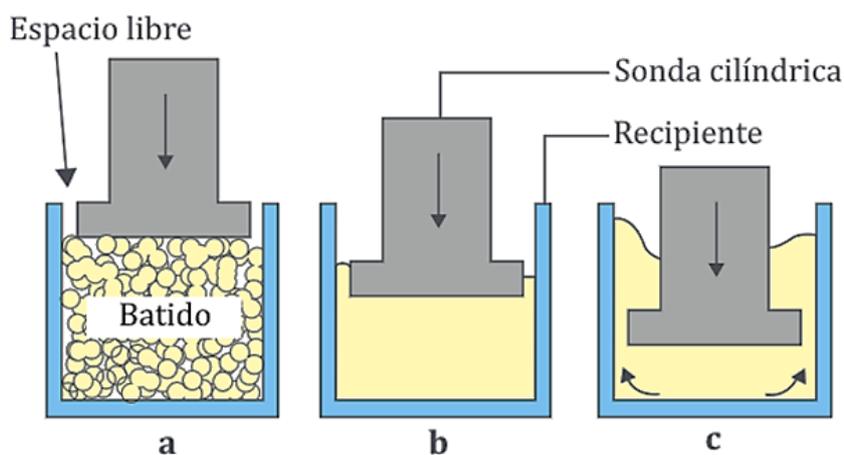


Figura 30. Representación del ensayo back extrusion. a) la sonda descende y toma contacto con el alimento (batido), b) la sonda lo comprime y c) el batido se extrude por el espacio libre. Adaptado de (Bourne, 2002a)

Los ensayos de back extrusión se realizaron según Cevoli et al. (2013) con algunas modificaciones menores. Se empleó un analizador de textura TAXT-2i (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido) con una célula de carga de 5 N. El batido se vertió en un recipiente cilíndrico (53,3 mm de diámetro interior) y se usó con una sonda cilíndrica (10 mm de altura, 45 mm de ancho) a 24 ± 1 °C. La prueba se realizó a una velocidad previa y posterior de 2,5 mm/s, una velocidad de prueba de 1 mm/s, una distancia de 10 mm y una fuerza de disparo de 0,5 N. A partir de la curva (Figura 31) se determinaron los siguientes parámetros: firmeza {fuerza positiva máxima [N]}, índice de consistencia {área positiva de la curva [N·s]},

índice de viscosidad {área negativa de la curva [N·s]} y cohesividad {fuerza negativa máxima [N]}.

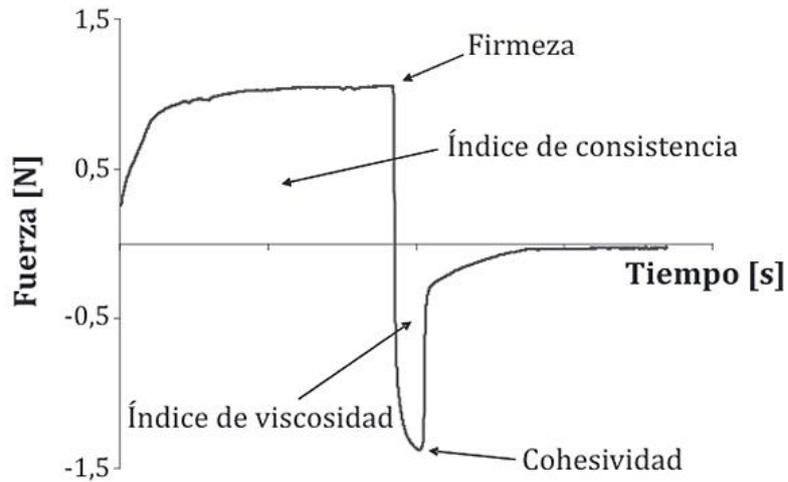


Figura 31. Curva típica de back extrusion con sus respectivos parámetros. Adaptada de Cevoli y colaboradores (2013)

4.3.9. Comportamiento reológico de los batidos

4.3.9.1. Ensayos dinámicos

Se realizaron ensayos dinámicos oscilatorios en un reómetro AR G2 (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.) con geometría de placas paralelas (separación de 1 mm, diámetro de 40 mm). En primer lugar, se realizaron barridos de esfuerzo (σ) en el rango entre 0,01 y 100 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz y 25 °C para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL) de cada batido. El rango de viscoelasticidad lineal se determinó a partir de la curva del módulo elástico (G') en función del esfuerzo. Así, se definió el esfuerzo crítico (σ_c) (límite superior del RVL) como aquel en el cual se produce una disminución del 5 % de G' máximo, (G'_c). A su vez, a partir del G'_c se determinó la deformación crítica (γ_c) y se calculó la energía cohesiva (E_c) como:

$$E_c = 1/2 G'_c \cdot \gamma_c \quad \text{Ecuación 20}$$

Posteriormente, se realizaron barridos de frecuencia (de 0,1 a 100 Hz) a 0,2 Pa dentro del RVL. A partir del espectro mecánico se obtuvieron los módulos de almacenamiento (G'), de pérdida (G'') y complejo (G^*) en función de la frecuencia.

El módulo complejo dinámico G^* se ajustó al modelo del gel débil propuesto por Gabriele y colaboradores (2001) (Ecuación 21). En este enfoque, se supone que el sistema alimentario es una red tridimensional compuesta por unidades de flujo que interactúan cooperativamente.

$$G^*(\omega) = \sqrt{G'(\omega)^2 + G''(\omega)^2} = A_F \omega^{1/z} \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde z es el grado de coordinación y A_F representa la fuerza de las interacciones entre las unidades de flujo (Gabriele, de Cindio y D'Antona, 2001). Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

4.3.9.2. Caracterización termo-reológica de los batidos

Con la finalidad de estudiar el cambio en las propiedades reológicas de los batidos durante el proceso de cocción se realizaron barridos de temperatura desde 25 a 90 °C a 5 °C/min a 1 Hz y esfuerzo constante (0,2 Pa) dentro de la región viscoelástica lineal utilizando un reómetro AR-G2 (TA Instruments-LLC Waters, EE.UU.) con geometría de placas paralelas (separación de 1 mm, diámetro de 40 mm). La temperatura de la placa inferior se controló con un sistema Peltier, y la evaporación de la muestra se evitó utilizando una cubierta con trampa de disolvente. Cada muestra se analizó al menos por duplicado.

4.3.10. Microestructura de las harinas y batidos por microscopía láser confocal de barrido

Con el objetivo de observar la localización de los mayores componentes de la harina de arroz, el almidón de maíz, la fécula de mandioca y de los batidos e hipotetizar posibles interacciones, se realizó una observación microscópica de los mismos. Se empleó microscopía láser confocal de barrido (CSLM, por sus siglas en inglés) dado que la utilización combinada de más de un fluoróforo permite determinar la localización de diferentes componentes, además, de que necesita una mínima preparación de las muestras, minimizando de este modo la introducción de posibles artefactos. Asimismo, CSLM permite la observación de muestras con alto contenido de humedad y por las características del microscopio, es posible alcanzar una alta definición de las imágenes en preparados no tan delgados, lo cual no siempre es fácil de obtener. Se emplearon los siguientes cuatro fluoróforos: rodamina B [10 mg/L], calcoflúor white [0,1 g/L], isotiocianato de fluoresceína (FITC) [0,1 g/L] y rojo nilo (NR) [1 g/L]. El FITC y el NR no se utilizaron juntos debido a que absorben y emiten a las mismas longitudes de onda. Las longitudes de onda de excitación usadas fueron 488 nm, 568 nm y 347 nm, y las de emisión 518 nm, 625 nm y 450 nm para (FITC y NR), rodamina B y calcoflúor white, respectivamente (Burbano, Cabezas y Correa, 2022).

Cada muestra se extendió sobre un portaobjetos de vidrio utilizando un segundo portaobjetos y luego se añadió la solución que contenía los fluoróforos. Las muestras se dejaron reposar durante una hora en la oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. A continuación, se observaron todas las muestras con un microscopio

confocal FV1000 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón). Cada muestra se preparó por duplicado, se realizaron observaciones de diferentes campos y de cada extendido se tomaron al menos cuatro micrográficas a 4x y 20x. Antes de realizar la observación de las muestras teñidas, se verificó que los batidos sin tinción no mostraran autofluorescencia.

4.3.11. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba LSD para determinar la existencia de medias estadísticamente diferentes ($\alpha: 0,05$). Todas las pruebas se realizaron con el programa Statgraphics - Centurion - XVII Versión-17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc, EE.UU.). El ajuste de los datos a sus respectivos modelos ($^1\text{H-RMN}$ a la Ecuación 18) y (datos reológicos a la Ecuación 21), así como la comparación entre conjuntos de datos (prueba F) se realizaron con OriginPro8 v8.0724 (OriginLab Corporation, EE.UU.).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Propiedades de empaste de las premezclas

Cuando los alimentos ricos en almidón, en exceso de agua, se calientan y luego se enfrían, el almidón experimenta una serie de cambios fisicoquímicos que pueden ser caracterizados mediante un viscoamilográfico rápido. En este equipo la muestra es sometida a un calentamiento y enfriamiento controlados mientras se ejerce un trabajo mecánico constante y se registra el incremento de la viscosidad del sistema durante dicho proceso. Al comenzar el ensayo, la muestra es sometida a una rampa de calentamiento desde 50 hasta 95 °C, lo que da lugar al incremento de la viscosidad debido al hinchamiento de los gránulos de almidón. Posteriormente, debido a la agitación continua y al calentamiento, comienza a salir amilosa desde los gránulos lo que da lugar a un incremento aún mayor de la viscosidad. Así, se alcanza la viscosidad máxima debido a la presencia de gránulos de almidón hidratados en un medio rico en amilosa. El mantenimiento de estas condiciones de agitación y calentamiento, da lugar a la ruptura de más gránulos de almidón y a la consecuente caída de la viscosidad. Finalmente, la pasta es enfriada hasta 50 °C, lo que da lugar al alineamiento de las cadenas de amilosa y formación de un gel con fragmentos de gránulos de almidón insertos. La viscosidad final alcanzada dependerá de las características de los almidones estudiados.

Los perfiles viscoamilográficos de las materias primas y las premezclas se muestran en la Figura 32. El contenido de almidón de la harina de nuez (HN) es muy bajo como para exhibir un perfil típico. Por el contrario, la suspensión de HN mantuvo una viscosidad constante en torno a 0,012 Pa-s durante toda la prueba (no se muestra en la figura).

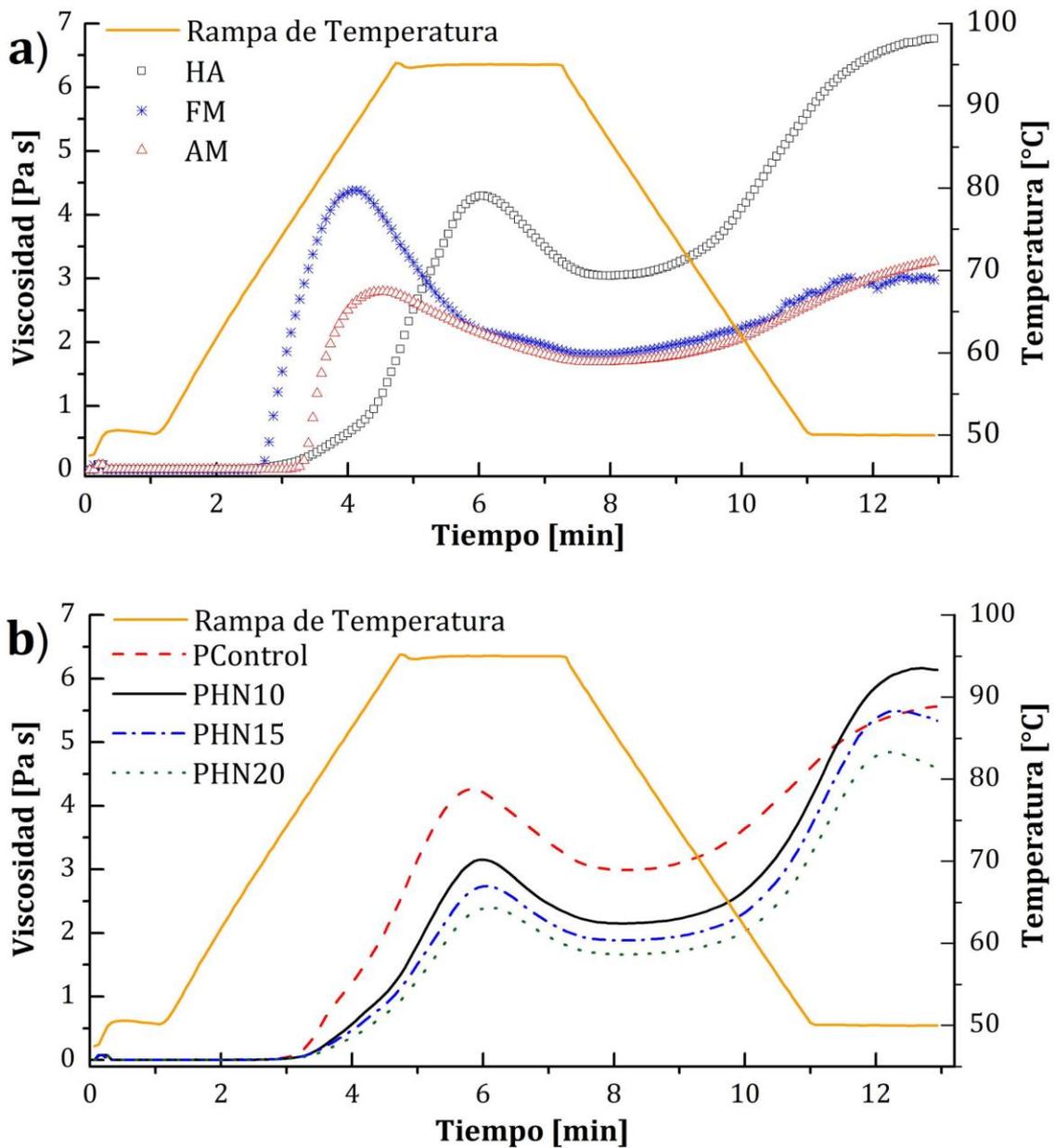


Figura 32. Perfiles viscoamilográficos de a) las materias primas: harina de arroz (HA), fécula de mandioca (FM) y almidón de maíz (AM) y b) las premezclas: control (PControl) y con harina de nuez (PHN). Premezcla control: HA (0,7 kg), FM (0,15 kg) y AM (0,15 kg). Niveles de adición de harina de nuez en las pemezclas: 10, 15 y 20 % de harina de nuez en base a la premezcla control (PHN10, PHN15 y PHN20, respectivamente)

La harina de arroz (HA), la fécula de mandioca (FM) y el almidón de maíz (AM) mostraron un perfil típico de empaste (Figura 32 a). Sin embargo, hubo diferencias

significativas en sus comportamientos debido a su diferente composición y naturaleza de sus gránulos de almidón: diferente tamaño y distribución de tamaño así como también contenido de amilosa y amilopectina. La agitación y el aumento de la temperatura provocaron un aumento de la viscosidad debido al hinchamiento de los gránulos. La viscosidad máxima (Tabla 12) para HA, FM y AM fue de $4,31 \pm 0,02$, $4,39 \pm 0,02$ y $2,80 \pm 0,06$ Pa×s, respectivamente. Además, la fécula de mandioca y el almidón de maíz desarrollaron su pico de viscosidad antes que la harina de arroz, como muestra el tiempo de empaste (Tabla 12). Después de eso, la viscosidad cayó porque con la agitación y el calentamiento constantes, más gránulos se rompen y fragmentan (Bao y Bergman, 2018)

Tabla 12. Parámetros de empaste de las materias primas

	T _e [°C]	t _e [min]	Viscosidades [Pa×s]		
			η _p	η _{min}	η _f
HA	76,3±0,6 ^b	6,07±0,09 ^c	4,31±0,02 ^b	3,04±0,05 ^c	6,76±0,07 ^c
FM	70,6±0,5 ^a	4,13±0,07 ^a	4,39±0,02 ^c	1,81±0,03 ^b	2,98±0,08 ^a
AM	77,6±0,1 ^c	4,53±0,00 ^b	2,80±0,06 ^a	1,69±0,01 ^a	3,27±0,09 ^b
Parámetros secundarios [Pa×s]					
	η _p - η _{min}		η _f - η _{min}		η _f - η _p
HA	1,26±0,07 ^b		3,7±0,1 ^c		2,45±0,05 ^c
FM	2,58±0,04 ^c		1,17±0,09 ^a		-1,4±0,1 ^a
AM	1,11±0,07 ^a		1,58±0,1 ^b		0,47±0,04 ^b

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$; $n = 3$). AM: almidón de maíz, FM: fécula de mandioca, HA: harina de arroz, T_e: temperatura de empaste, t_e: tiempo de empaste. η_p: viscosidad de pico, η_{min}: viscosidad mínima y η_f: viscosidad final.

Al enfriarse, HA y AM mostraron un aumento de la viscosidad final con respecto a la viscosidad máxima (Viscosidades finales: FM: $2,98 \pm 0,08$, AM: $3,27 \pm$

0,09 y HA: $6,76 \pm 0,07$ Pa×s). Este comportamiento condujo a valores de asentamiento 2 ($\eta_f - \eta_p$) más altos para HA ($2,45 \pm 0,05$ Pa×s) y AM ($0,47 \pm 0,04$ Pa×s) que para FM ($-1,4 \pm 0,1$ Pa×s). El valor de viscosidad final está asociado a la formación de un gel por la amilosa retrogradada (Balet et al., 2019). Estos resultados mostraron que la amilosa de la harina de arroz tiene una mayor tendencia a retrogradar (Kaur et al., 2007).

La premezcla control estaba compuesta por HA (0,70 kg), AM (0,15 kg) y FM (0,15 kg) y su comportamiento de empaste fue una clara combinación de sus componentes (Figura 32 b). Cuando se añadió HN, las premezclas tuvieron un inicio de empaste más tardío, lo que se reflejó en el aumento del tiempo de empaste (Figura 32 b). Además, la temperatura de empaste aumentó junto con el contenido de HN (Tabla 13). Asimismo, las viscosidades máxima y mínima y la inestabilidad disminuyeron significativamente con la adición de HN. Este efecto podría estar relacionado con una mayor resistencia al calentamiento y al esfuerzo de cizalladura de estas premezclas en presencia de HN debido a un hinchamiento restringido de los gránulos de almidón, combinado con un efecto de dilución del contenido total de almidón (Burbano y Correa, 2021; Fu et al., 2020)

Por lo demás, al enfriar, los altos valores de viscosidad final de todas las muestras indican la formación de una red tipo gel (Bao y Bergman, 2018). Igualmente, la viscosidad final aumentó al comparar el control con el PHN10, pero una mayor adición de HN dio lugar a menores valores de viscosidad. Por último, los valores de los asentamientos 1 y 2 aumentaron en las muestras con HN. En las muestras formadas sólo por almidones, este comportamiento evidencia una mayor tendencia a retrogradar. Pero en las muestras con lípidos, este incremento de los

asentamientos también podría ser un indicador de la formación del complejo amilosa-lípido (Gelders, Goesaert y Delcour, 2006; Okumus et al., 2018) o podría estar relacionado con la fusión y resolidificación de los lípidos durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento del RVA (Ai, Hasjim y Jane, 2013).

Tabla 13. Parámetros de empaste de las premezclas con harina de nuez

	T_e [°C]	t_e [min]	Viscosidades [Pa×s]		
			η_p	η_{min}	η_f
PControl	75,6±0,4 ^a	5,82±0,04 ^a	4,26±0,05 ^c	2,99±0,06 ^c	5,57±0,04 ^{bc}
PHN10	78,27±0,03 ^{ab}	5,98±0,04 ^{ab}	3,16±0,03 ^{bc}	2,15±0,02 ^{bc}	6,14±0,06 ^c
PHN15	78,23±0,04 ^{ab}	6,04±0,04 ^b	2,74±0,03 ^{ab}	1,88±0,03 ^{ab}	5,34±0,08 ^{ab}
PHN20	79,08±0,06 ^b	6,11±0,04 ^b	2,40±0,02 ^a	1,66±0,02 ^a	4,59±0,06 ^a
	Parámetros secundarios [Pa×s]				
	$\eta_p - \eta_{min}$		$\eta_f - \eta_{min}$		$\eta_f - \eta_p$
PControl	1,27±0,03 ^c		2,58±0,04 ^a		1,30±0,00 ^a
PHN10	1,01±0,03 ^{bc}		3,99±0,04 ^c		2,98±0,04 ^c
PHN15	0,86±0,01 ^{ab}		3,45±0,05 ^{bc}		2,60±0,05 ^{bc}
PHN20	0,74±0,01 ^a		2,93±0,05 ^{ab}		2,19±0,05 ^{ab}

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$; $n = 3$). T_e : temperatura de empaste, t_e : tiempo de empaste, η_p : viscosidad de pico, η_{min} : viscosidad mínima y η_f : viscosidad final.

4.4.2. Distribución de tamaño de partícula de la fase lipídica en los batidos

Los batidos para la preparación de budines son sistemas complejos ya que están formados por burbujas de aire dispersas en una fase acuosa (espuma) y, simultáneamente, por gotas de aceite dispersas en esta fase acuosa continua (emulsión). Ambos tipos de sistemas, espumas y emulsiones, son termodinámicamente inestables y se desestabilizan principalmente por los mismos

procesos (Langevin, 2019). Asimismo, todos aquellos factores que contribuyan a estabilizarlos, ayudarán a mantener la matriz de los batidos estables en el tiempo (Sumnu y Sahin, 2008).

Con la finalidad de evaluar el impacto ocasionado por la adición de harina de nuez en la distribución de la fase lipídica en la matriz de los batidos, se determinó la distribución del tamaño de partícula de las gotas de aceite encontradas en los batidos, la cual se muestra en la Figura 33. Además, se añadió la distribución del tamaño de las partículas de la HN para evaluar más fácilmente el papel de la HN. Todos los batidos presentaron dos poblaciones de gotas pero las presentadas en el batido control fueron más grandes, lo que se refleja en el valor $D(0,5)$ o mediana. El $D(0,5)$ indica el tamaño de partícula en el cual el 50% de la población de gotas presentan un tamaño mayor a este valor y el otro 50% de la población presentan tamaños inferiores. Para la muestra control el $D(0,5)$ fue $6,869 \mu\text{m}$, mientras que en el caso de los batidos con HN se observó un cambio significativo hacia valores de $D(0,5)$ más bajos ($2,729 \mu\text{m}$ - $3,481 \mu\text{m}$). Así pues, la HN contribuyó a la obtención de gotas de aceite de menor tamaño, lo que podría contribuir a una mejor dispersión de los lípidos y a una mayor homogeneidad de la matriz del batido. Este diferente patrón de gotas se observa en las micrografías CSLM, teñidas con rojo Nilo, incluidas en la Figura 33. La presencia de gotas de menor tamaño contribuiría a una mayor estabilidad de la emulsión, ya que las gotas de aceite de mayor tamaño tienden a desestabilizar las emulsiones por coalescencia. Cuando las gotas son más grandes, son más propensas a colisionar y las fuerzas de atracción que intervienen en la colisión son mayores (McClements, 2015). Por lo tanto, la HN constituiría una alternativa natural para mejorar la estabilidad de la emulsión del batido.

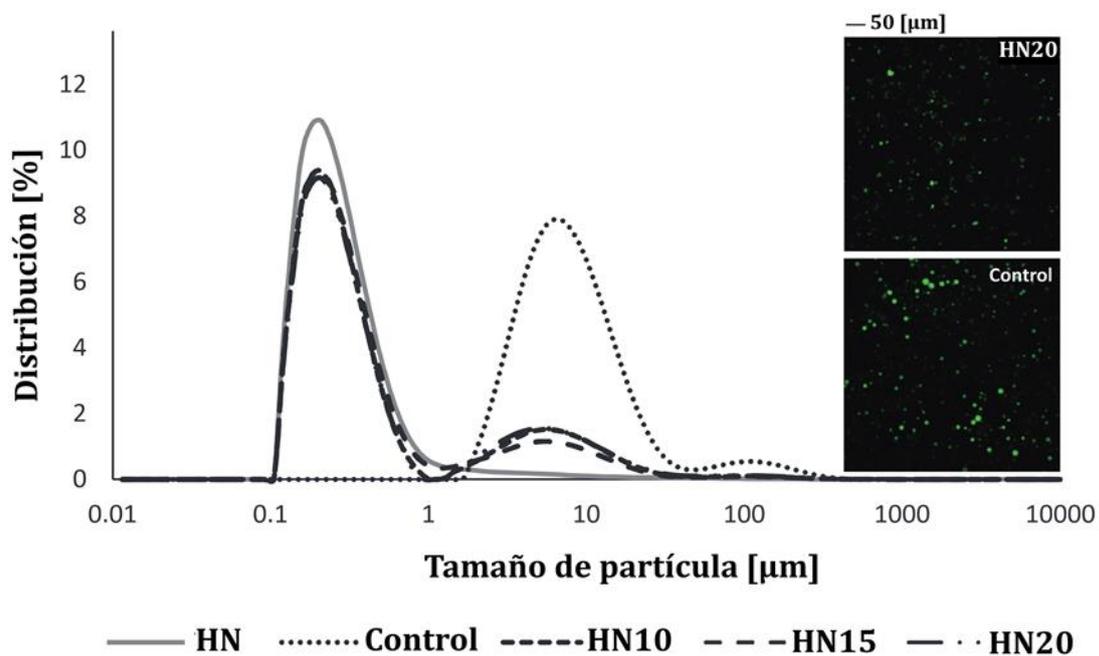


Figura 33. Distribución de tamaño de las partículas de HN y de las gotas de aceite en los batidos. Las micrografías de microscopía láser confocal de barrido corresponden al batido control y al HN20 teñido con rojo Nilo (20X). — HNControl -----HN10 - - - HN15 — · · HN20

4.4.3. Propiedades de hidratación de los batidos

4.4.3.1. Disponibilidad y contenido de agua

La Tabla 14

Tabla 14 muestra el contenido de agua y la actividad acuosa de los batidos. Dichos parámetros, no presentaron variaciones importantes debido a la presencia de HN. El contenido de humedad del batido control fue de $40,31 \pm 0,08$ [g agua/100 g batido], este parámetro disminuyó ligeramente hasta $39,2 \pm 0,2$ cuando se añadió HN al 20 %. De igual modo, aunque en la actividad acuosa se encontraron diferencias significativas respecto al control, las mismas no presentan implicancia

práctica. Encontrándose la actividad acuosa de todas las formulaciones en el rango 0,959-0,963.

Tabla 14. Disponibilidad de agua en los batidos: actividad de agua (*aw*) y contenido de humedad

	<i>aw</i>	Contenido de humedad [g agua/100 g batido]
Control	0,963±0,002 ^c	40,31±0,08 ^c
HN10	0,962±0,001 ^{bc}	39,99±0,05 ^c
HN15	0,960±0,001 ^{ab}	39,6±0,2 ^b
HN20	0,959±0,001 ^a	39,2±0,2 ^a

Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n=7$ y $n=3$ para *aw* y contenido de humedad, respectivamente).

4.4.3.2. Relajación por resonancia magnética nuclear (¹H-RMN)

Los ensayos de relajación por ¹H-RMN pueden emplearse para evaluar la movilidad molecular de los sistemas. Así, se han utilizado por varios autores para estudiar la movilidad del agua presente en masa y miga de pan (Carlos Gabriel Arp, Correa y Ferrero, 2018; Blanchard et al., 2012; Hager, Bosmans y Delcour, 2014).

Las curvas de relajación transversal obtenidas a partir de una secuencia CPMG se ajustaron con una ecuación de decaimiento exponencial (Ecuación 18). Se probaron ecuaciones de uno a cuatro términos exponenciales, pero todas las formulaciones mostraron el mejor ajuste cuando se utilizaron ecuaciones de un solo término (todos los conjuntos de datos presentaron R² que oscilaron entre 0,9663 y 0,9913). El número de términos en la ecuación está relacionado con las poblaciones de agua con diferente movilidad en el sistema (Assifaoui et al., 2006). Por lo tanto, en este caso sólo se encontró una población. La Tabla 15 muestra los

parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de relajación $^1\text{H-RMN}$ para los batidos con harina de nuez.

Tabla 15. Parámetros de los ensayos de relajación $^1\text{H-RMN}$ de los batidos con harina de nuez

	Parámetros $^1\text{H-RMN}$ de los batidos		
	I_0	F_p	T_2 [ms]
Control	0,38±0,02 ^b	0,40±0,01 ^a	19±1 ^c
HN10	0,36±0,02 ^b	0,45±0,01 ^b	16,7±0,5 ^b
HN15	0,34±0,01 ^a	0,44±0,01 ^b	16,2±0,9 ^b
HN20	0,35±0,01 ^a	0,47±0,01 ^c	14,3±0,9 ^a

F_p : fracción de protones en relajación. I_0 : intensidad de la señal de decaimiento residual. T_2 : tiempo de relajación. Promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n=9$).

La adición de HN aumentó la fracción de protones (F_p) afectados por el campo magnético durante el ensayo, incrementándose desde $0,40 \pm 0,01$ para el control hasta $0,47 \pm 0,01$ para HN20. Por lo demás, los tiempos de relajación describen la movilidad de los protones del agua en la matriz del batido, siendo los valores más bajos relacionados con una menor movilidad. Al disminuir la cantidad de agua más móvil, el tiempo de relajación spin-spin también disminuyó. Como se esperaba, HN20 tuvo el menor tiempo de relajación. De manera similar, Doona & Baik (2007) encontraron una reducción del T_2 en la masa de trigo cuando el contenido de humedad disminuyó de 47,2 g de humedad/100 g de masa ($T_2 = 10$ ms) a 33,1 g de humedad/100 g de masa ($T_2 = 3$ ms). Asimismo, la disponibilidad de agua representada por la actividad del agua también disminuyó con la adición de HN. Las proteínas y la fibra de la HN podrían ligar el agua de los batidos, provocando la reducción de T_2 y a_w al aumentar la concentración de HN.

4.4.4. Transiciones térmicas de los batidos por DSC

Se estudiaron las transiciones térmicas experimentadas por los batidos durante el congelamiento y calentamiento con la finalidad de obtener información acerca de posibles interacciones entre los componentes de los batidos y del comportamiento que experimentarán los mismos durante la cocción. A modo de ejemplo, en la Figura 34 se muestran las distintas transiciones experimentadas por el batido HN20 al ser calentado desde $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, se utilizó la derivada del flujo de calor para establecer el rango en el que las transiciones se produjeron.

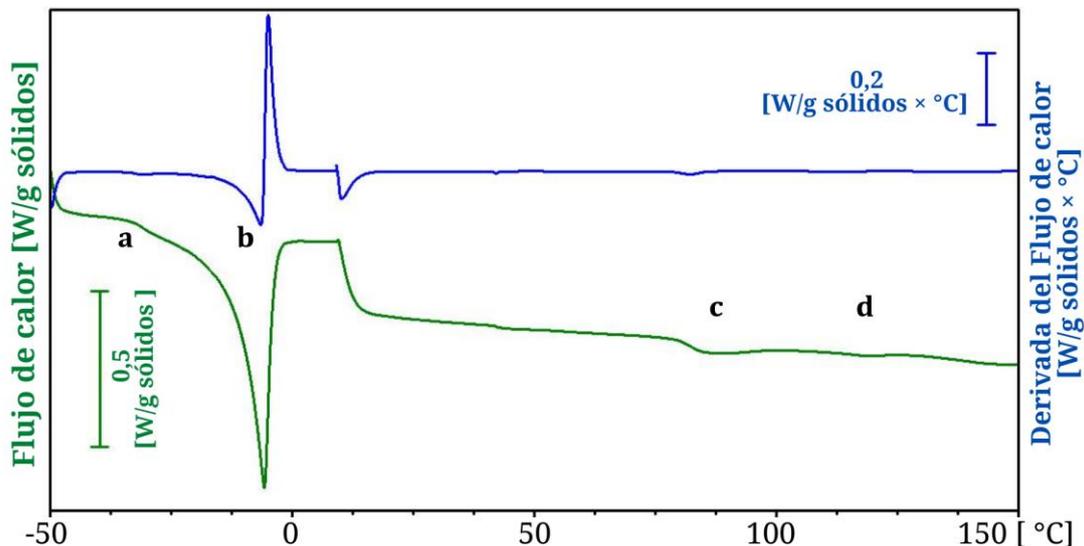


Figura 34. Termograma por DSC del batido HN20. a: transición vítrea (T_g), b: fusión de hielo, c: gelatinización de almidón y d: disociación del complejo amilosa lípido

4.4.4.1. Transiciones de fase durante el congelamiento

El estudio de las transiciones térmicas experimentadas por los batidos durante el congelamiento por DSC se realizó con el objetivo de obtener información acerca de la movilidad molecular en los batidos. La movilidad molecular se ve afectada por la temperatura, el grado de hidratación y las transiciones de fase y estado (transición vítrea, fusión, entre otras) (Roudaut et al., 2004; Sansano et al., 2018).

En este ensayo, los batidos se congelaron hasta $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego durante el calentamiento se evaluaron la transición vítrea y la fusión del hielo (Figura 35).

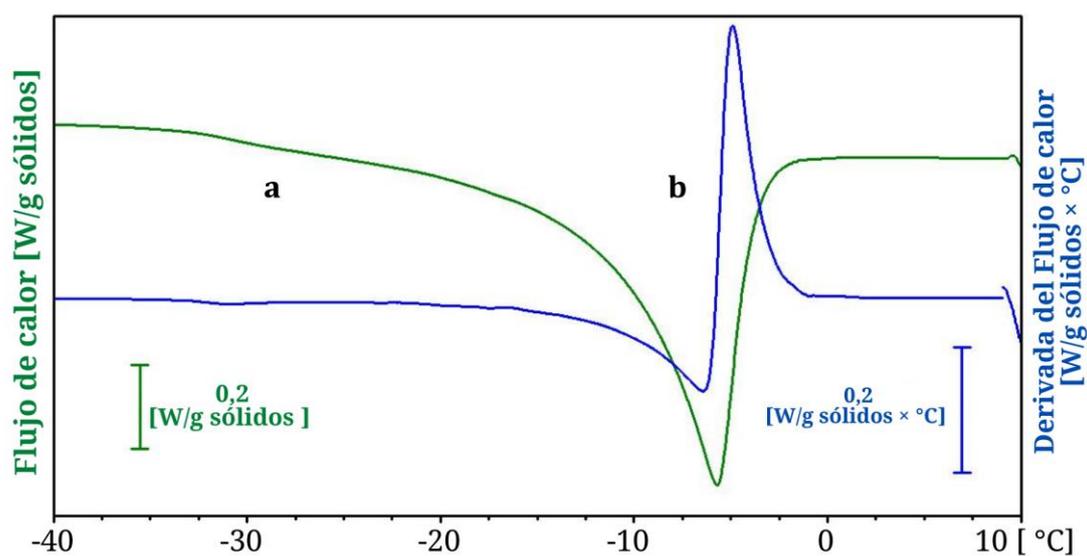


Figura 35. Termograma en la zona de congelamiento del batido HN20. a: transición vítrea (T_g) y b: fusión del hielo

La transición vítrea es una transición de segundo orden que involucra el pasaje de un estado de sólido amorfo (vítrea) a un estado gomoso de mayor movilidad e involucra un cambio en la capacidad calorífica del sistema. El estudio de la transición vítrea es importante tanto para la caracterización de un material como para evaluar su estabilidad frente al almacenamiento. A temperaturas superiores a T_g la movilidad molecular es suficiente como para que ocurran cambios dependientes de la difusión molecular. Mientras que a temperaturas inferiores a T_g , el material es altamente viscoso y los movimientos moleculares se encuentran muy restringidos (Roos, 1995).

En los batidos, la transición vítrea no se vio afectada por la adición de HN y adicionalmente el cambio en la capacidad calorífica, ΔC_p , fue cercano a $0,47 \pm 0,03$ $\text{J/g sólidos } ^{\circ}\text{C}$ para todas las muestras. Del mismo modo, ni las temperaturas de

fusión ni el punto de congelación se vieron afectados por la adición de HN (Tabla 16).

Tabla 16. Temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión del hielo y agua congelable de los batidos

	T_g [°C]	T_m [°C]	F_{AC} [g hielo/100 g agua total]
Control	-30,1±0,4 ^a	-10,4±0,2 ^a	39,5±1,8 ^b
HN10	-30,5±0,4 ^a	-10,4±0,3 ^a	36,6±0,6 ^{ab}
HN15	-30,5±0,5 ^a	-10,2±0,1 ^a	32,5±1,5 ^a
HN20	-30,5±0,9 ^a	-10,3±0,2 ^a	21,2±1,3 ^a

Control, HN10, HN15 y HN20 contienen 0, 10, 15 y 20 g de harina de nuez/100 g de mezcla de harina. Mezcla de harina: harina de arroz (0,70 kg), fécula de mandioca (0,15 kg) y almidón de maíz (0,15 kg). Media ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 3$). F_{AC}: agua congelable, T_g: Temperatura de transición vítrea y T_m: Temperatura de fusión del hielo.

Las temperaturas de congelación estuvieron en el rango de -5,6 °C a -5,2 °C. Sin embargo, el agua congelable (g de hielo/100 g de agua total) disminuyó con el aumento de los niveles de HN de 39,5 ± 1,8 para el control a 21,2 ± 1,3 para HN20 (Tabla 16). Estos resultados concuerdan con la reducción de T₂ y *aw* en los batidos. La HN aportó componentes que interactúan con el agua reduciendo su disponibilidad para la congelación. El mismo comportamiento fue observado por Sciarini (2011) cuando se añadió harina de soja a los batidos de harinas de arroz y maíz. El mantenimiento de la T_g, al tener una menor cantidad de agua congelable, parece ser contradictorio. Sin embargo, cabe destacar que los batidos presentaron una composición diferente: disminuyendo el contenido de almidón y aumentando el de proteína y fibra a medida que aumenta el nivel de HN. Así, las diferentes características de composición de los batidos explicarían que todas las formulaciones presentaran el mismo valor de T_g. La transición vítrea presenta relevancia desde el punto de vista tecnológico ya que está relacionada con la estabilidad de un producto, siendo las temperaturas por debajo de T_g adecuadas

para el almacenamiento (Wang & Zhou, 2017). En este caso en particular, los valores de T_g hallados muestran que sería dificultoso realizar un almacenamiento de los batidos. Sin embargo, dado que en el caso de las masas sin gluten, el almacenamiento congelado no ha sido ampliamente estudiado, este podría representar una manera de añadir valor y ofrecer a los consumidores productos frescos en cualquier momento. Así, esta práctica común en los productos a base de trigo podría llegar a aumentar con el tiempo también en los productos sin gluten (Mezaize et al., 2010; Ozkoc y Seyhun, 2015).

4.4.4.2. Transiciones térmicas durante el calentamiento

Durante el calentamiento, el ensayo en el DSC proporciona información sobre las transiciones térmicas que se producen en el sistema cuando el batido se convierte en miga (Figura 36).

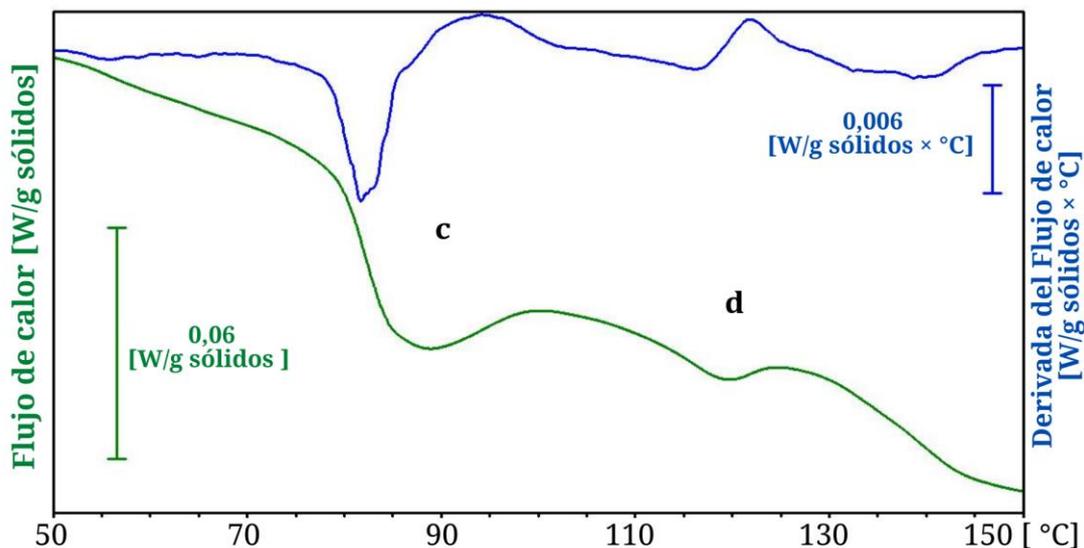


Figura 36. Termograma en la zona de calentamiento del batido HN20. c: gelatinización del almidón y d: disociación del complejo amilosa lípido

A su vez, la Tabla 17 muestra las temperaturas de onset, pico y final de la gelatinización. Sólo la temperatura final fue estadísticamente diferente entre el

control y las muestras con harina de nuez. Sin embargo, el rango de temperaturas fue consistente con los reportados previamente por Goranova et al. (2019). Si bien durante el calentamiento se producen varios procesos, por ejemplo, la desnaturalización de las proteínas, la reacción de Maillard y la gelatinización del almidón, este último es el principal en estos sistemas.

Tabla 17. Parámetros de gelatinización del almidón de los batidos sin gluten

	Temperaturas [°C]				Entalpía de gelatinización ΔH_{gel} *
	T_o	T_p	T_f	ΔT	
Control	79,5±0,5 ^a	85,0±0,8 ^a	111,0±0,9 ^b	31±1 ^b	6,1±0,3 ^c
HN10	80,4±0,9 ^a	85,7±0,9 ^a	105±2 ^a	24±2 ^a	5,3±0,1 ^b
HN15	79,9±0,7 ^a	85,9±0,6 ^a	105±1 ^a	25±2 ^a	3,6±0,2 ^a
HN20	79,1±0,6 ^a	86±1 ^a	103,7±0,5 ^a	25±1 ^a	3,4±0,1 ^a

Promedio± desvío estándar, Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 3$). T_o : Temperatura de onset, T_p : Temperatura de pico, T_f : Temperatura final, * [$J \cdot g^{-1}$ sólidos].

La entalpía de gelatinización disminuyó al aumentar la adición de HN debido a la reducción del contenido de almidón de los batidos y a la menor disponibilidad de agua (Tabla 17). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Sabanis et al. (2009) sobre pan libre de gluten con fibra cereal.

Por otra parte, el almidón y los lípidos son componentes importantes en los productos de panadería. Es bien sabido que la amilosa tiene una estructura helicoidal y forma complejos de inclusión con otras sustancias, como el yodo, los alcoholes, los ácidos grasos y otras sustancias bioactivas liposolubles. Los complejos amilosa-lípido (CAL) pueden encontrarse en los gránulos de almidón nativo y también en el almidón procesado. Estos complejos restringen el hinchamiento de los gránulos de almidón y la hidrólisis enzimática (Hasjim et al., 2010; Morrison, Milligan y Azudin, 1984). La formación de CAL depende de varios

factores, como el tipo de almidón, el grado de polimerización de la amilosa, la proporción de almidón-ligando y la estructura de la molécula incorporada (Huang et al., 2020). En los alimentos horneados, estos complejos podrían formarse durante la mezcla y/o el horneado. Al tratar de explicar el mecanismo de formación del CAL para el batido sin gluten con la harina de nuez es posible encontrar un paralelismo con el modelo propuesto por Willhoft (1973) que teorizó que los lípidos, interaccionan con el gluten (de la harina de trigo) durante la panificación y que más tarde durante el horneado son liberados hacia el gel formado por la amilosa del almidón. Después de liberados estos lípidos formarían distintos complejos (por ejemplo CAL). Es posible teorizar que en el caso del batido libre de gluten parte de los lípidos de HN, atrapados por los cotiledones remanentes de la nuez son expulsados por el calentamiento durante el horneado, quedando disponibles para la formación de complejos con la amilosa.

Los parámetros relacionados con la disociación del complejo amilosa-lípido se muestran en la Tabla 18. Todas las formulaciones tenían aproximadamente el mismo contenido en lípidos, pero una composición lipídica diferente. El budín control contenía aceite de girasol y los lípidos provenientes de la leche, mientras que los budines con HN tenían además, los lípidos aportados por la harina de nuez. Además, el contenido de aceite de girasol se redujo proporcionalmente al aumentar el nivel de HN. En el control y en HN10, T_o y T_p fueron más altos, mientras que al aumentar la HN, el pico se desplazó a temperaturas más bajas. Esto pone en evidencia la diferente composición de los CAL presentes en los batidos y además, que los complejos con los lípidos de HN se disociaron más fácilmente. Este efecto estaría relacionado con el mayor grado de insaturación de los ácidos grasos

presentes en HN dado que se ha informado un desplazamiento a menores temperaturas cuánto mayor es el grado de insaturación (Eliasson, 1994).

Tabla 18. Parámetros de disociación del complejo amilosa-lípido de los batidos sin gluten

	Temperaturas [°C]				Entalpía de disociación ΔH_{CAL} *
	T_o	T_p	T_f	ΔT	
Control	122,7±0,2 ^c	126,1±0,3 ^c	132±1 ^c	9±1 ^{ab}	0,076±0,002 ^a
HN10	117±1 ^b	119,67±0,05 ^b	124±1 ^a	7±2 ^a	0,219±0,006 ^b
HN15	112±2 ^a	118,2±0,8 ^a	126±1 ^{ab}	14±2 ^{bc}	0,58±0,02 ^c
HN20	110±2 ^a	118,2±0,6 ^a	126,7±0,4 ^b	17±2 ^c	0,636±0,008 ^d

Promedio± desvío estándar, Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 3$). T_o : Temperatura de onset, T_p : Temperatura de pico, T_f : Temperatura final, * [$J \cdot g^{-1}$ sólidos].

La adición de HN tuvo un efecto significativo sobre la entalpía de disociación del CAL. Cuanto mayor fue el contenido de HN, mayor fue la energía requerida para disociar el complejo, por ejemplo, 0,076±0,002 para el control y 0,636±0,008 [$J \cdot g^{-1}$ sólidos] para HN20. Este resultado probablemente se encuentra relacionado a que un mayor grado de amilosa fue complejada, a pesar de tener todos los batidos, un contenido similar de lípidos, en base a la mezcla de harinas. Esto coincide con lo reportado por Moreira et al. (2015), quienes encontraron que las características microestructurales y la accesibilidad de los lípidos y almidones son más importantes que su concentración. Además, el mayor rango de temperatura presentado por esta transición al aumentar el nivel de HN mostró que, como se esperaba, la naturaleza de los complejos formados fue diferente. Así, probablemente una parte de la amilosa formó complejo con los lípidos aportados por la harina de nuez.

Por último, cabe destacar que el mayor grado de complejación de la amilosa está relacionado con efectos beneficiosos para la salud, ya que estos complejos se clasifican como almidón resistente de tipo V (Arp, Correa y Ferrero, 2021).

4.4.5. Características textuales de los batidos

El estudio de las propiedades texturales de los batidos es importante porque se encuentra directamente relacionado con el comportamiento que exhibirán los batidos durante su manipulación (por ejemplo, el llenado del molde) y además, porque tiene implicancia directa con el volumen específico alcanzado por los productos. Las propiedades texturales de los batidos se estudiaron por medio del ensayo de extrusión inversa, los parámetros característicos para las muestras estudiadas se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros texturales de los batidos sin gluten control y con harina de nuez (HN)

	Firmeza [N]	Índice de Consistencia [N·s]	Índice de Viscosidad [N·s]	Cohesividad [N]
Control	0,62±0,05 ^a	5,5±0,5 ^a	3,0±0,2 ^a	0,54±0,05 ^a
HN10	0,61±0,05 ^a	5,4±0,5 ^a	3,1±0,2 ^a	0,55±0,05 ^a
HN15	0,77±0,03 ^b	6,8±0,3 ^b	3,6±0,1 ^b	0,74±0,07 ^b
HN20	1,08±0,09 ^c	6,9±0,6 ^b	4,5±0,3 ^c	1,08±0,09 ^c

Control, HN10, HN15 y HN20 contienen 0, 10, 15 y 20 g de harina de nuez/100 g de mezcla de harina. Mezcla de harina: harina de arroz (0,70 kg), fécula de mandioca (0,15 kg) y almidón de maíz (0,15 kg). Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 9$).

El aumento de la concentración de harina de nuez en los batidos, aumentó su firmeza, índice de consistencia, índice de viscosidad y cohesividad. Esta tendencia también se observó cuando se incluyó polvo de orujo de zanahoria en batidos sin gluten (Majzoobi et al., 2016). En el caso de la formulación con una adición de 10 %

de HN, esta cantidad de harina de nuez no fue suficiente para cambiar significativamente las características texturales del batido respecto a la formulación control; tal como se ve en la constancia de los parámetros de textura respecto al control. Sin embargo, la firmeza y la cohesividad casi se duplicaron con la adición de 20 % de HN. Asimismo, los mayores índices de consistencia y viscosidad de los batidos con HN20 fueron probablemente la razón por la cual el vertido de ese batido en los moldes resultó más fácil. Por otro lado, la consistencia de los batidos es un factor determinante del volumen final de los productos, lo cual se encuentra relacionado más que nada a la incorporación de aire durante el batido y a la capacidad de esa matriz para conservar las burbujas de aire en su interior. La velocidad a la que ascienden las burbujas de aire en un fluido viscoso es inversamente proporcional a la viscosidad del mismo. Por lo tanto, en aquellos batidos que presentan una consistencia baja, las burbujas son capaces de subir rápidamente, escapándose de los mismos y dando lugar a productos de bajo volumen específico (Lee, Kim y Inglett, 2005). Por otro lado, los batidos que presentan una consistencia extremadamente alta frenan la expansión de los productos durante el leudado, dando lugar también a volúmenes específicos bajos (Gularte, Gómez y Rosell, 2012). Por lo tanto, esto indica que podría haber valores de consistencia óptimos para lograr obtener budines con alto volumen específico. Los valores de consistencia y firmeza obtenidos en esta investigación para los batidos con HN son comparables a los encontrados por otros autores para productos con alto volumen específico (Majzoobi et al., 2016).

4.4.6. Comportamiento reológico de los batidos

Los ensayos oscilatorios dinámicos son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento viscoelástico de alimentos debido a que son muy sensibles a la composición química y a la estructura de los mismos (Steffe, 1996). Los materiales viscoelásticos como las masas y los batidos, son aquellos que presentan características intermedias entre sólidos y líquidos. En primer lugar, se determinó a partir de los barridos de esfuerzo el rango de viscoelasticidad lineal (RVL) para cada formulación de los batidos. El RVL se define como aquel en el cual las propiedades del material no dependen de la magnitud del esfuerzo aplicado. El límite superior del RVL (G' crítico ó G'_c), está dado por el valor de esfuerzo crítico (σ_c). El valor de σ_c de cada batido se lo considera cuando se produce una disminución del 5 % de G' máximo. Es así que, a partir del G'_c se determinó la deformación crítica (γ_c) y se calculó la energía cohesiva (E_c).

La Tabla 20 contiene los parámetros reológicos obtenidos a partir de los barridos de esfuerzo de los batidos. A medida que aumenta el nivel de HN, se reduce el rango viscoelástico lineal, como se observa en el desplazamiento del valor de deformación crítica (γ_c) a valores más bajos. Si se aplican esfuerzos que dan lugar a deformaciones superiores a γ_c , se produce una importante destrucción de la microestructura de la muestra. La energía cohesiva (E_c) refleja la fuerza de una estructura tipo gel (Tadros et al., 2010). Los batidos con harina de nuez presentaron valores de E_c significativamente menores que el batido control pero no se detectaron diferencias significativas entre las formulaciones con HN. En los batidos sin gluten, las proteínas dispersas en la fase acuosa contribuyen a la conformación de la matriz. La presencia de harina de nuez podría interrumpir esta

matriz dando lugar a una más susceptible a la ruptura ante un incremento del esfuerzo aplicado.

Tabla 20. Comportamiento reológico de los batidos durante los barridos de esfuerzo

	Esfuerzo crítico Pa	Deformación crítica $\gamma_c \cdot 10^3$	Energía cohesiva $E_c [J/m^3] \cdot 10^4$
Control	1,2 ±0,2 ^b	1,5 ±0,2 ^c	9 ±3 ^b
HN10	0,3±0,08 ^a	1,08 ±0,06 ^b	1,7 ±0,5 ^a
HN15	0,46±0,04 ^a	0,94 ±0,07 ^{ab}	2,2 ±0,1 ^a
HN20	0,29±0,03 ^a	0,7 ±0,1 ^a	1,1 ±0,3 ^a

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n=2$).

La Figura 37 muestra la dependencia de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de los batidos con la variación de la frecuencia (Espectros mecánicos). Todas las formulaciones mostraron valores de G' superiores a G'' , un comportamiento característico de los geles viscoelásticos. Comparando las formulaciones con harina de nuez entre sí, se observa que la harina de nuez produce un efecto de refuerzo en ambos módulos en todo el rango de frecuencias estudiado. Este efecto fue mayor a medida que se incrementó el nivel de HN agregado. Por otro lado, el batido control mostró un comportamiento intermedio entre HN15 y HN20.

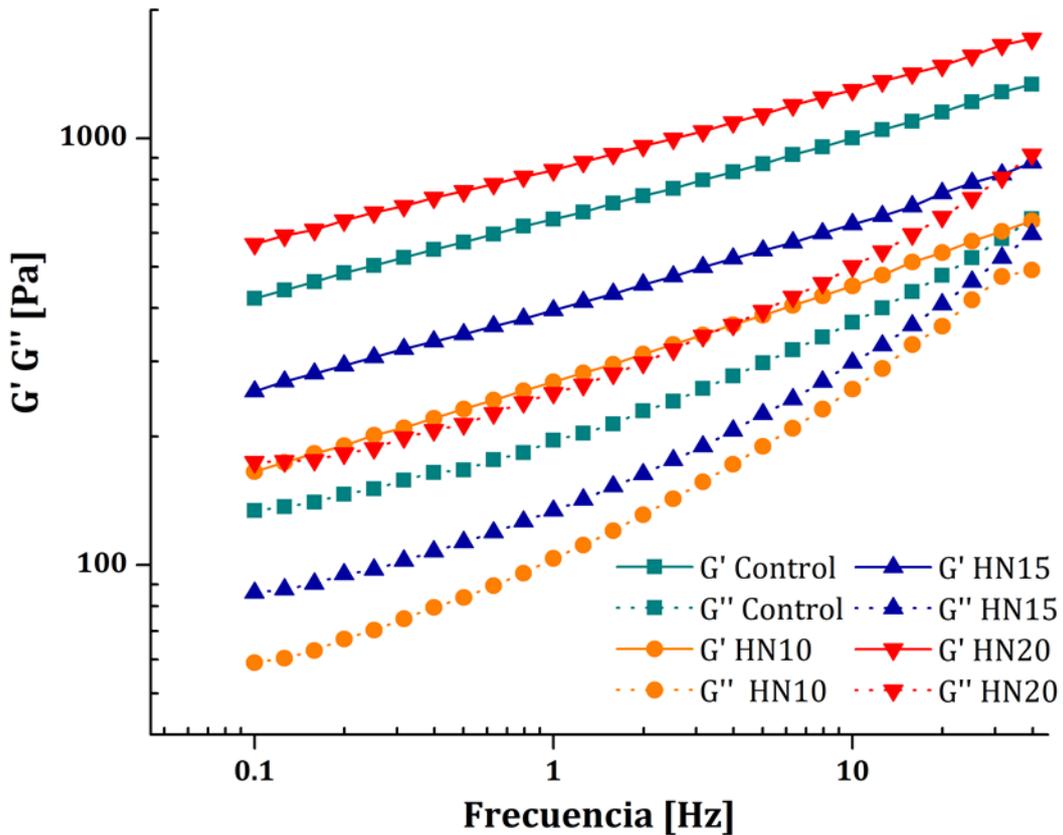


Figura 37. Espectros mecánicos: Efecto de la frecuencia sobre los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los batidos adicionados con harina de nuez

El módulo complejo (en el rango de 0,1-39 Hz) se modeló siguiendo el enfoque del gel débil (Figura 38), en el cual el sistema de estudio se considera como una red tridimensional conformada por unidades de flujo interactuando cooperativamente. En este modelo, los geles se caracterizan por los parámetros fuerza del gel (A_F) y grado de coordinación (z). Los parámetros presentados por los batidos se presentan en la Tabla 21, habiéndose encontrado diferencias significativas en el comportamiento exhibido entre todas las muestras.

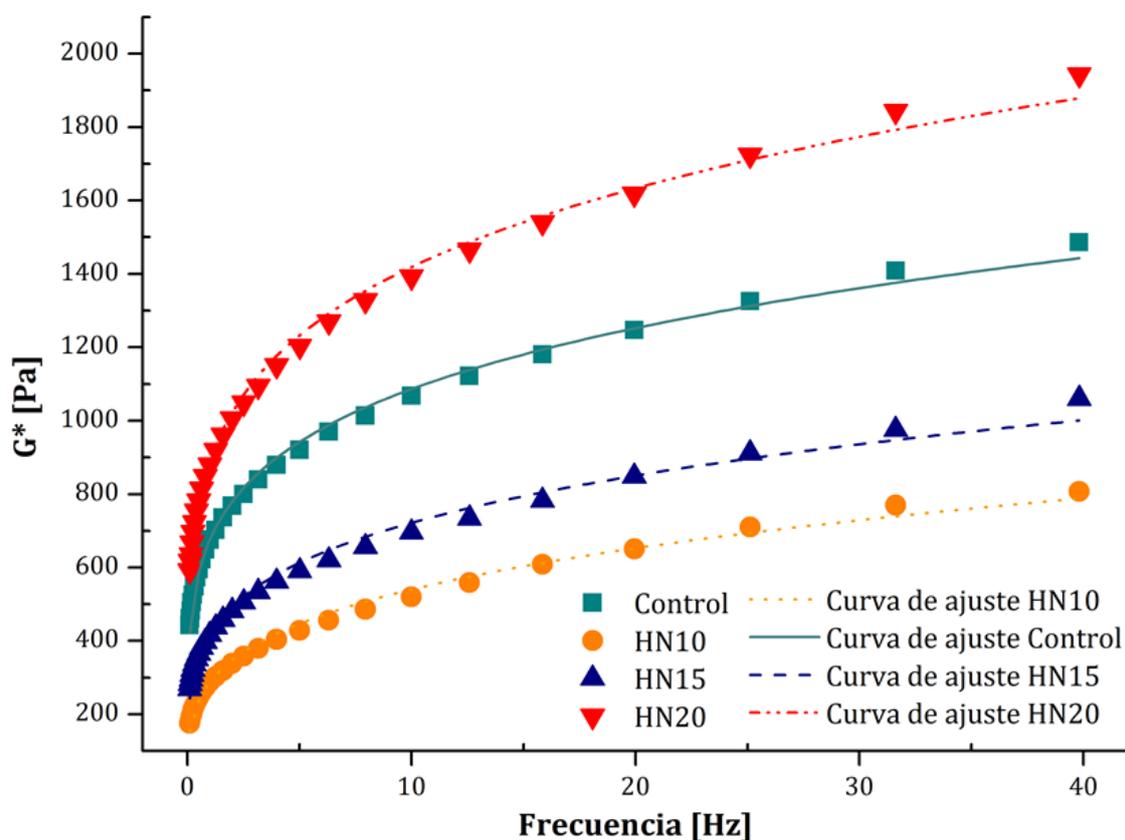


Figura 38. Comportamiento reológico de los batidos: Efecto de la frecuencia sobre el módulo complejo y curvas ajustadas al modelo de gel débil

Tabla 21. Parámetros de los batidos durante barridos de frecuencia según el modelo de gel débil

	Modelo de gel débil		
	Fuerza del gel A_F [Pa*s ^{1/z}]	Grado de coordinación z	Prueba F
Control	677±4	4,87±0,06	B
HN10	288±9	3,7±0,2	D
HN15	419±10	4,2±0,2	C
HN20	888±5	4,92±0,06	A

Promedio ± error de desviación. Letras diferentes en la prueba F indican diferencias significativas entre los conjuntos de datos ($p < 0,05$, $n=2$).

La adición de un nivel bajo de HN condujo a una reducción del valor de A_F (HN10). Sin embargo, el uso de niveles crecientes de HN condujo a un fortalecimiento constante de las matrices de los batidos cuando se aplicó una

pequeña deformación dentro de RVL. De este modo, la formulación HN20 presentó el mayor valor de A_F . Este parámetro es relevante porque está relacionado con la fuerza del gel formado. El comportamiento mostrado por las muestras en este ensayo concuerda con los resultados observados en los ensayos de extrusión inversa donde mayores niveles de harina de nuez dieron lugar a batidos de mayor consistencia, cohesividad y firmeza. Sin embargo, en los ensayos de oscilación, el batido control mostró un comportamiento intermedio entre el HN20 y el HN15, como lo demuestran los valores de A_F mayores para el control que HN10 y HN15. Este efecto diferente podría estar relacionado con el hecho de que en los ensayos de back-extrusión se aplican grandes deformaciones, mientras que en los ensayos oscilatorios se aplican pequeñas. Por lo tanto, la matriz del batido control soportaría sin inconvenientes las pequeñas deformaciones aplicadas en los ensayos oscilatorios dinámicos, respondiendo de mejor manera que HN10 y HN15, pero no respondería igualmente bien a las grandes deformaciones aplicadas en el ensayo de extrusión inversa.

El grado de coordinación (z) de las unidades de flujo en estos geles débiles aumentó con el nivel de HN. Cuando se añadió HN al 10 % se produjo una alteración de la red en comparación con el batido control dando lugar a un menor grado de coordinación. Sin embargo, el aumento de los niveles de HN condujo a la formación de una nueva red constituida por diferentes unidades de flujo, lo que se reflejó en los valores crecientes de z y en la modificación de la A_F . En este tipo de sistemas, el gel débil está formado por filamentos débiles que conectan puntos topológicos fuertes, estando esta red estabilizada por interacciones débiles en lugar de por enlaces covalentes (Gabriele, de Cindio y D'Antona, 2001).

El comportamiento reológico y los parámetros obtenidos del modelado para los batidos con HN fueron similares a los informados por otros autores en batidos sin gluten (Mäkinen, Zannini y Arendt, 2013a; Wolter et al., 2014). Así, la HN confirió las características tecnológicas adecuadas para obtener batidos aptos para la obtención de budines libres de gluten.

Ensayos oscilatorios con barrido de temperatura

Se realizaron ensayos de barrido de temperatura para comprender los cambios estructurales de los batidos durante el calentamiento. Si bien, las condiciones experimentales aplicadas en el reómetro no son iguales al proceso real de horneado, se considera una herramienta valiosa para entender los eventos estructurales durante el mismo (Herranz et al., 2016; Bozdogan, Kumcuoglu y Tavman, 2019).

La dependencia del módulo complejo (G^*) en función de la temperatura para las formulaciones de los batidos estudiadas se muestran en la Figura 39 (a). La contribución del módulo de almacenamiento (G') al G^* fue mayor que la del módulo de pérdida (G'') en todo el rango de temperaturas ensayado (Figura 39 b). Al comenzar el calentamiento, todas las formulaciones mostraron un aumento de G^* alrededor de los 35 °C. El batido control fue más sensible al cambio de temperatura, y en torno a los 45 °C, alcanzó una meseta.

En el caso de los batidos con HN, este primer aumento de G^* osciló entre ~35 °C y ~60 °C. Schober et al. (2007), en un batido libre de gluten con harina de sorgo (con un 8,5 % de proteína), observaron el mismo comportamiento, el aumento de G^* se desplazó a temperaturas más altas con respecto a las muestras con mayor almidón disponible. Las curvas de G^* para los batidos control y HN se cruzan en

torno a los 51 °C, pero por debajo de este valor, el batido control presentó valores de G^* más elevados. Los valores más bajos G^* exhibidos por los batidos con HN podrían estar relacionados con el menor contenido de almidón y el mayor contenido de lípidos poliinsaturados. Así, esta primera parte de la curva podría estar asociada a los cambios en las conformaciones de las proteínas inducidos por el calentamiento. Además, alrededor de los 30 °C ocurre la formación del pregel de HPMC lo que implica una reducción de G' (Pérez, Wargon y M.R. Pilosof, 2006). Esto se podría observar como una pequeña caída de G' (y G^*) en el caso de los batidos con HN. Sin embargo, este fenómeno estaría sobrelapado con otros en el batido control por lo que no se observa. A continuación, alrededor de los 60 °C, la HPMC forma un gel debido a la deshidratación y a la formación de cúmulos hidrofóbicos que conducen a un aumento de G' (Rosell y Foegeding, 2007). La muestra control presentó un punto de inflexión a esta temperatura, mientras que no se observó en los batidos con HN. A medida que aumentó la temperatura, la estructura del budín se fijó, debido a la gelatinización del almidón presente en los batidos, lo que condujo a un nuevo aumento de G^* . En la formulación control, este acontecimiento se produjo antes (~ 65 °C), mientras que, en las muestras con HN, el establecimiento se produjo alrededor de ~ 80 °C. Los batidos con HN tenían un menor contenido de almidón y un mayor contenido de proteínas y fibra que el control. Así, estos componentes podrían competir por el agua con los almidones durante la formación de la miga, retrasándola.

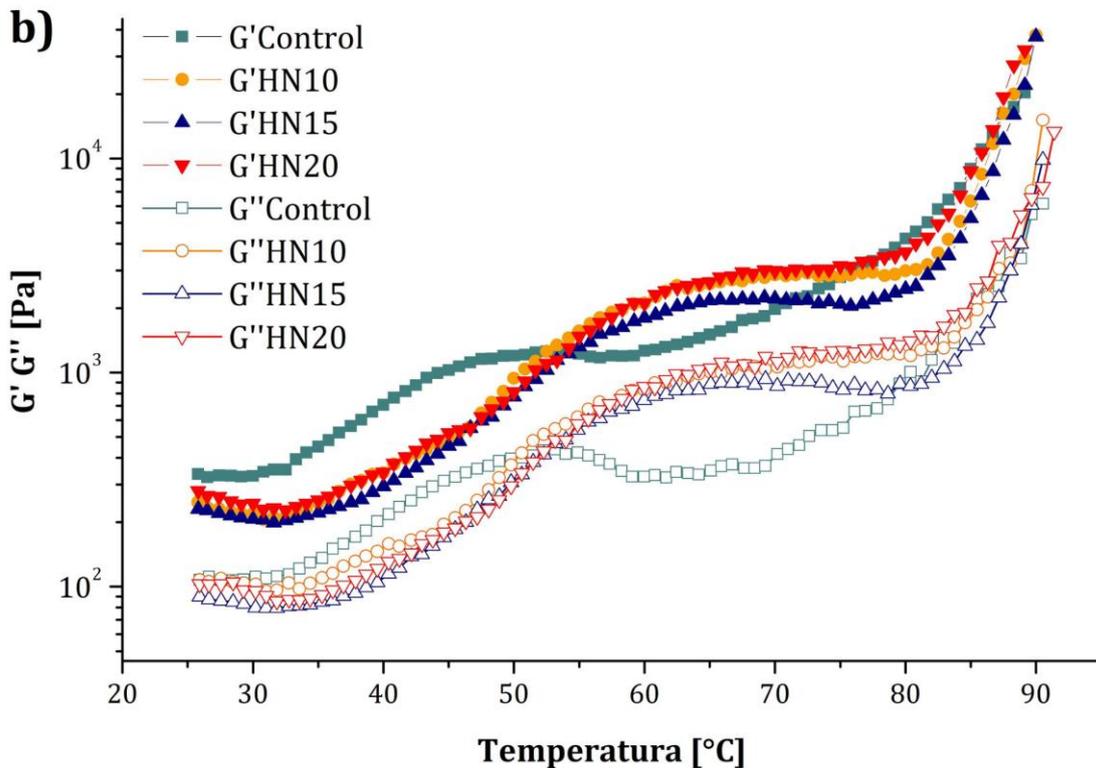
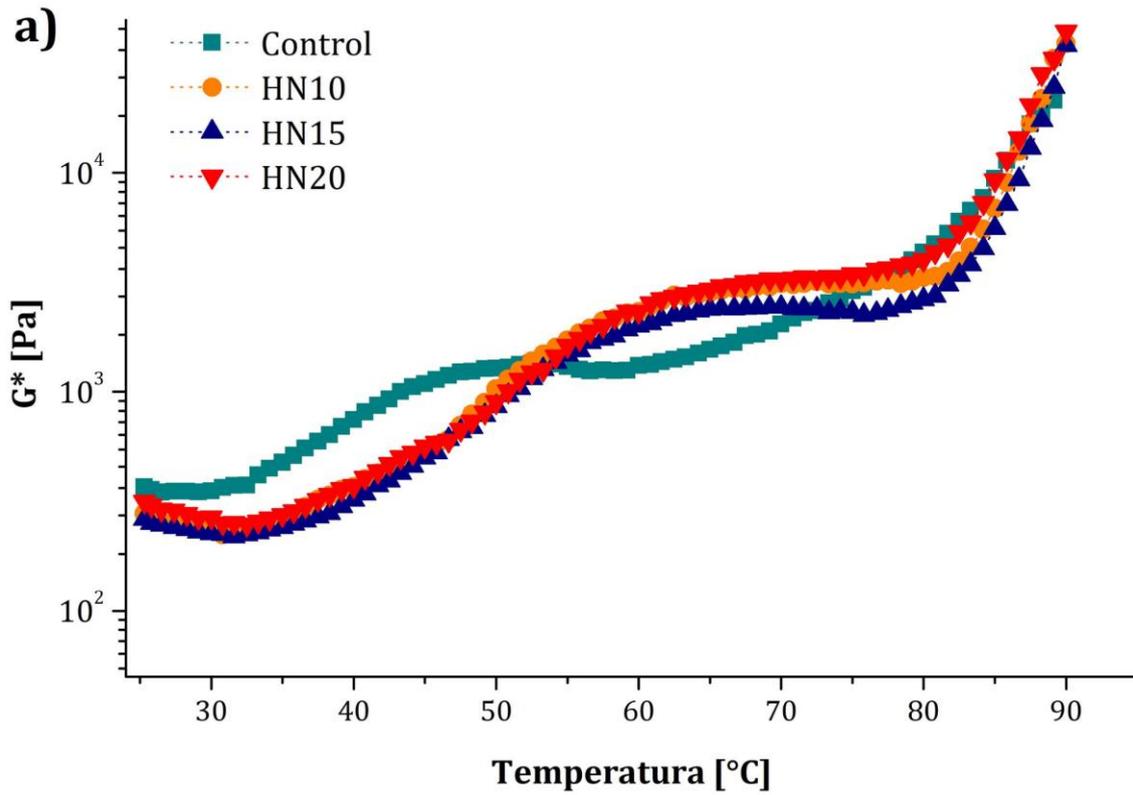


Figura 39. a) Módulo complejo (G^*) en función de la temperatura en los batidos sin gluten, b) Módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función de la temperatura

4.4.7. Microestructura de las harinas y los batidos por CSLM

Con la finalidad de evaluar las características microestructurales de los batidos se realizó una observación por microscopía confocal láser de barrido de los mismos. También se observaron por CSLM las materias primas (harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca) para caracterizar a sus componentes mayoritarios. Para la obtención de las micrografías se utilizaron dos mezclas de fluoróforos, la mezcla 1 formada por rodamina B, FITC y calcoflúor y la mezcla 2 formada por rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor. Las harinas y almidones se tiñeron solamente con la mezcla 1, mientras que los batidos se tiñeron con ambas mezclas por separado. Al utilizar varios marcadores fluorescentes simultáneamente, se espera que cada fluoróforo marque a una estructura o componente particular permitiendo, de este modo, identificar la ubicación y distribución de estos componentes en la matriz en estudio. Sin embargo, cuando se realizan marcados no covalentes, como en este caso, la distribución de los fluoróforos depende del balance entre la hidrofobicidad de las fases a distinguir y de la accesibilidad que los mismos tengan a las estructura de la matriz que se quieren teñir.

El fluoróforo FITC se une a las proteínas y a los gránulos de almidón emitiendo un color verde amarillento, la rodamina B es un colorante rojo que se une preferentemente a las proteínas pero también puede unirse a polisacáridos (Correa et al., 2014b; Rodríguez-García et al., 2012), el calcoflúor se une fuertemente a estructuras que contienen celulosa (Öhgren, Lopez-Sanchez y Lorén, 2019) y quitina, dando un color azul, lo que permite su asociación a la fibra, y por último, el rojo Nilo se une a lípidos tiñéndolos de color verde (Nicholson y Marangoni, 2019). El FITC y el rojo Nilo no se utilizaron juntos ya que absorben y

emiten a la misma longitud de onda, por lo que no se podría distinguir su señal si se emplearan en forma simultánea.

En las Figura 40 y Figura 41 se muestran las micrograffias de la harina y los almidones usados en la elaboración de los batidos, estos son, la harina de arroz, el almidón de maíz y la fécula de mandioca. Los canales de fluoróforos se encendieron y apagaron selectivamente para diferenciar más fácilmente los componentes dentro de las distintas muestras. En las imágenes de las materias primas con las letras a) y c) muestran todos sus canales encendidos, mientras que las imágenes b) y d) el canal de FITC fue apagado para quitar el efecto verde que tiñe a los almidones.

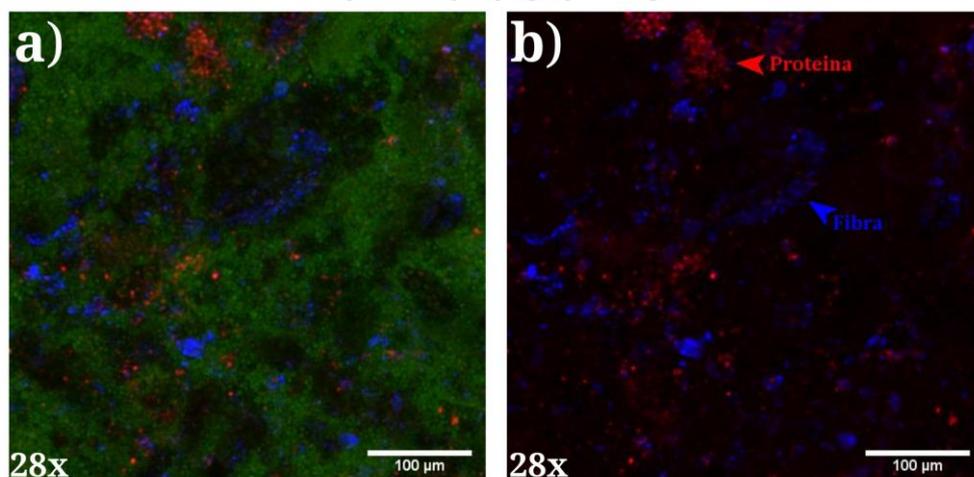
Como es claramente visible, el almidón es el componente mayoritario en todas las muestras (Figura 40). En la harina de arroz se observa un mayor grado de heterogeneidad en cuanto a sus componentes, siendo visible estructuras azules y rojas compatibles con fragmentos de fibra y presencia de proteína. Al sacar el canal de FITC, se elimina al almidón y en la micrografía correspondiente a la harina de arroz se puede observar mayor presencia de fibra que en las demás muestras. Aunque en la micrografía del almidón de maíz (Figura 40b) se observan estructuras violetas compatibles con la presencia de fibra recubierta con proteína. En el caso del almidón de maíz y de mandioca, puede observarse que la rodamina b, al igual que FITC, tiñeron los gránulos de almidón mientras que en la harina de arroz, los gránulos de almidón no fueron teñidos por rodamina b. Esto pone en evidencia, las características de un teñido no covalente, en donde el entorno con el cual se encuentre el fluoróforo es determinante de su localización en la muestra.

En la Figura 41 se muestran micrografías de las harinas y almidones, observados con mayor magnificación, lo que permite observar con más detalle los distintos componentes en las muestras. En particular, en estas muestras son de relevancia las diferencias observadas en los gránulos de almidón debido al diferente origen botánico de las muestras. Es así que dependiendo del origen los gránulos pueden ser redondos, poligonales, ovalados, lenticulares, esféricos, elípticos, irregulares y/o poliédricos. Además, en la mayoría de los casos, los almidones, presentan combinaciones de varias formas (Wang y Guo, 2020). En cuanto, a la harina de arroz (Figura 41c) presentó los gránulos de almidón más pequeños y se disponen agrupados. Generalmente, los gránulos de almidón provenientes del arroz son redondos, angulares y poligonales y presentan dimensiones del orden de 3 - 10 μm (Ashogbon y Akintayo, 2012) pero el tipo e intensidad de molienda puede afectar la forma final de los gránulos.

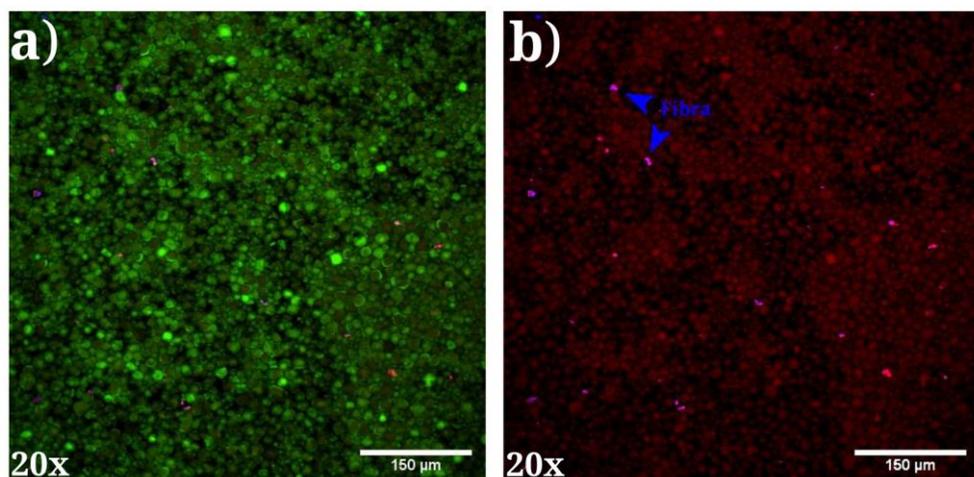
Con respecto al almidón de maíz, sus gránulos (Figura 41c) presentaron mayor tamaño. Los almidones de maíz se componen de gránulos con formas que pueden ser desde esféricas pequeñas a poliédricas grandes y con un tamaño medio de partícula que oscila entre 3 - 20 μm (Wang et al., 2014).

En cuanto a la fécula de mandioca, sus gránulos (Figura 41c) se muestran con tamaños mucho mayores, en comparación con la harina de arroz. Además, se observa una mayor heterogeneidad de tamaño y forma. En general, la forma de los gránulos de mandioca es ovalada, truncada y redondeada y tienen un tamaño en el rango de 2-32 μm . Además, presentan una superficie más suave en comparación con gránulos de otras féculas (Defloor, Dehing y Delcour, 1998; Juszczak, Fortuna y Krok, 2003; Rolland-Sabaté et al., 2013).

Harina de arroz



Almidón de maíz



Fécula de mandioca

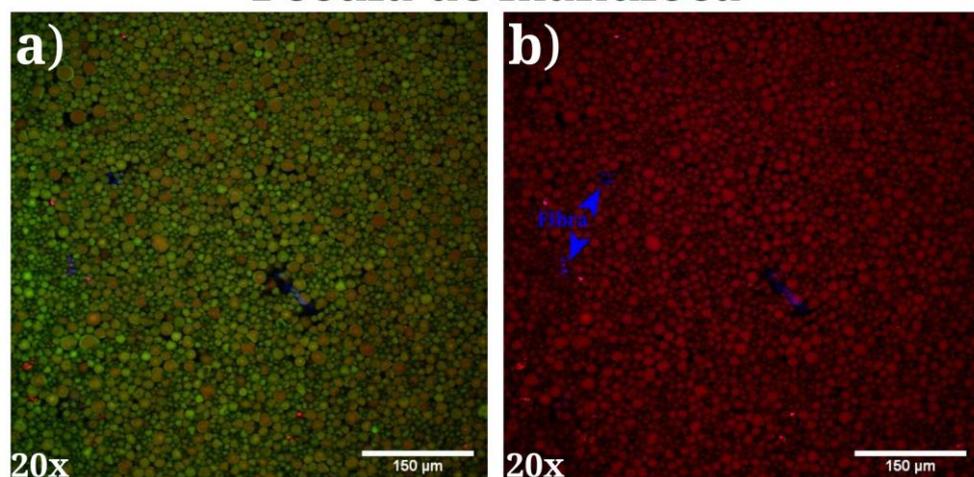
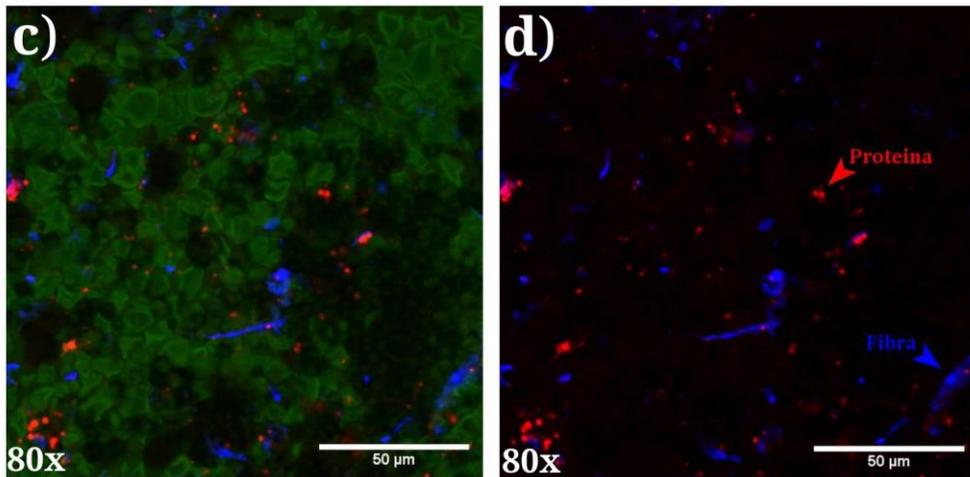
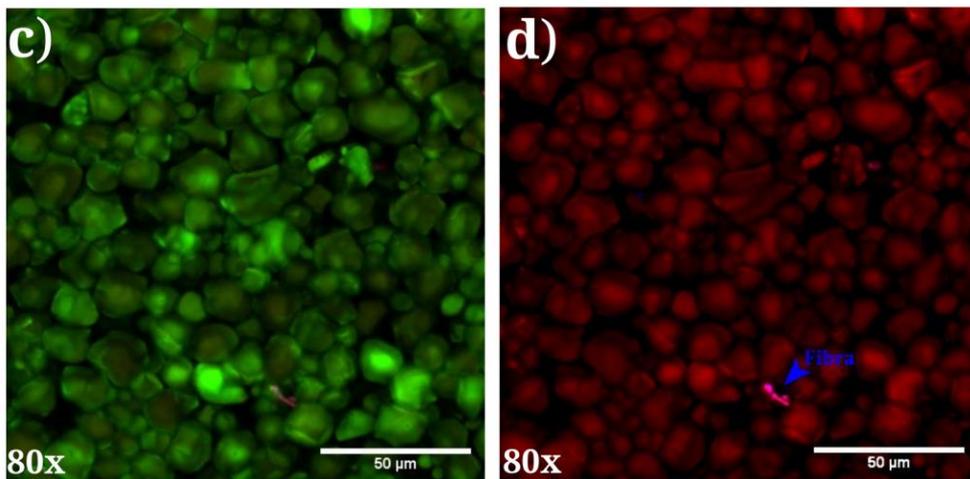


Figura 40. Micrografías obtenidas por microscopía confocal láser de barrido de la harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca. Las muestras fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las micrografías (a) muestran todos sus canales encendidos, mientras que (b) muestran el canal de FITC apagado

Harina de arroz



Almidón de maíz



Fécula de mandioca

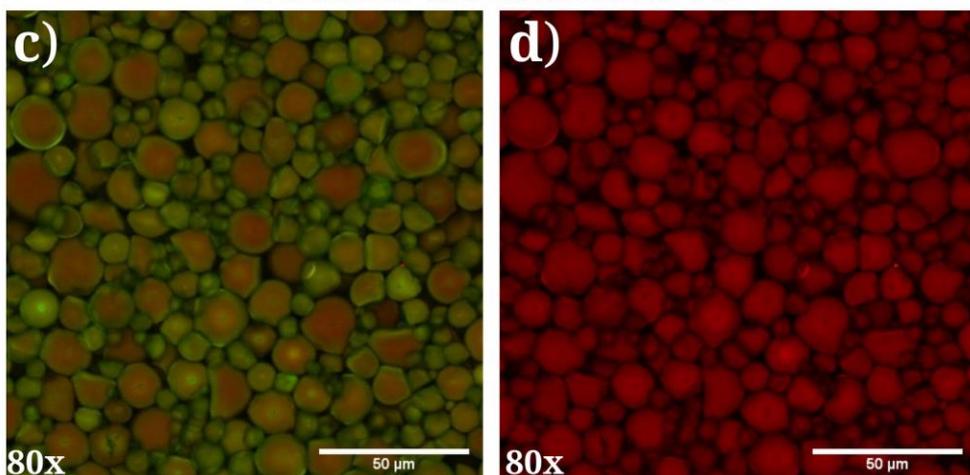


Figura 41. Micrografías a 20x por microscopía confocal láser de barrido de la harina de arroz, almidón de maíz y fécula de mandioca. Las muestras fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las micrografías (c) muestran todos sus canales encendidos, mientras que (d) muestran el canal de FITC apagado

Una vez observadas las materias primas se procedió a evaluar las características de los batidos. En la Figura 42 (Control y HN10) y la Figura 43 (HN15 y HN20) se muestran los batidos teñidos con rodamina B, FITC y calcoflúor (mezcla 1), mientras que en la Figura 44 se muestran todas las formulaciones de los batidos teñidos con rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor (mezcla 2). De igual forma que para las harinas los canales de fluoróforos se encendieron y apagaron selectivamente para diferenciar más fácilmente los componentes dentro de la matriz del batido.

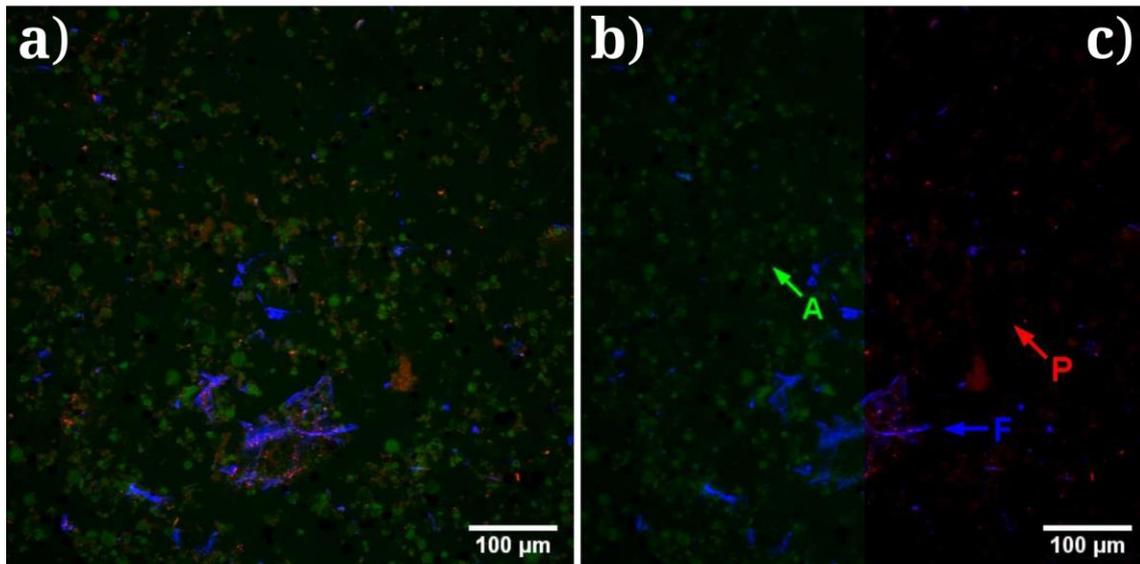
En cuanto a las micrografías con la mezcla 1 (Figura 42 y 43), todas las imágenes denominadas con la letra a) tienen todos los canales encendidos, mientras que las imágenes con la letra b) tienen el canal de rodamina B apagado, eliminando las proteínas. En tanto que, las imágenes con la letra c) tienen el canal de FITC apagado, eliminando al almidón de los batidos. Por otro lado, en las micrografías teñidas con la mezcla 2 sólo se muestra al control con todos sus canales encendidos (Figura 44a). Las imágenes con la letra b) tienen el canal de rodamina B apagado y las imágenes con la letra c) tienen el canal de rojo Nilo apagado, eliminando a los lípidos de las imágenes.

Las micrografías del Control, HN10, HN15 y HN20 mostraron que todos los batidos presentaron una matriz proteica en la que se hallan inmersos gránulos de almidón, partículas de fibra y gotas de lípidos, lo que confiere a la estructura del batido un aspecto heterogéneo. Se han informado similares observaciones en otros batidos sin gluten (O'Shea et al., 2013). Además, las zonas de color negro pueden deberse a burbujas de aire o, en las imágenes teñidas con la mezcla 1 (Figura 42 y 43), a gotas de aceite de girasol y lípidos de la nuez, ya que los lípidos no se tiñen

con los fluoróforos utilizados. Estas micrografías muestran que los batidos constituyen una matriz compleja, en la cual sus componentes se encuentran formando parte de distintos tipos de sistemas, por un lado se tiene una dispersión de proteínas y polisacáridos, una solución de azúcares y sales, una emulsión y una espuma, todo esto en forma simultánea. Las partículas azules en todos los batidos indican la presencia de fibra. En el batido control de la Figura 42, la fibra provino principalmente de la harina de arroz y de la HPMC. Asimismo, la adición de harina de nuez aumentó el contenido de fibra (partículas azules) en las micrografías de HN10, HN15 y HN20, siendo evidentemente el batido HN20 el que presentó el mayor contenido de fibra, reflejado en un mayor nivel de coloración azul en las micrografías.

El batido control teñido con rojo Nilo (Figura 44) mostró gotas (verdes) de aceite de girasol dispersas en la matriz. A medida que se aumentó el nivel de HN, se redujo la cantidad de aceite de girasol con el fin de mantener relativamente constante el contenido de lípidos en los batidos (HN10, HN15 y HN20). Así, las micrografías mostraron que las gotitas de aceite de girasol se redujeron y fueron sustituidas por lípidos de la nuez que seguían atrapados en algunas estructuras remanentes de nuez, ya que era visible una matriz verde semicontinua. En las micrografías con el canal del rojo Nilo apagado (c) puede observarse que esta matriz está conformada por proteínas ya que fueron teñidas con rodamina B. Seguramente, esta estructura contribuyó al aumento de la consistencia, como se observó en los ensayos de extrusión inversa al aumentar el nivel de HN.

CONTROL



HN10

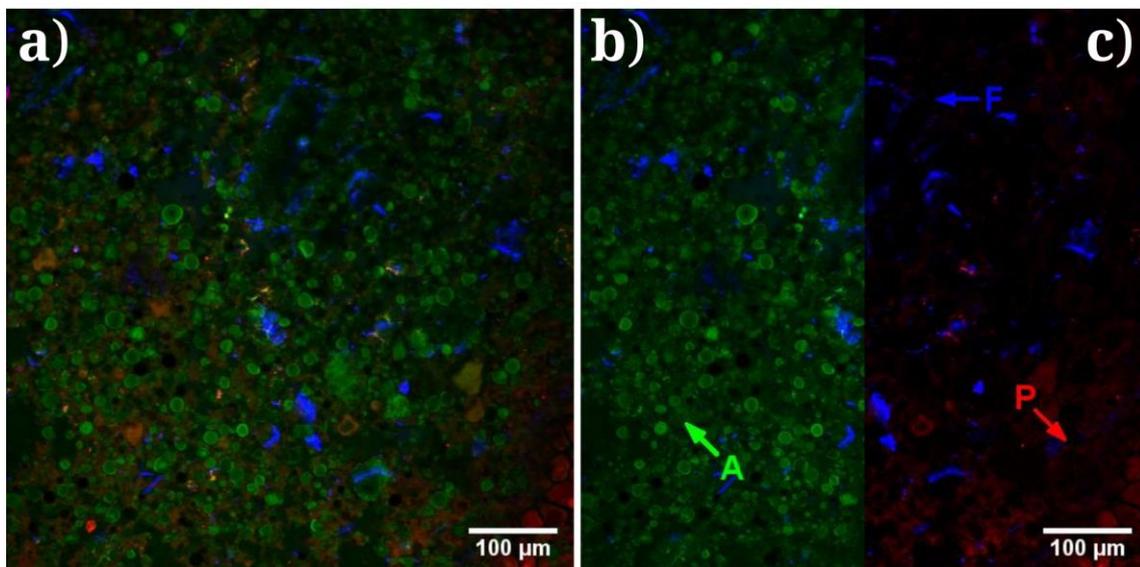
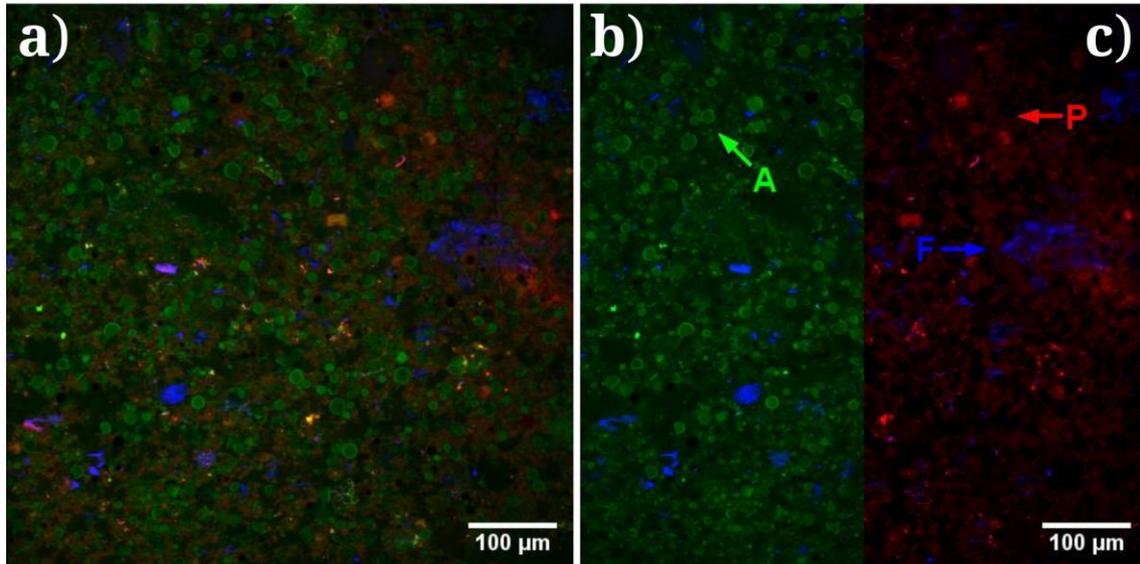


Figura 42. Micrografías a 20x por CSLM de los batidos Control y HN10. Las micrografías fueron teñidas con rodamina B, FITC y calcoflúor. Las imágenes a) muestran todos los canales encendidos, b) muestran el canal de rodamina B apagado, c) muestran el canal de FITC apagado. A: almidón, F: fibra y P: proteína

HN15



HN20

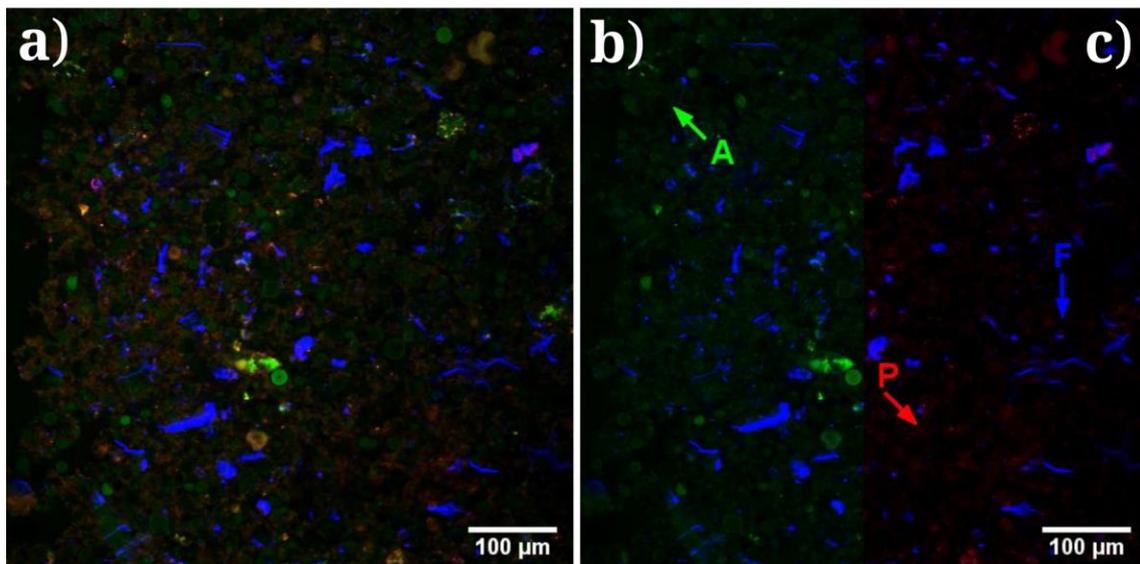


Figura 43. Micrografías a 20x por CSLM de los batidos HN15 y HN20. Las micrografías fueron teñidas con rodamin B, FITC y calcoflúor. Las imágenes a) muestran todos sus canales encendidos, b) muestran el canal de rodamin B apagado, c) muestran el canal de FITC apagado. A: almidón, F: fibra y P: proteína

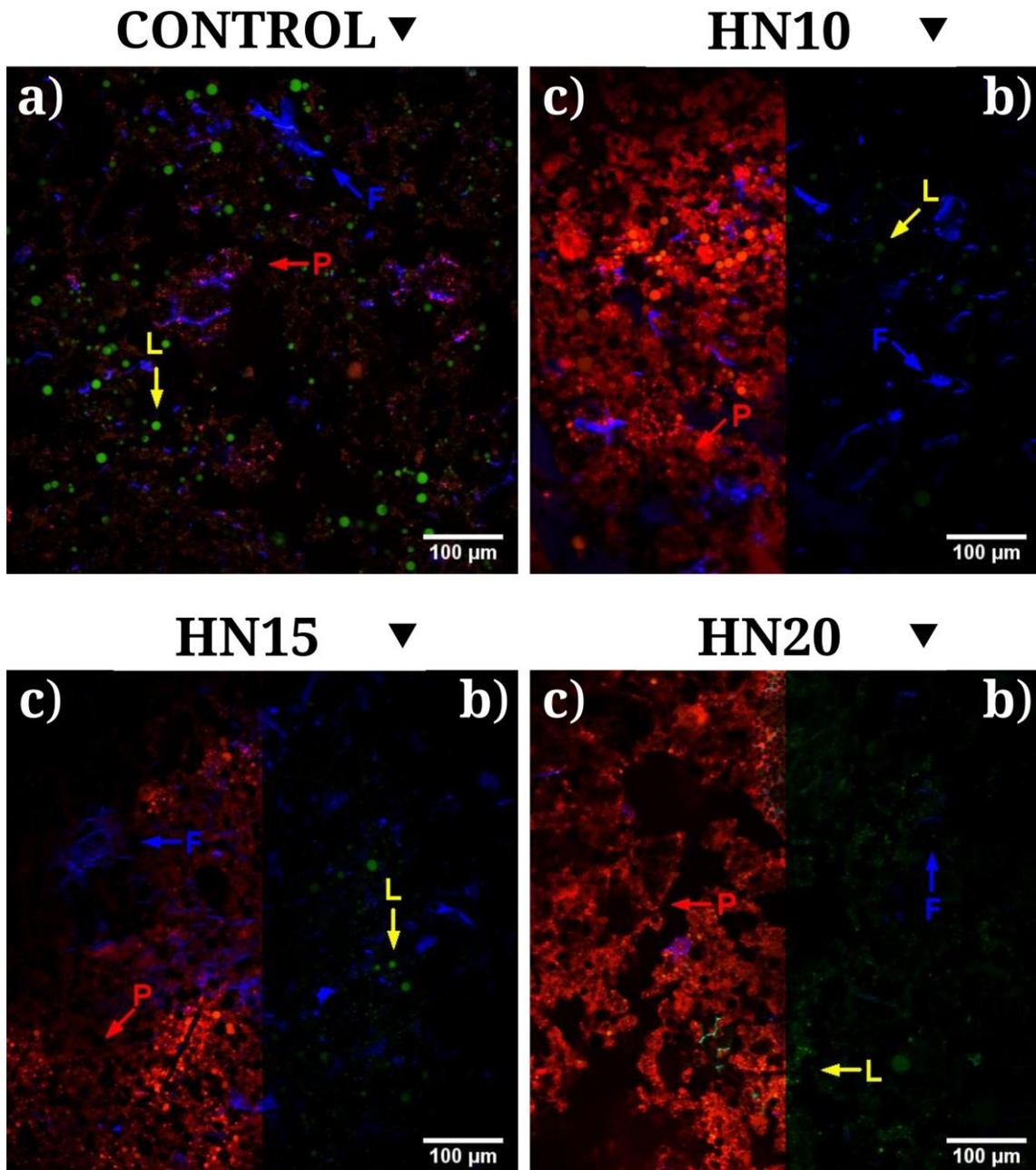


Figura 44. Micrografías por CSLM de batidos sin gluten a 20x. Las micrografías fueron teñidas con rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor. La imagen del Control (a) muestra todos sus canales encendidos, mientras que b) muestran el canal de rodamina B apagado. y c) muestran el canal de rojo Nilo apagado. A: almidón, F: fibra, L: lípidos y P: proteína

4.5. Conclusiones parciales

La adición de harina de nuez (HN) afectó las propiedades de empaste de las premezclas, situación probablemente relacionada a la dilución del almidón en las mismas y al efecto ocasionado por los lípidos y compuestos hidrofílicos presentes en HN. Es así que la presencia de HN en las premezclas retrasó el inicio del empaste, aumentó la temperatura de comienzo del mismo y ocasionó la disminución de las viscosidades máxima y mínima y de la inestabilidad.

Por otro lado, la adición de HN afectó ampliamente las características microestructurales de los batidos, dando lugar a un comportamiento reológico y una movilidad molecular diferenciada entre el batido control y los batidos con harina de nuez. La HN presentó una alta afinidad por el agua lo que se reflejó en menores tiempos de relajación por RMN y en la reducción de la actividad acuosa y del agua congelable de los batidos, a medida que la adición de HN aumentó.

Asimismo, la adición de HN produjo una reducción del cambio de entalpía de gelatinización, haciendo que este disminuyera de $6,1 \pm 0,3^c$ [$\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ sólidos] para el control a $3,4 \pm 0,1^a$ [$\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ sólidos] para HN20. Al mismo tiempo, se registró un aumento considerable en el cambio de entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido. En cuanto a las características texturales, la adición de HN mejoró la consistencia de los batidos, haciéndolos mucho más fáciles de manejar. Este incremento de la consistencia y viscosidad de los batidos al incrementar el nivel de HN es compatible con la formación de una estructura proteica (y que contiene lípidos provenientes de la nuez) en la matriz tal como se observó por CSLM.

Finalmente los resultados de este capítulo permiten concluir que la HN (20 % en base a mezcla de harinas) puede incorporarse con éxito a una formulación de budines libres gluten sin ocasionar ningún efecto negativo.

**Capítulo 5: Budines
libres de gluten con
harina de nuez**

Capítulo 5

5.1. Introducción

Los productos panificados dulces como los budines, las magdalenas y bizcochuelos son productos que suelen consumirse en el desayuno o merienda o como snacks entre comidas (Xu et al., 2020). Desde el punto de vista tecnológico el desarrollo de estos productos sin gluten es menos desafiante que la elaboración de un pan sin gluten, ya que sus análogos con gluten no requieren del desarrollo de la red de gluten como sí lo requiere el pan de trigo (Gómez, 2022). Al comparar los componentes mayoritarios en este tipo de productos sin gluten, con respecto a sus análogos con gluten, se encuentra que el azúcar y la grasa son los componentes principales en los productos sin gluten mientras que no ocurre lo mismo en los análogos con gluten (Belorio y Gómez, 2020). En general, esto se relaciona con el hecho de que estos ingredientes influyen positivamente en el volumen y textura de los productos finales. La reducción en el contenido de azúcar se ha visto que conlleva a la obtención de mayores volúmenes específicos, pero con cortezas más duras debido a la modificación de la gelatinización del almidón (Perez y Juliano, 1988). Dadas estas características de sus formulaciones, todas aquellas acciones tendientes a la mejora de la calidad nutricional, manteniendo las características que distinguen a estos productos como son la textura suave y esponjosa y el sabor dulce y agradable, son bienvenidas, buscadas y aceptadas. Sin embargo, la introducción de nuevos ingredientes conlleva no sólo modificaciones en el perfil nutricional, sino también modificaciones en la calidad tecnológica de los productos. Por lo tanto, el monitoreo de estos cambios es relevante para la obtención de productos de buena calidad y aceptados por el consumidor.

5.2. Objetivos del capítulo

5.2.1. Objetivo general del capítulo

Analizar el efecto de la harina de nuez en las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas y sensoriales de los budines libres de gluten.

5.2.2. Objetivos específicos del capítulo

- Determinar si la adición de la harina de nuez afecta la calidad panadera de la miga y la corteza de los budines libres de gluten.
- Establecer el efecto de la harina de nuez en la microestructura de la miga de los budines libres de gluten.
- Evaluar si la adición de la harina de nuez afecta la calidad sensorial y la aceptabilidad de los budines.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Ingredientes usados en los budines

Se utilizaron los mismos ingredientes descritos previamente en la sección 4.3.1. Harina de arroz (HA), almidón de maíz (AM) y fécula de mandioca (FM), azúcar, sal comercial, aceite de girasol, esencia de vainilla, leche entera fluida, huevo deshidratado, hidroxipropilmetilcelulosa HPMC F4M, agua destilada y harina de nuez (HN). Adicionalmente, para los budines se utilizó polvo de hornear que según declara el fabricante contiene almidón de maíz, bicarbonato de sodio, fosfato monocálcico y carbonato de calcio (Royal, Mondelez Brasil LTDA. Brasil).

5.3.2. Formulaciones para los budines

Se empleó la siguiente mezcla de harinas 70 g de HA, 15 g de AM y 15 g de FM. Además, se añadieron los siguientes ingredientes: 66,4 g de agua destilada, 50 g de azúcar, 40 g de leche entera, 11,1 g de huevo deshidratado, 11 g de aceite de girasol, 2,2 g de HPMC, 1,1 g de sal, 0,5 g de polvo de hornear y 0,25 g de esencia de vainilla por cada 100 g de mezcla de harinas. HN se añadió en tres niveles 10, 15 y 20 % en base a la mezcla de harinas (HN10, HN15 y HN20, respectivamente). Como la HN tiene un alto contenido de lípidos, la cantidad de aceite de girasol utilizada se redujo progresivamente al aumentar el nivel de HN, para mantener el contenido en lípidos cerca de 11 % en todas las formulaciones.

5.3.3. Elaboración de los batidos y budines

El proceso de batido fue descrito en detalle en Elaboración de los batidos (4.3.4). Brevemente, con el empleo de una batidora planetaria se mezclaron el huevo reconstituido, la leche, el aceite y el agua. Posteriormente, se añadieron los

ingredientes sólidos. En el caso del batido con harina de nuez, HN se humedeció con la mitad de la leche y se añadió junto con los ingredientes sólidos. Luego se vertió la mezcla (100 g) en moldes (6 cm × 9,5 cm) y se horneó a 180 °C durante 15 minutos (Lanin II-Panier, Argentina). Se realizaron al menos dos lotes independientes por formulación.

Calidad panadera de los budines

La calidad global de los productos alimenticios es importante para determinar el éxito que tendrá un determinado alimento. Sin embargo, en términos globales la calidad es una propiedad bastante subjetiva que depende en gran medida de la percepción del consumidor. No obstante al hablar de calidad panadera existe un conjunto de atributos, que pueden ser medidos, como el volumen específico, el color, la textura de miga y la corteza, entre otros. Estos atributos brindan una idea de qué tan bien el producto panificado cumplirá con los requisitos esperados por el consumidor (Cauvain, 2003).

5.3.4. Parámetros fisicoquímicos

5.3.4.1. Disponibilidad y contenido de agua de la miga

La disponibilidad y la cantidad de agua en la miga son factores determinantes para la calidad de los productos panificados. Para determinar la actividad del agua de la miga (a_w) se procedió a desmigajar la parte central de los budines, en los recipientes plásticos de un equipo AquaLab (Decagon Devices-Inc., EE.UU.). El ensayo se realizó a 25 °C y por triplicado.

La determinación del contenido de humedad se realizó por secado en estufa (San Jor, San Martín, Argentina) a 105 °C hasta peso constante. Se usó la parte

central de los budines y el cálculo de la humedad de las muestras se realizó según la Ecuación 1. El ensayo se realizó por triplicado.

5.3.4.2. pH de la miga:

Los valores se determinaron a temperatura ambiente utilizando un pH-metro SevenMulti (Mettler-Toledo GmbH, Suiza) con un electrodo para muestras sólidas (n=6).

5.3.4.3. Volumen específico:

Los budines se pesaron y, a continuación, se determinó el volumen por desplazamiento de semillas de colza (n=12). El volumen específico [cm³/g] se calculó dividiendo el volumen por el peso respectivo.

5.3.4.4. Color de la miga y de la corteza:

Generalmente, el color es el primer atributo que el consumidor evalúa para definir la calidad de un alimento (Culver, Wrolstad y American Chemical Society, 2008). La harina de nuez debido a su color podría afectar el color de la miga y de la corteza de los budines, por lo cual se midió el color empleando un colorímetro (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta Inc., Japón). Para medir la intensidad del color marrón se usó el índice de pardeamiento (browning index, BI). El cual se calculó a partir del espacio CIE-XYZ usando las siguientes ecuaciones (Ecuación 22 y Ecuación 23) (Buera, Lozano y Petriella, 1985) (n=20) (detalles del espacio de color en el apartado 3.3.6.1)

$$BI = \frac{100(x_c - 0,31)}{0,172}$$

Ecuación 22

Donde x_c es:

$$x_c = \frac{X}{(X + Y + Z)}$$

Ecuación 23

x_c es la coordenada de cromaticidad CIE y X,Y y Z son los valores triestímulo de las muestras.

5.3.4.5. Porosidad estructural de la miga

Un aspecto relevante en la apariencia de los productos panificados es la porosidad de la miga, este atributo depende del tipo de producto panificado. La porosidad de la miga difiere si se habla de un bollo, de un pan francés o de un budín. Estas diferencias vienen dadas por varios factores, por ejemplo, el tipo de ingredientes usados y los procesos de panificación que fueron empleados (Rathnayake, Navaratne y Navaratne, 2018). Una forma objetiva de evaluar la porosidad estructural de la miga es mediante el análisis de imagen. Para esto, se obtuvieron imágenes de rebanadas provenientes de la parte central de los budines frescos (n=12) con un escáner HP-Scanjet-4070 (Hewlett-Packard, Palo Alto, EE.UU.). A continuación, se analizó el centro de cada rebanada con el programa ImageJ v1.53e (Wayne Rasband y NIH, Bethesda, EE.UU.) (Correa et al., 2021). Para lo cual, se recortó un cuadrado, de 2,5 cm × 2,5 cm, del centro de las rebanadas. Las imágenes recortadas se transformaron a escala de grises (8 bits) y, posteriormente, se segmentaron ajustando el umbral de binarización, en cada caso. Esto último con la finalidad de evitar que las partículas de nuez de HN, que son partículas más oscuras, sean considerados alveolos. A partir de las imágenes binarizadas, los parámetros determinados fueron: fracción de aire [%], densidad celular [número de células/cm²], circularidad (0 a 1) y dimensión fractal. Además,

se trazó el gráfico de la intensidad superficial de las migas, a partir del centro de las rebanadas escaneadas, donde los ejes x e y son los lados (2,5 cm × 2,5 cm), y el eje z es la intensidad del color de 0 a 150.

5.3.5. Análisis de la textura de miga y corteza

5.3.5.1. Análisis del perfil de textura (TPA) de miga

El análisis de perfil de textura, conocido como TPA por sus siglas en inglés (Texture Profile Analysis), es un ensayo experimental que evalúa el comportamiento textural de la miga cuando es sometida a dos compresiones consecutivas (Figura 45). Esto con el fin de imitar al proceso de masticación y registrar la deformación de la miga al aplicar una fuerza externa.

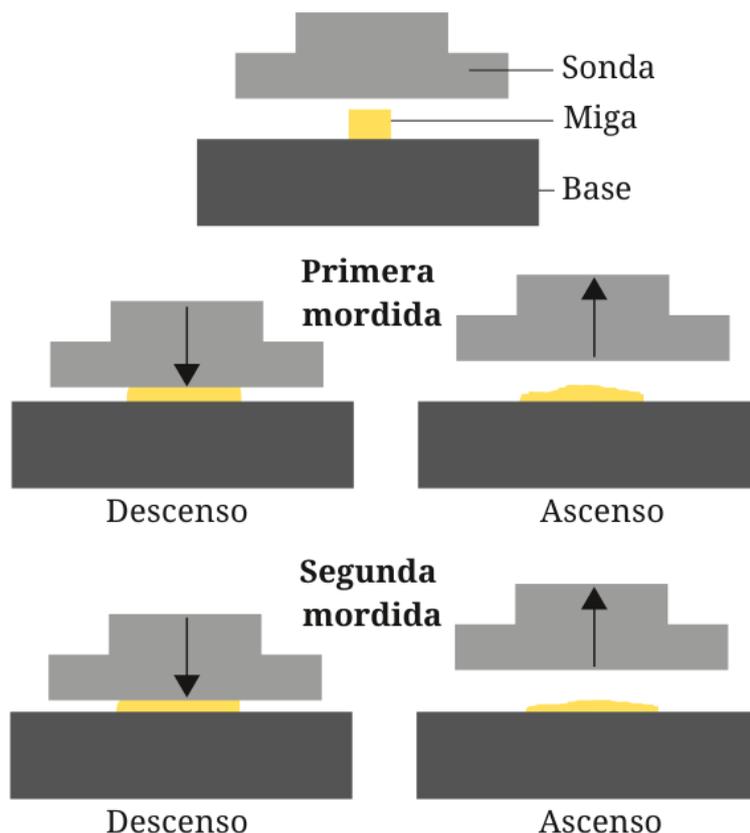


Figura 45. Diagrama esquemático de las dos compresiones necesarias para el análisis de perfil de textura de la miga. Adaptado de Bourne (2002a)

En consecuencia, al graficar la fuerza en función del tiempo, se obtiene el perfil de textura de la miga (Figura 46), a partir del cual es posible calcular los siguientes parámetros texturales (Bourne, 2002a):

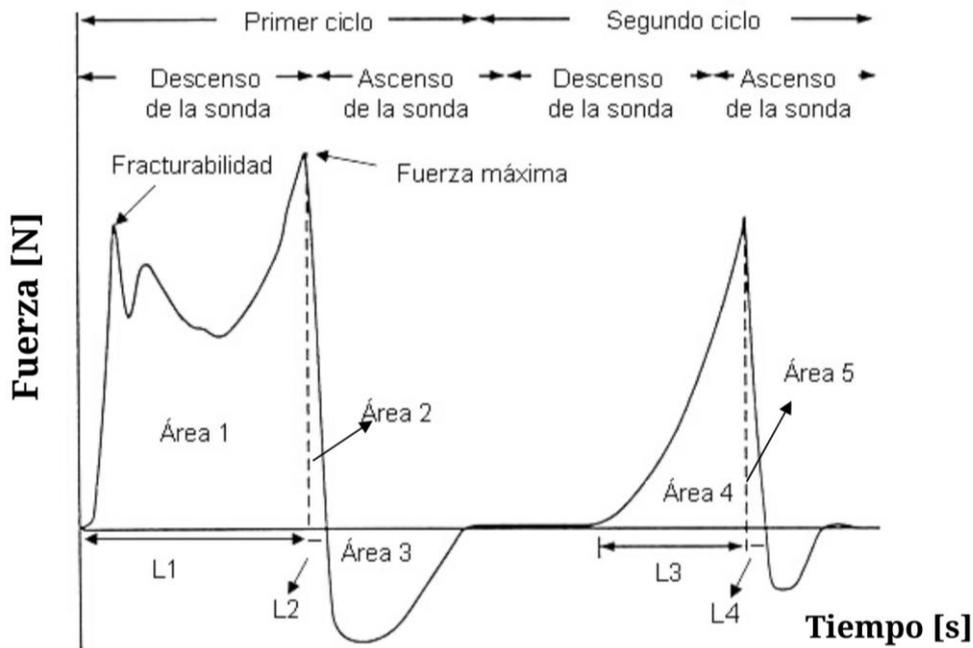


Figura 46. Esquema de un perfil de textura con sus respectivas partes. Fuente: (Bourne, 2002a)

- Firmeza: fuerza máxima registrada durante el primer ciclo de compresión; en este punto se realiza la máxima deformación del alimento.
- Cohesividad: cociente entre el área positiva del segundo ciclo (Área 4 + Área 5) y el área positiva del primer ciclo (Área 1 + Área 2); se relaciona con la fuerza de los enlaces entre los componentes que forman el alimento
- Elasticidad: cociente entre la distancia necesaria para alcanzar el máximo del segundo pico (L3) y la distancia para alcanzar el máximo del primer pico (L1); se relaciona con la recuperación del alimento luego de la primer compresión.
- Adhesividad: área del pico negativo (Área 3); se relaciona con el trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y los materiales con los cuales tome contacto

- Resiliencia: cociente entre el área del primer ciclo luego del máximo (Área 2) y el área del primer ciclo hasta alcanzar el máximo (Área 1); se relaciona con la recuperación instantánea del alimento.
- Consistencia: suma de las áreas del primer (Área 1+Área 2) y del segundo pico (Área 4 + Área 5).
- Fracturabilidad: es el pico inicial de fuerza durante la primera compresión. Se refiere a la dureza con la cual el alimento se desmorona, cruje o revienta. No es común en el caso de la miga, pero si en otros productos más crujientes.
- Masticabilidad: es el resultado de multiplicar la firmeza \times la cohesividad \times la elasticidad, y se refiere a la fuerza necesaria para que el alimento esté listo para ser tragado.

Es así que, se analizaron las características texturales de la miga con un analizador de textura CT3 (AMETEK-Brookfield, EE.UU.). Para lo cual, se cortaron dos rebanadas (de 2 cm de grosor) del centro de cada budín y con la ayuda de un sacabocados (de 3 cm de diámetro) se extrajo una porción cilíndrica de cada una de ellas. Se utilizó una sonda cilíndrica plana (diámetro: 5,08 cm) para comprimir la miga en dos ciclos consecutivos hasta el 40% de su altura original (n=8) y se empleó el software TextureProCT (AMETEK-Brookfield, EE.UU.) para obtener los siguientes parámetros: firmeza, elasticidad, resiliencia, cohesividad y masticabilidad.

5.3.5.2. Relajación de la miga ante una compresión

Las muestras alimenticias pueden comportarse de manera diferente al ser sometidas a una fuerza externa que las deforme. Dependiendo de su comportamiento, pueden clasificarse como un líquido ideal o un sólido ideal,

presentando un comportamiento totalmente viscoso o totalmente elástico, respectivamente. No obstante, la mayoría de los alimentos son viscoelásticos, es decir, se encuentran en un espectro intermedio entre estos dos comportamientos ideales. En la Figura 47 se ilustran estos comportamientos. Es posible observar que, los sólidos elásticos ideales tienen una excelente capacidad para volver a su estado original y presentan una tensión y un módulo de relajación constantes en función del tiempo, mientras que la tensión de los líquidos viscosos ideales desciende a cero inmediatamente cuando se aplica la deformación. Los alimentos viscoelásticos que presentan un comportamiento intermedio se relajan gradualmente y con un punto final o de equilibrio dependiendo de la estructura del alimento (Whaley, Templeton y Anvari, 2019).

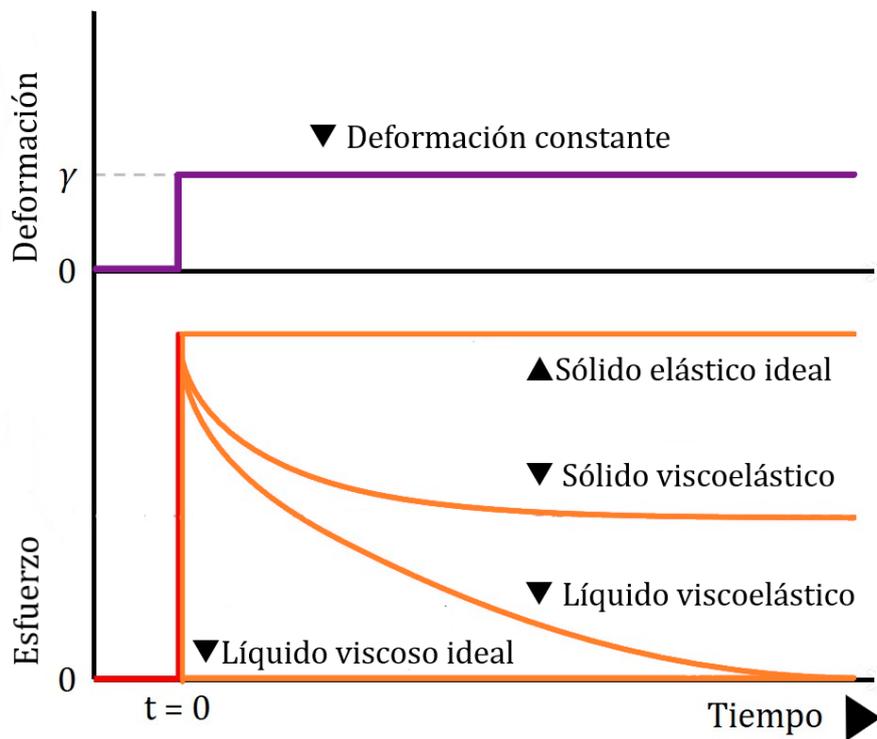


Figura 47. Esfuerzo resultante de la aplicación de una deformación constante sobre diferente tipo de materiales en un ensayo de relajación. Adaptado de Whaley y colaboradores (2019)

En este contexto, el ensayo de relajación consiste en someter a la muestra a una deformación constante por compresión y, a continuación, mantener dicha

deformación. El esfuerzo requerido para mantener el material viscoelástico con deformación constante disminuirá con el tiempo. Este fenómeno se denomina relajación del esfuerzo y se debe a una reorganización de la muestra en la escala molecular o microscópica (Kelly, 2015).

Para determinar el comportamiento exhibido por la miga con harina de nuez ante una compresión constante y mantenida en el tiempo, se realizó un ensayo de relajación con el empleo de un analizador de textura CT3 (AMETEK-Brookfield, EE.UU.). Para lo cual, cilindros de miga (diámetro: 3 cm - altura: 1,5 cm) se comprimieron hasta un 40% de su altura original y se registró el esfuerzo necesario para mantener la deformación a lo largo del tiempo. El tiempo total de la prueba fue de 2 minutos (n=6) (Correa et al., 2021). Al comprimir la muestra y se registra el esfuerzo necesario para mantener la deformación en el tiempo. Las curvas se ajustaron al modelo generalizado de Maxwell (Ecuación 24) con un decaimiento exponencial de segundo orden.

$$\sigma_{(t)} = \sigma_1 \times \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + \sigma_2 \times \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right) + \sigma_E \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde $\sigma_{(t)}$ es el esfuerzo en función del tiempo, en distintas zonas de la curva σ_1 y σ_2 son los esfuerzos de la miga, λ_1 y λ_2 son los tiempos de relajación de la miga y $\sigma_{(E)}$ es el esfuerzo tendiendo al equilibrio (Ozturk y Takhar, 2017; Steffe, 1996).

5.3.5.3. Determinación de dureza de la corteza

La formación de la corteza es de vital importancia en los productos panificados, debido a que proporciona gran parte de la resistencia, del sabor y la apariencia del producto terminado. En cuanto a definir la “corteza ideal” es necesario considerar el tipo de producto panificado. Es así que para el caso de un

pan francés donde una corteza ideal sería una muy crocante, para un pan de molde una corteza demasiado dura sería inaceptable (Cauvain, 2003; Roos, 2012) de igual modo con los budines. Es así que, durante el horneado a medida que se expulsa el agua y la corteza adquiere su dureza y color característicos, gran parte de los gránulos de almidón en la corteza conservan su forma, tamaño y aspecto (Chinachoti y Vodovotz, 2000). Por otro lado el sabor, el aroma y el color se desarrollan a partir de dos tipos de reacciones. Por un lado, por la caramelización de los azúcares que empiezan a fundirse entre 130 y 140 °C y por la interacción entre los azúcares y la materia proteica, denominada reacciones de Maillard, que comienzan a temperaturas superiores a los 115 °C (Roussel, Chiron y Paillard, 2002).

Para establecer cómo la harina de nuez afecta la formación de la corteza de los budines se midió su dureza con la ayuda de un analizador de textura CT3 (AMETEK-Brookfield, EE.UU.). La dureza de la corteza se midió utilizando una sonda acrílica de filo de cuchillo (anchura: 3 mm, longitud: 60 mm) y una velocidad de ensayo de 0,5 mm/s. La fuerza máxima [N] de la curva de penetración, al atravesar la corteza, se tomó como dureza de la misma (n=8).

5.3.6. Microestructura de la miga

5.3.6.1. Microscopía electrónica de barrido

El comportamiento de los alimentos en gran parte se ve afectado por la compleja interacción entre las características nanoscópicas, microscópicas y macroscópicas de los mismos (McClements, 2007). Esto es aún más relevante al usar ingredientes nuevos. Es así que, el estudio de la microestructura de la miga puede ayudarnos a comprender el comportamiento que tendrán los budines.

Con el fin de establecer cómo la harina de nuez afectará la microestructura de la miga se tomaron pequeñas porciones de miga y se fijaron con glutaraldehído [2,5 % v/v], se deshidrataron mediante inmersiones sucesivas en soluciones de etanol de 30 %, 70 %, 96 % y 100 %. Se mantuvieron las muestras 30 min a cada concentración. A continuación, se recubrieron con una película de oro. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200) para obtener micrografías a 500x y 1500x. Las micrografías fueron adquiridas en el "Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFi-LIMF)- Facultad de Ingeniería, UNLP, Argentina".

5.3.6.2. Microscopía confocal de láser de la miga

Debido a que la microscopía láser confocal permite observar la localización de los componentes mayoritarios como proteínas, fibra y gránulos de almidón presentes en las muestras, se la utilizó para evaluar la microestructura de las migas y además, para evaluar la afinidad de la clara de huevo sometida a un tratamiento térmico (simulando la cocción) por los fluoróforos usados. Se utilizaron los mismos fluoróforos y longitudes de onda (excitación y emisión) descritos en la sección 4.3.10. Sin embargo, con la diferencia que para la clara de huevo solamente se usó una mezcla de rodamina B y calcoflúor white.

Se rebanaron los budines por el centro y con la ayuda de un bisturí se extrajeron películas finas de la miga. Las películas se colocaron en portaobjetos cóncavos, estos portaobjetos tienen las medidas de largo y ancho estándar. Además tienen un espesor de 1,0 a 1,2 mm y una depresión en el centro de 0,35 a 0,45 mm, la que permite que las muestras no sobresalgan al colocar el cubreobjetos. Se colocaron las películas de la miga en los portaobjetos y luego se

añadió la solución que contenía los fluoróforos. Las migas se dejaron reposar durante una hora en la oscuridad. Finalmente, las migas se lavaron con agua destilada y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio.

Mientras que la clara de huevo en polvo (Ovobrand, Brandsen, Provincia de Buenos Aires, Argentina) se disolvió en agua destilada (1:1 p/p). Se calentó la disolución en baño de agua a ebullición por cinco minutos, luego se dejó enfriar y se la esparció en un portaobjetos. Luego de lo cual se añadió una mezcla de rodamina B y calcoflúor white. Después de una hora de reposo en la oscuridad, se lavó la muestra con agua destilada y, finalmente, se colocó el cubreobjetos.

A continuación, se observaron todas las muestras con un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón). Cada formulación se preparó por triplicado y se realizaron observaciones de diferentes campos a 4x y 20x.

5.3.7. Composición proximal de los budines

Los contenidos de proteínas (factor = 6,25), grasas, cenizas y fibra dietaria total de los budines GF se determinaron de acuerdo con los métodos AACC 46-12.01, 30-10.01, 08-01, 32-05.01, respectivamente (AACC, 2000). El contenido de humedad se determinó a 105 °C hasta peso constante. El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. La energía se calculó según los factores de Atwater (FAO, 2003). Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

5.3.8. Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines

Al ser la harina de nuez un subproducto de la industria aceitera, con un alto contenido de lípidos insaturados, su adición en los budines puede modificar significativamente la composición de los ácidos grasos en relación al budín control.

Para la determinación, por cromatografía gaseosa, del perfil de los ácidos grasos de la miga se utilizó la metodología planteada por Park y Goins (1994). Se pesaron 0,5 gramos de miga proveniente de la parte central de los budines en tubos hach. A continuación, se añadieron 100 μL de diclorometano (CH_2Cl_2) y 1 mL de NaOH [0,5 N] en metanol. Antes de cerrarlos y para asegurar una atmosfera inerte se insufló nitrógeno gaseoso. Los tubos se calentaron a ebullición en un baño de agua durante 10 minutos. Tras este tiempo, los tubos se enfriaron y se añadió 1 mL de trifluoruro de boro (BF_3) al 14 % en metanol. Una vez más, se insufló nitrógeno y se llevaron nuevamente los tubos al baño de agua para calentarlos por otros 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfriaron y se añadieron 1 mL de agua miliQ y 0,5 mL de hexano (calidad HPLC) y se homogenizó la mezcla. Los metilésteres de los ácidos grasos se encuentran disueltos en el hexano, por ello con la finalidad de separar las fases, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos usando una centrifuga Rolco CM 2036 Duron (Rolco Srl, Argentina). Inmediatamente después, el hexano se separó y filtró (0,45 μm) directo a viales color ámbar. Finalmente, las muestras se analizaron en un cromatógrafo gaseoso siguiendo las condiciones de corrida descritas en la sección 3.3.4.2 para la harina de nuez. Con la finalidad de poder comparar las distintas formulaciones, también se determinó el perfil de ácidos grasos del aceite de girasol.

5.3.9. Análisis sensorial de los budines

Se realizó una prueba de aceptabilidad para comparar las muestras Control y HN15. Se reclutaron 48 consumidores no entrenados de entre 19 y 51 años (50% mujeres, 38% hombres y 13% prefirieron no ser categorizados). Las muestras se colocaron en platos de plástico y se codificaron con números aleatorios de tres

dígitos. Las muestras se asignaron al azar a cada evaluador, y se les pidió que bebieran agua entre muestra y muestra. Además, se pidió a los consumidores que evaluaran primero todos los atributos de una muestra y luego los de la segunda. Casi el 67% de los evaluadores declararon que consumían ocasionalmente productos sin gluten. Evaluaron el aspecto, la textura, el sabor, el color y la aceptabilidad general de las muestras en una escala hedónica que iba de 1 (no me gusta mucho) a 7 (me gusta mucho).

5.3.10. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba LSD para determinar la existencia de medias estadísticamente diferentes ($\alpha: 0,05$). Todas las pruebas se realizaron con el programa Statgraphics - Centurion - XVII Versión-17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc, EE.UU.). El ajuste de los datos de relajación de miga a la Ecuación 24 se realizaron con OriginPro8 v8.0724 (OriginLab Corporation, EE.UU.).

5.4. Resultados y discusión

Calidad panadera de los budines

5.4.1. Parámetros fisicoquímicos de los budines

5.4.1.1. Volumen específico

Un buen indicador de la esponjosidad de los budines es el volumen específico. El aumento de la concentración de la HN en los budines aumentó su volumen específico (Figura 48).

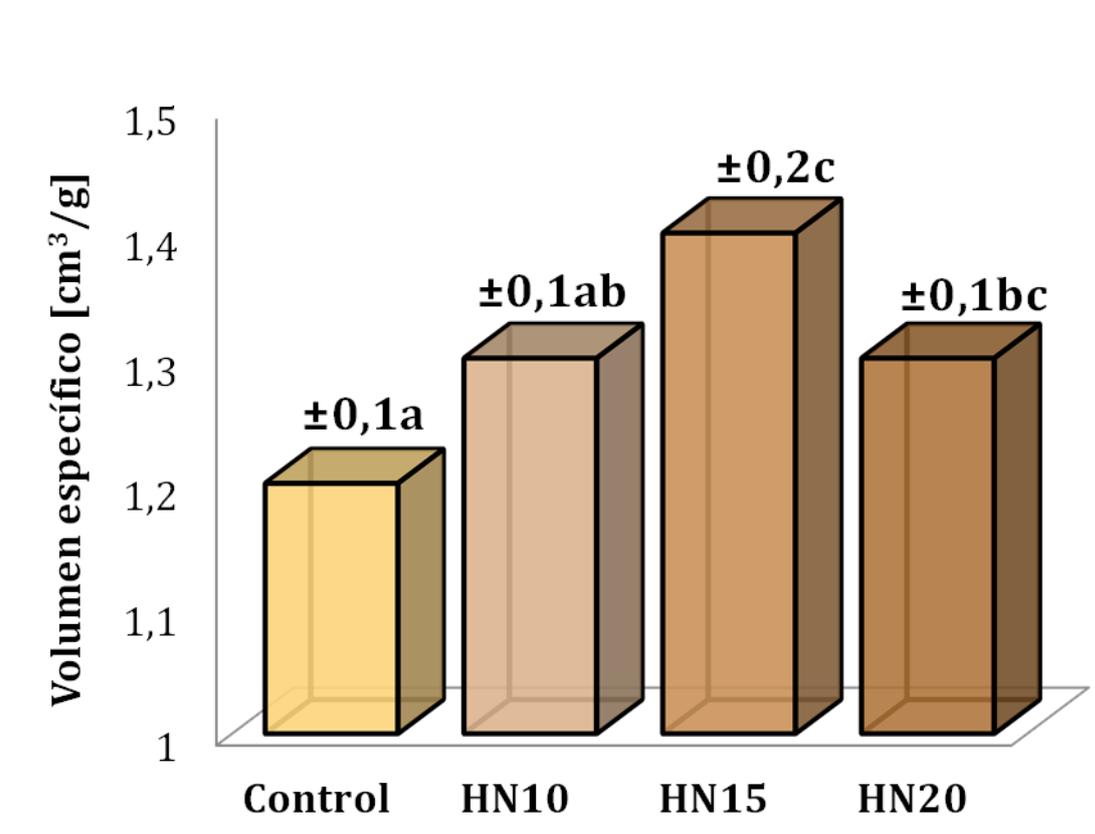


Figura 48. Volumen específico de los budines libres de gluten con harina de nuez. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$)

La formulación HN15 mostró el máximo volumen; el volumen específico fue ligeramente inferior al aumentar el contenido de la HN en HN20. Esta tendencia se informó previamente en bizcochuelos sin gluten de castaña y harina de arroz

(Demirkesen et al., 2010). Los resultados obtenidos aquí se atribuyen al aumento de la consistencia del batido con la mayor concentración de la HN ya que la consistencia del batido es esencial para el volumen final de los budines. En la Figura 49 se observa un corte transversal del centro de los budines.

5.4.1.2. Disponibilidad y contenido de agua en la miga

La distribución del agua es importante en la calidad tecnológica de los productos de panificación porque modifica la percepción de la textura. Todas las formulaciones mostraron valores de *aw* relativamente altos (alrededor de 0,96). La única formulación que presentó una diferencia estadísticamente significativa fue HN15, pero esta diferencia carece de impacto práctico (Tabla 22). En este sentido, la adición de la HN disminuyó ligeramente la humedad en esas formulaciones (Tabla 22).

Tabla 22. Parámetros fisicoquímicos de los budines frescos con la harina de nuez

	<i>aw</i>	Humedad[%]	pH
Control	0,962±0,002 ^b	38,9±0,3 ^b	7,94±0,09 ^d
HN10	0,962±0,003 ^b	38,8±0,3 ^b	6,46±0,09 ^c
HN15	0,959±0,003 ^a	38,0±0,4 ^a	6,36±0,06 ^b
HN20	0,962±0,002 ^b	38,3±0,4 ^a	6,15±0,06 ^a

Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Asimismo, el aumento de la concentración de la HN disminuyó los valores de pH (Tabla 22). Estos oscilaron entre 7,94 (control) y 6,15 (HN20). Aguilar et al. (2016) también informaron una reducción del pH en bizcochuelos sin gluten a medida que aumentaron la adición de harina de castaña, lo que atribuyeron a la presencia de ácidos orgánicos en la harina de castaña.

5.4.1.3. Color instrumental de corteza y miga de los budines

El color es una característica esencial en los alimentos y es un elemento que contribuye a la preferencia del consumidor. La corteza presenta una gran variabilidad de color debido a la naturaleza del proceso de horneado (reacciones de Maillard y caramelización de los azúcares) (Purlis, 2010). Contrariamente a lo esperado, la adición de la HN disminuyó la intensidad del color marrón en la corteza de los budines. Además, se observó una tendencia a obtener cortezas más uniformes, como muestra el coeficiente de variación (Tabla 23). Por otra parte, la intensidad del color marrón de la miga aumentó progresivamente con la adición de la HN. Este cambio se debe al color característico de los tegumentos de la nuez. La diferencia de color en la miga de los budines es visible en la Figura 49 que muestra las rebanadas de los budines con la HN.

Tabla 23. Índice de pardeamiento (browning index, BI) de los budines frescos con harina de nuez

	Corteza		Miga
	BI	CV de BI* [%]	BI
Control	62±10 ^c	15,5	26,4±0,7 ^a
HN10	60±9 ^{bc}	15,1	29±2 ^b
HN15	58±8 ^{ab}	14,5	31±1 ^c
HN20	56±7 ^a	12,6	32±1 ^d

Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

BI: browning index

Coeficiente de variación: $CV = (\text{Desvío estándar} / \text{Promedio}) \times 100$.

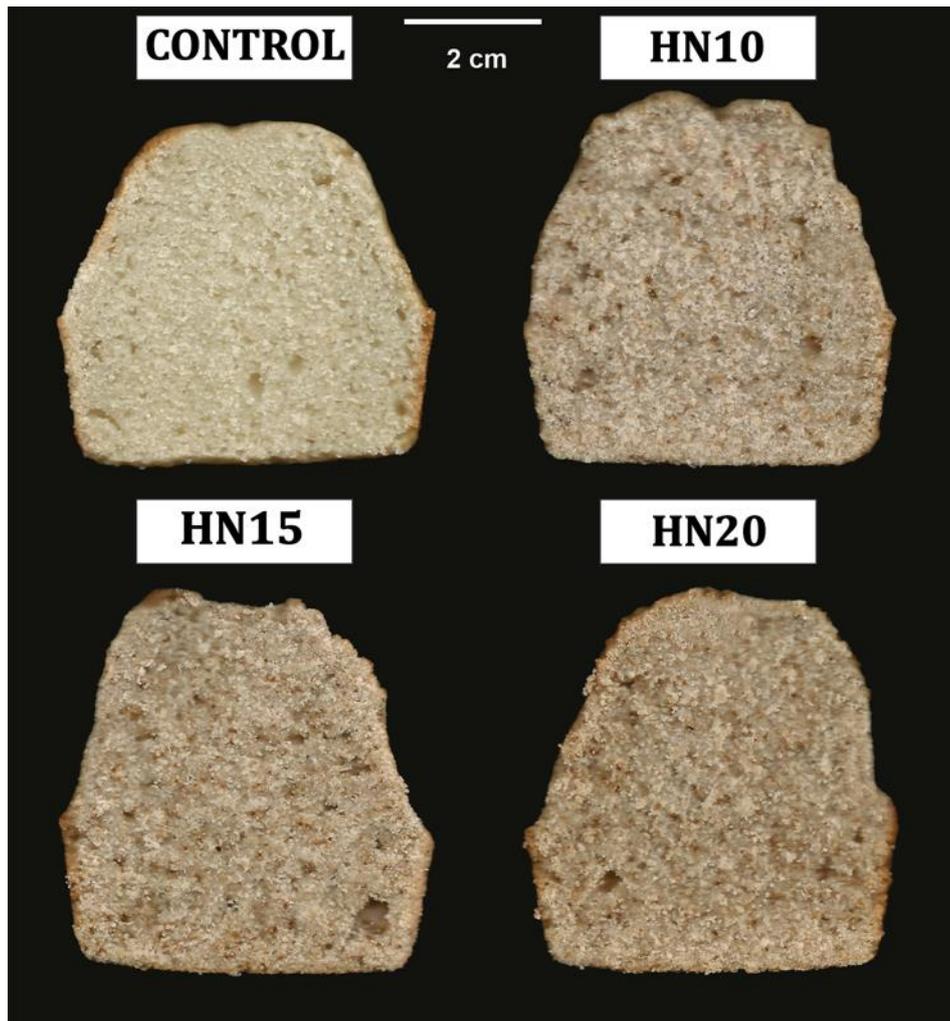


Figura 49. Rodajas cortadas transversalmente del budín control y de los budines con harina de nuez

5.4.1.4. Porosidad estructural de la miga

Los parámetros de porosidad de la miga se muestran en la Tabla 24. La fracción de aire aumentó con la adición de HN, siguiendo la misma tendencia que el volumen específico. Turabi y colaboradores (2010) obtuvieron valores de área similares en bizcochuelos de harina de arroz utilizando hidrocoloides. Al mismo tiempo, las partículas de HN afectaron la forma de los alvéolos, lo que se reflejó en los valores de circularidad. Se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones control y con HN, pero no entre los budines con diferente agregado de HN.

Tabla 24. Porosidad estructural de la miga

	Fracción de aire [%]	DC [Número/cm ²]	Circularidad	Dimensión fractal
Control	31±1 ^a	68±5 ^d	0,26±0,02 ^b	1,72±0,01 ^a
HN10	32±1 ^b	52±2 ^c	0,16±0,01 ^a	1,76±0,01 ^b
HN15	34,2±0,9 ^c	45±3 ^a	0,15±0,02 ^a	1,78±0,01 ^c
HN20	32,8±0,7 ^b	49±3 ^b	0,16±0,01 ^a	1,77±0,01 ^{bc}

Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

DC: densidad de celdas.

Para objetos irregulares como las migas de budín, las medidas convencionales como la longitud y el área, a veces, no son totalmente representativas y, la dimensión fractal (DF) es útil para caracterizarlas (Theiler, 1990). La DF sirve como índice de rugosidad morfológica y resume la complejidad de los alvéolos irregulares de las migas de budines. El uso de la HN provocó un ligero pero significativo aumento de la DF con respecto al budín control (Tabla 24).

La Figura 50 muestra los gráficos de la intensidad superficial de las migas. En estos gráficos, los valles representan los alvéolos de la miga (alv.), y las partículas más oscuras (PH) corresponden a las estructuras restantes de la HN. Las gráficas de las formulaciones con HN (Figura 50 b-d) presentan un aspecto más irregular, lo que está relacionado con una mayor fracción de aire y una matriz más compleja, como lo reflejó la DF.

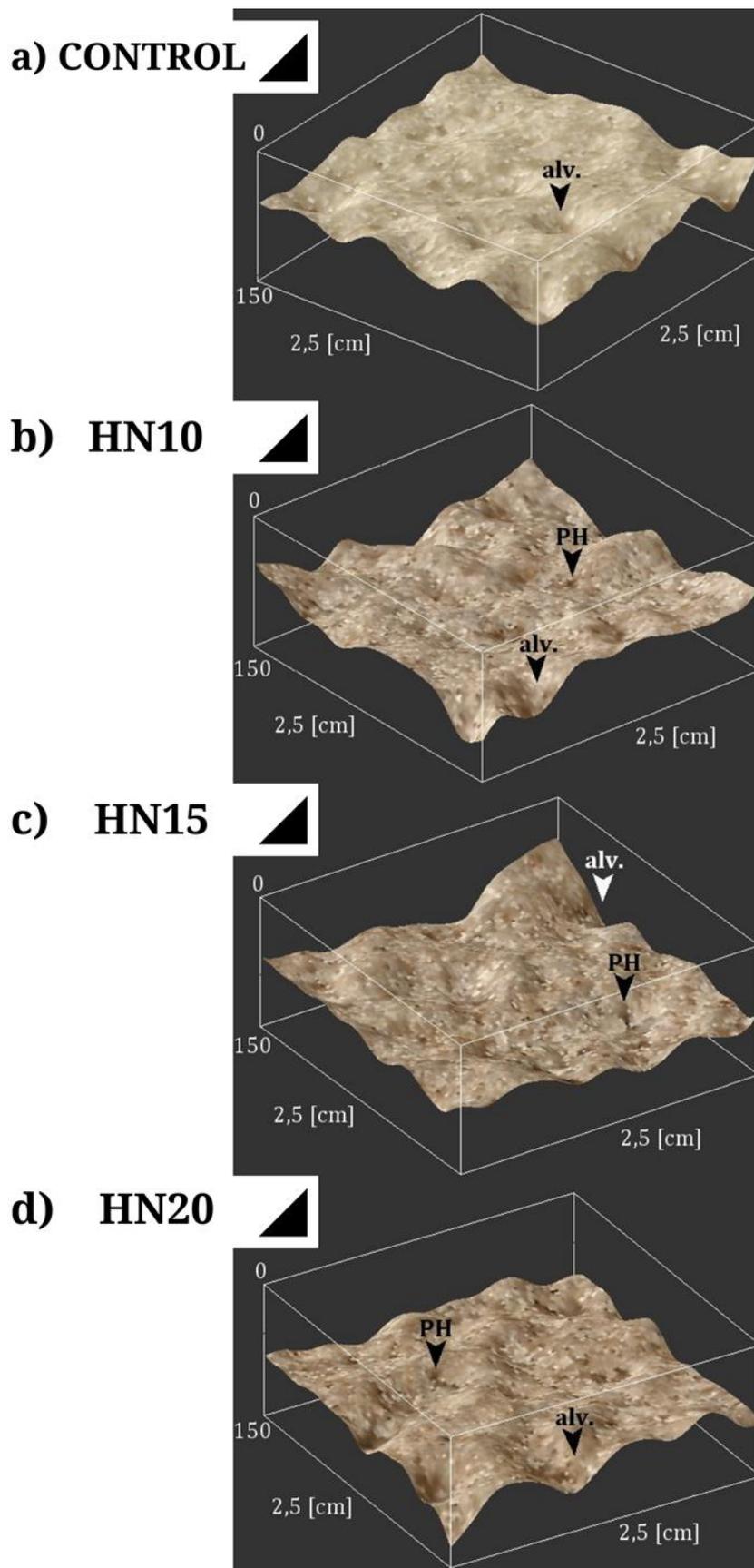


Figura 50. Gráficos de la intensidad superficial de las migas con la harina de nuez. alv.= alveolos y PH = partículas de la harina de nuez

5.4.2. Análisis de la textura de miga y corteza

El análisis de la textura de los budines es imperativo para poder definir la calidad panadera de los mismos. Con esta finalidad se evaluaron el perfil de textura de la miga, se estudió la relajación de la miga ante una compresión y la dureza de la corteza.

5.4.2.1. Análisis del perfil de textura (TPA) de la miga

La firmeza, la resiliencia, la cohesividad, la elasticidad y la masticabilidad son importantes para la aceptación del consumidor. En la Tabla 25 se comparan estos parámetros de textura de las migas de los budines con HN. La firmeza de los budines sólo mostró un aumento considerable en HN20; el mismo efecto se observó en pan sin gluten con harina de castaña (Aguilar et al., 2016). Asimismo, la cohesividad, la elasticidad y la resiliencia están relacionadas con la recuperación de la miga tras la compresión. Estos parámetros mostraron una ligera disminución a medida que aumentaba HN. Por último, la masticabilidad también disminuyó con la adición de HN, lo que demuestra que los budines con HN podrían ser más fáciles de masticar.

Tabla 25. Parámetros texturales de las migas

	Firmeza*	Resiliencia	Cohesividad	Elasticidad	Masticabilidad*
Control	26±4 ^a	0,35±0,01 ^b	0,55±0,02 ^b	0,86±0,02 ^b	12,9±0,9 ^c
HN10	25±2 ^a	0,24±0,01 ^a	0,44±0,03 ^a	0,80±0,02 ^a	9,2±0,9 ^a
HN15	26±2 ^a	0,25±0,02 ^a	0,45±0,04 ^a	0,80±0,03 ^a	9±1 ^a
HN20	29±4 ^b	0,25±0,02 ^a	0,46±0,03 ^a	0,81±0,02 ^a	11±2 ^b

Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Firmeza y masticabilidad en [N].

5.4.2.2. Relajación de la miga

Los ensayos de relajación de esfuerzos se han utilizado para evaluar el comportamiento viscoelástico de sistemas sólidos, como las migas (Correa et al., 2021). En estos ensayos se comprime la muestra y se registra el esfuerzo necesario para mantener la deformación en el tiempo. En la Figura 51 se muestra un ejemplo del ajuste de una curva de relajación para la miga HN20.

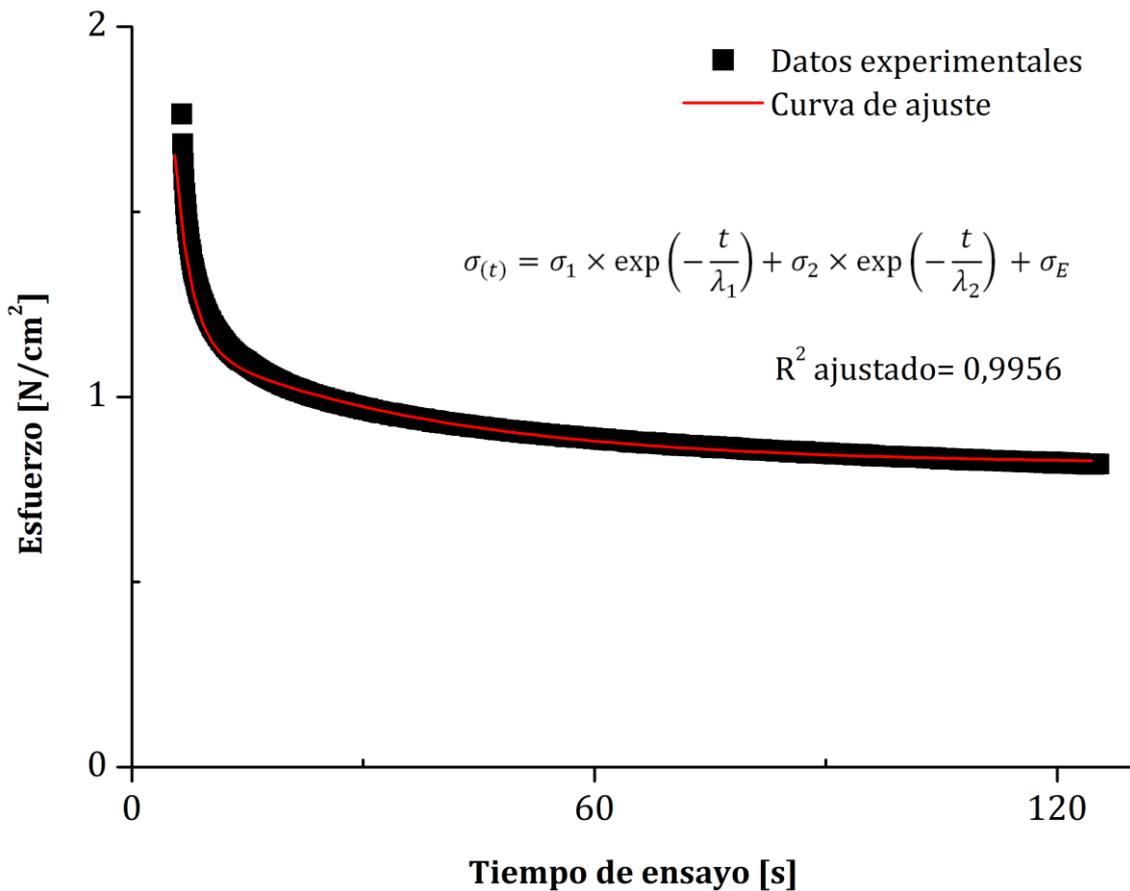


Figura 51. Curva de relajación para la miga HN20 ajustada al modelo de Maxwell (Ecuación 24)

Las curvas de las distintas formulaciones se ajustaron al modelo generalizado de Maxwell (Ecuación 24) con un decaimiento exponencial de segundo orden, mostrando que en la relajación de las migas intervienen dos mecanismos moleculares (Tabla 26). La primera zona de decaimiento está relacionada con

moléculas pequeñas que se relajan rápidamente, lo que se refleja en los bajos tiempos de relajación (λ_1), y se relaciona con un comportamiento más viscoso. Por otro lado, los valores más altos de λ_2 se asocian a movimientos más lentos de los polímeros de mayor peso molecular, indicando un comportamiento más parecido al de los sólidos (zona intermedia de la curva). La adición de HN no afectó a la relajación de los polímeros de alto peso molecular, ya que no hubo diferencias significativas entre las formulaciones

Tabla 26. Tiempos de relajación de la miga de los budines ajustados con el modelo generalizado de Maxwell

	Tiempos de relajación [s]		R ² ajustado
	λ_1	λ_2	
Control	2,1±0,1 ^b	32,6±0,8 ^a	0,9950
HN10	2,0±0,2 ^a	31±1 ^a	0,9945
HN15	2,0±0,1 ^a	32,3±0,9 ^a	0,9945
HN20	1,9±0,2 ^a	32±1 ^a	0,9944

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.4.2.3. Dureza de la corteza

Es importante recalcar que la formación de la corteza es de gran importancia debido a que proporciona gran parte de la resistencia, del sabor y la apariencia de los budines. En cuanto, a la dureza de la corteza [N] fue de 10,4±0,9^a, 10,2±0,9^a, 10±1^a y 10,1±0,8^a para el control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones, lo que demuestra que la HN no afectó a la formación de la corteza. Durante el horneado, gran parte del agua presente en la corteza se evapora rápidamente por lo que se restringe el

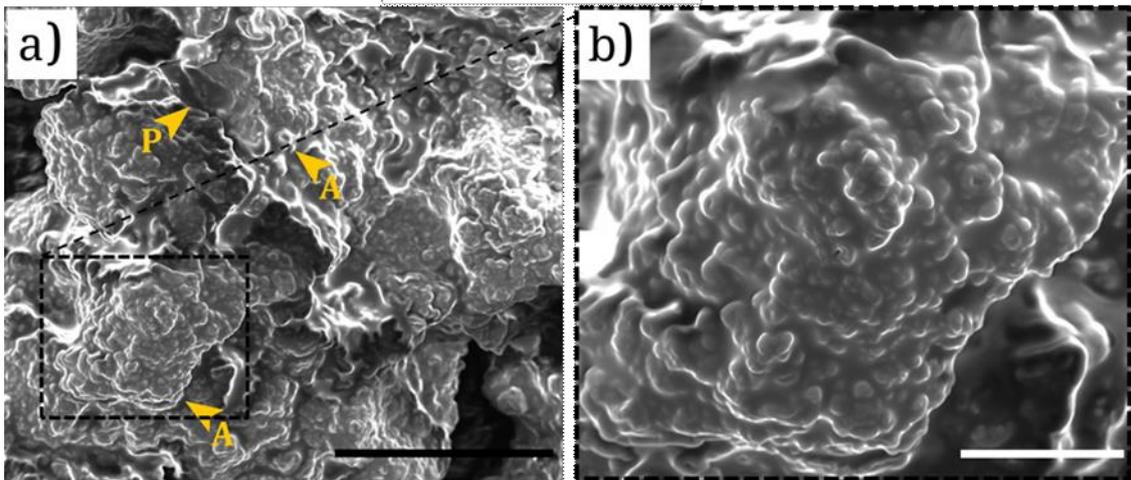
agua disponible para la gelatinización, lo que ocasiona que gran parte de los gránulos de almidón presentes en ésta conserven su tamaño y forma.

5.4.3. Microestructura de la miga

5.4.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

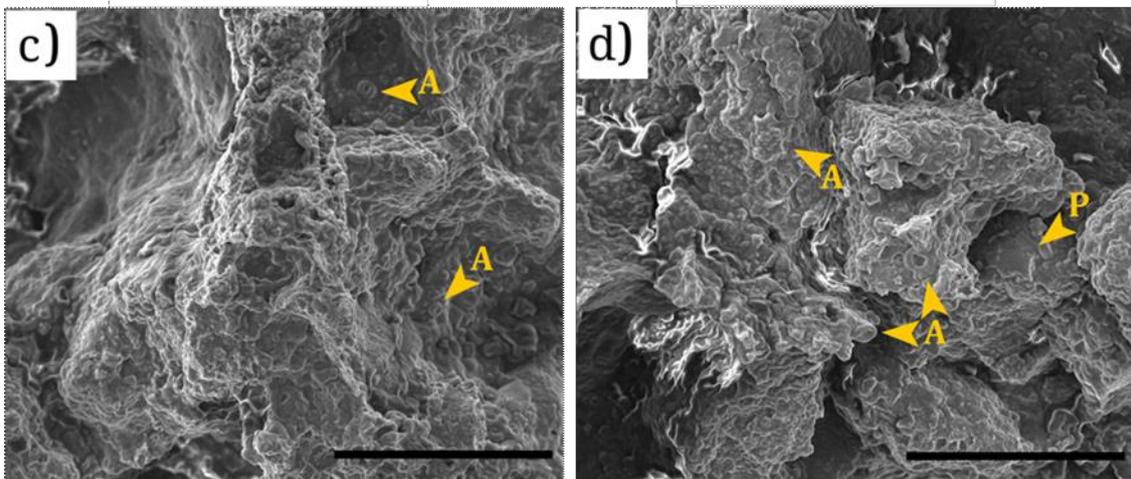
Las micrografías de la miga control (Figura 52a y b) y de las formulaciones con HN (Figura 52c-f) muestran una matriz formada por películas lisas de amilosa lixiviada y disposiciones rugosas atribuibles a proteínas donde se observan incrustados gránulos de almidón parcialmente gelatinizados. Como era de esperar, las micrografías de la miga control presentan un mayor contenido de gránulos de almidón (Figura 52a: 500×) que las migas con HN (Figura 52c-e: 500×). Los gránulos de almidón más prominentes, de la mandioca y el maíz, se observan más hinchados que los más pequeños del arroz en todas las muestras. Además, los gránulos de arroz se observan aglomerados, mientras que los de maíz y mandioca están más dispersos (Figura 52b: 1500×). Las migas presentan una matriz heterogénea y discontinua y en el caso de HN20 mucho más compacta (Figura 52f: 1500×).

CONTROL ▼



HN10 ▼

HN15 ▼



HN20 ▼

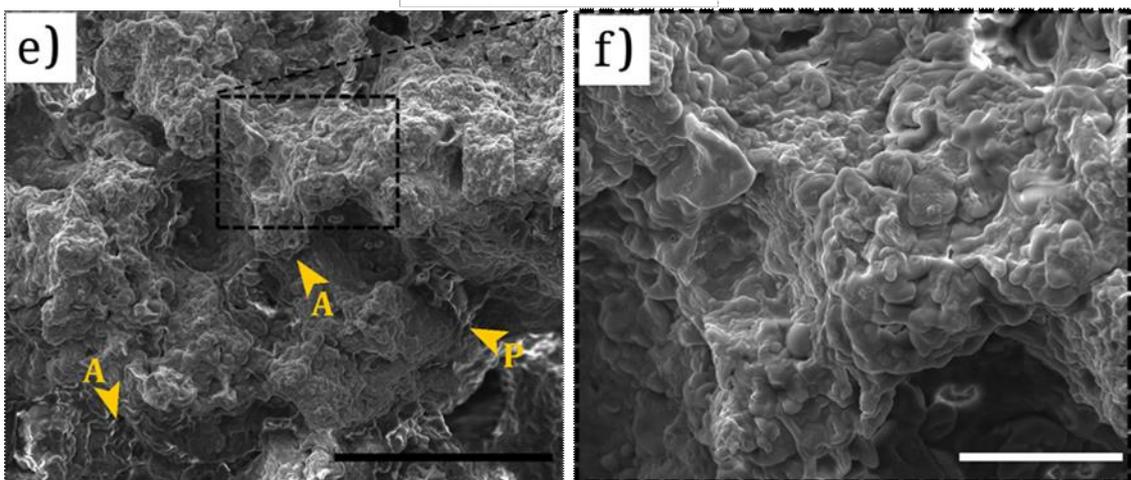


Figura 52. Micrografías de las migas de budines por SEM. (a, c, d y e: 500×) y (b y f:1500×). Las barras negra y blanca corresponden a 200 y 50 μm , respectivamente. A=almidón, P=proteína

5.4.3.2. Microscopía confocal de láser

La microscopía láser confocal permite diferenciar componentes mayoritarios de los alimentos mediante el uso de distintos fluoróforos. Esto debido a que, generalmente cada fluoróforo marca un componente en particular. Es así que se usó CSLM para evaluar la microestructura de las migas con la adición de la harina de nuez en las distintas formulaciones.

Al igual que para las micrografías de los batidos, para las migas se utilizaron dos mezclas de fluoróforos, que se usaron por separado. La mezcla 1 formada por rodamina B, FITC y calcoflúor y la mezcla 2 formada por rodamina B, rojo Nilo y calcoflúor. Es importante recalcar que al utilizar varios marcadores fluorescentes simultáneamente, se espera que cada fluoróforo tiña a una estructura o componente particular permitiendo, así, identificar la ubicación y distribución de estos componentes en las migas.

Como se señaló anteriormente, el fluoróforo FITC se une a las proteínas y a los gránulos de almidón emitiendo un color verde amarillento, la rodamina B es un colorante rojo que se une preferentemente a las proteínas pero también puede unirse a polisacáridos (Correa et al., 2014b; Rodríguez-García et al., 2012), el calcoflúor se une fuertemente a estructuras que contienen celulosa (Öhgren, Lopez-Sanchez y Lorén, 2019) y quitina, dando un color azul, lo que permite su asociación a la fibra, y por último, el rojo Nilo se une a lípidos tiñéndolos de color verde (Nicholson y Marangoni, 2019). El FITC y el rojo Nilo no se utilizaron juntos ya que absorben y emiten a la misma longitud de onda, por lo que no se podría distinguir su señal si se emplearan en forma simultánea.

En la Figura 53 se muestra una micrografía de clara de huevo coagulada por calor y posteriormente teñida con una combinación de rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Además, en la Figura 54 se muestran las micrografías de las migas de las formulaciones Control y HN10 teñidas con la mezcla 1 con los fluoróforos: FITC, rodamina B y calcoflúor white y en la Figura 55 se muestran las muestras HN15 y HN20 teñidas con los mismos fluoróforos. En las micrografías los canales de fluoróforos se encendieron y apagaron selectivamente para diferenciar más fácilmente los componentes dentro de las distintas muestras. Con respecto a la mezcla 1, las imágenes con a y a') muestran todos los canales encendidos, mientras que en las imágenes b, b' y b'') el canal de FITC fue apagado para quitar el efecto verde que tiñe a los almidones. En las imágenes c') se apagó el canal de rodamina B y finalmente las imágenes con d y d'') solamente el canal correspondiente al calcoflúor se mantuvo encendido.

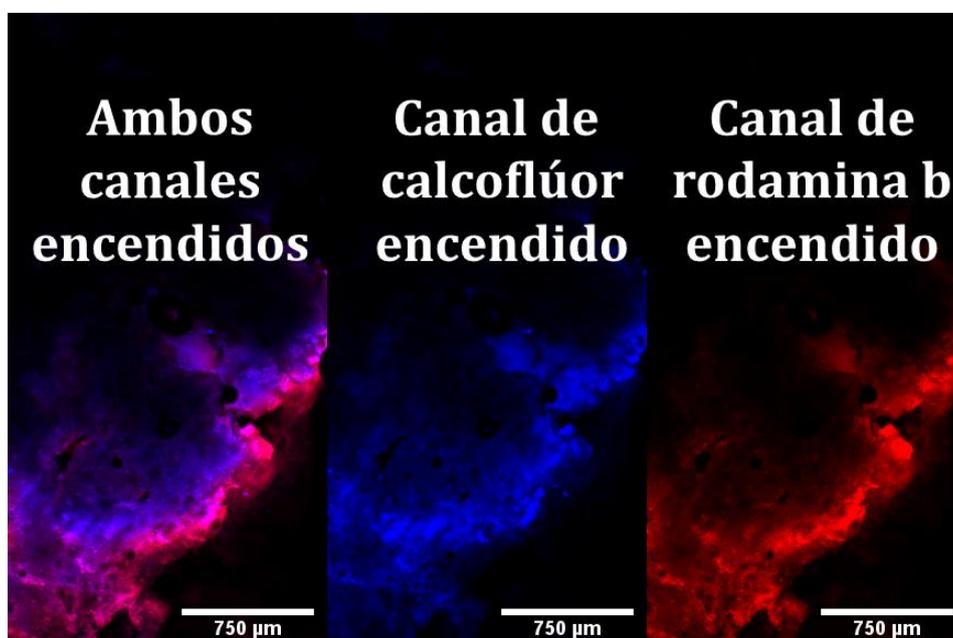


Figura 53. Micrografía a 4x por CSLM de clara de huevo coagulada por calor teñida con calcoflúor white y rodamina B

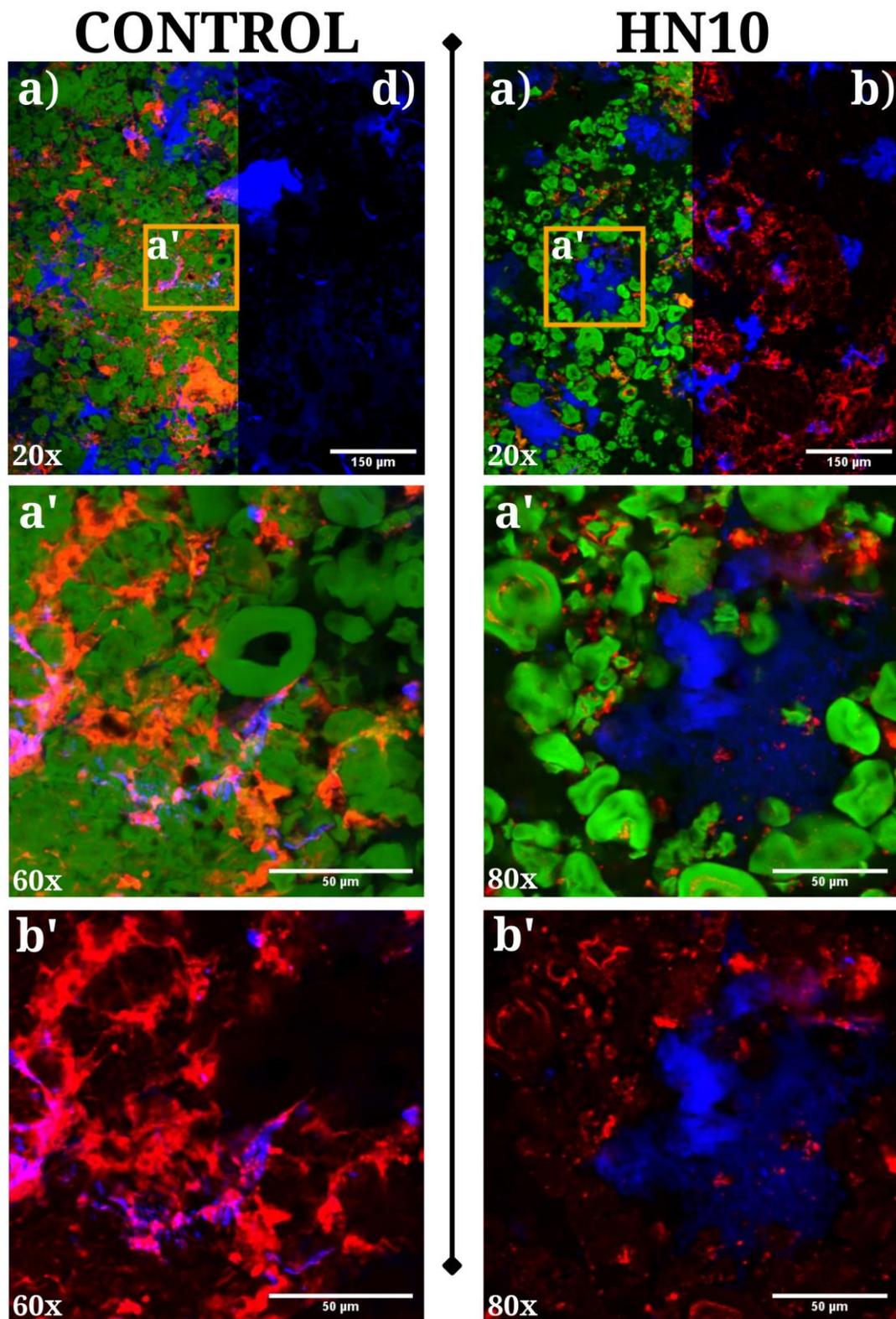


Figura 54. Micrografías de la miga Control y HN10 por CSLM. Muestras teñidas con FITC, rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b y b') se apagó el canal FITC y d) sólo el canal CF está encendido. a' y b' son las imágenes provenientes de los recuadros anaranjados con mayor magnificación

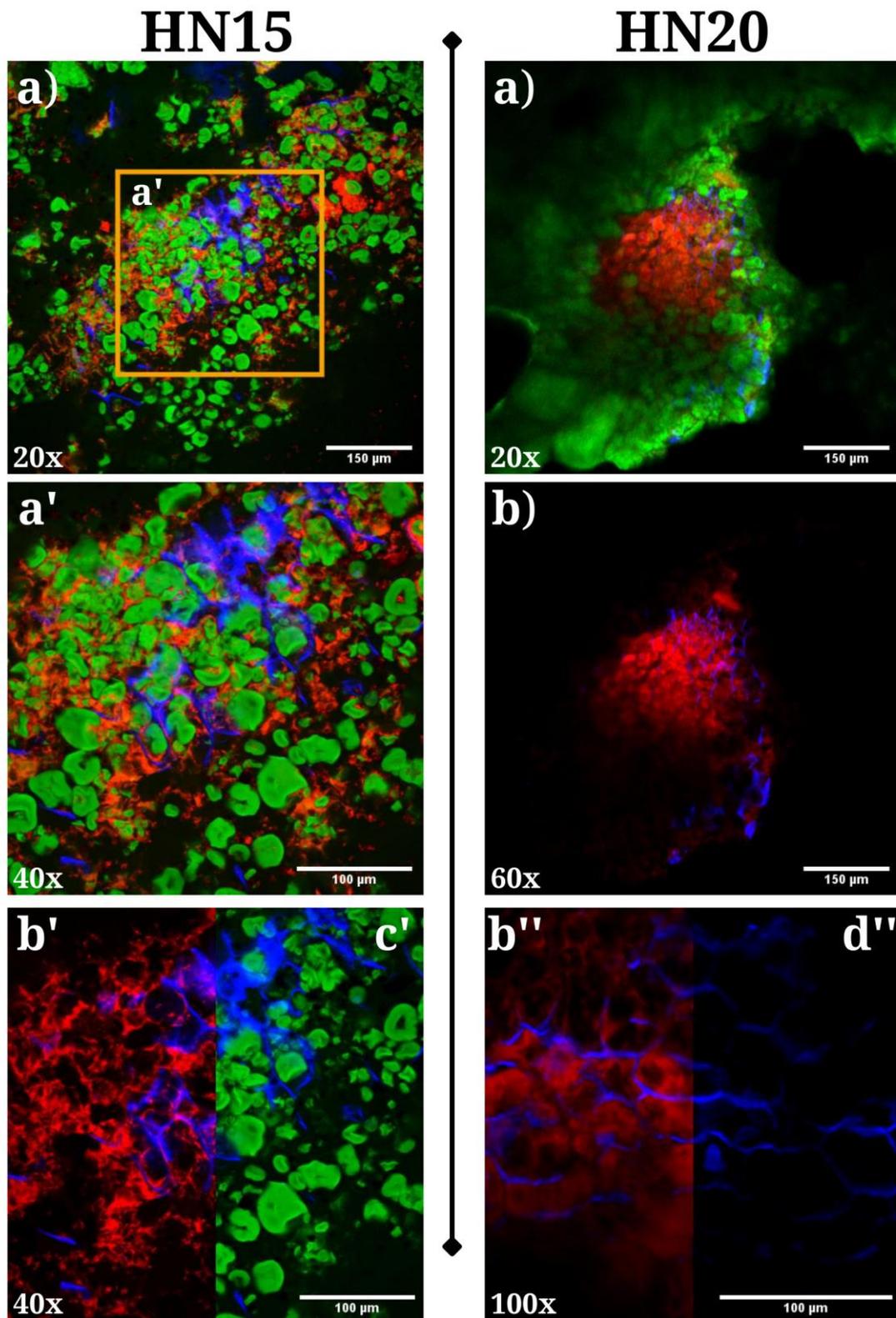


Figura 55. Micrografías de la miga HN15 y HN20 por CSLM. Muestras teñidas con FITC, rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b, b' y b'') se apagó el canal FITC, c y c') se apagó el canal de RB y d y d'') sólo el canal CF está encendido. a' y b'c' son las imágenes provenientes del recuadro anaranjado con mayor magnificación

En la Figura 54 en la miga del budín control se observa claramente, en color verde, la presencia mayoritaria de gránulos de almidón parcial y/o totalmente gelatinizados. Esta predominancia de gránulos de almidón es común en migas de panes libres de gluten sin agregados adicionales (Mäkinen, Zannini y Arendt, 2013b). Estos cuerpos verdosos se encuentran inmersos en una red proteica, la cual puede observarse más fácilmente si se elimina el canal correspondiente al FITC. Esto puede observarse en la micrografía b' (la cual proviene de la imagen a' pero sin FITC) en donde pueden distinguirse las "sombras" dejadas por los gránulos de almidón y una red proteica teñida en color rojo. Por otro lado, debido a que los ingredientes de la formulación control, presentan un contenido muy bajo de fibra, fue inquietante la presencia generalizada de color azul en las micrografías. Ahora bien, una parte de la coloración azul podría ser debida a la presencia de HPMC en la formulación. De todos modos, la concentración de HPMC es baja, para el nivel de coloración, sugiriendo otro tipo de interacción con el calcoflúor. Albani y Plancke (1999) encontraron que el calcoflúor white puede interaccionar con glicoproteínas como la α 1-Glicoproteína ácida (α 1-Ac GLY) ya que puede interaccionar con diferentes glicanos, y principalmente, con aquellos que contengan galactosa, glucosa y manosa. Además, la ubicación espacial de los glicanos en la proteína parece jugar un rol muy importante.

Dado que la ovoalbúmina, es la principal proteína del huevo y es una glicoproteína, se realizó una observación de clara de huevo sometida a un proceso de calentamiento (simulando la cocción) y sin calentar. En la muestra sometida a calentamiento y teñida con calcoflúor se observó que el colorante se unía a la proteína, observándose teñida de color azul (Figura 53) mientras que en la muestra que no fue sometida a calentamiento no se observó ninguna afinidad del

colorante por la proteína. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los batidos, donde el calcoflúor no mostró afinidad por las proteínas presentes en los mismos. Además, estos resultados ponen en evidencia lo expresado por Albani y Plancke (1999) para quienes la disposición espacial del resto glicosilado era relevante para su interacción con el calcoflúor.

En la formulación del budín control, además el bajo contenido de fibra en la formulación, podría haber facilitado la unión del calcoflúor a las proteínas desnaturalizadas del huevo. Esto concuerda con los resultados observados en la albumina que al coagular forma una película semicontinua (Figura 53) de color violeta cuando CF y RB están encendidos pero que se muestra de color azul al dejar, sólo el canal de CF encendido. Este mismo efecto es visible en la miga control (Control d) donde sólo se dejó el canal de CF encendido.

Por otro lado, la miga de HN10 presentó gránulos de almidón parcialmente gelatinizados que conservaron mejor su forma en comparación con el budín Control. Además, la red proteica que le da forma a la miga del budín se encuentra bien establecida (HN10 b, b'). En cuanto a las interacciones del fluoróforo CF, al igual que en el budín control parte del CF se muestra como una película semicontinua (b') por lo que se encontraría interaccionando con glicoproteínas. Sin embargo, con la adición de HN una parte del CF tiñó también, estructuras más definidas, siendo estas compatibles con fibra proveniente de la harina de nuez.

Al aumentar la concentración del subproducto (Figura 55). En las imágenes de HN15 y HN20 se muestra una menor cantidad de gránulos de almidón. Además, en ambas formulaciones la presencia de fibra es mayor. Observándose claramente la presencia de paredes celulares vegetales probablemente provenientes de la harina

de nuez, teñidas de color azul por el CF. Por otro lado, en HN20 (b'') se muestra que parte de la proteína acompaña al tejido vegetal (paredes celulares teñidas en azul), por lo que es posible suponer que esa proteína sea proveniente de la harina de nuez.

Por otro lado, como la harina de nuez se trata de un subproducto de la industria aceitera y su contenido mayoritario son lípidos. Es importante evaluar la distribución de los mismos en la miga de los budines con HN. Por esta razón, se utilizó otra mezcla de fluoróforos, la mezcla 2, que contenía rodamina B (RB), calcoflúor white (CF) y rojo Nilo, este último siendo un fluoróforo que se caracteriza por interactuar con los lípidos presentes en las muestras. Es así que en la Figura 56 y la Figura 57 se muestran las migas con la mezcla 2.

De igual manera que para las micrografías previas los canales fueron encendidos y apagados, a conveniencia, para facilitar la visualización de los distintos componentes. Las imágenes con a y a') presentan todos sus canales encendidos, mientras que las imágenes b y b') presentan el canal de calcoflúor apagado, eliminando de este modo la fibra, la HPMC y la posible interacción con glicoproteínas (provenientes del huevo y la leche) de las migas. Además, las imágenes c y c') presentan el canal de rodamina B apagado, eliminando a las proteínas. Finalmente, las imágenes con d) presentan solamente el canal de rojo Nilo encendido, mostrando la distribución de los lípidos en las migas con HN.

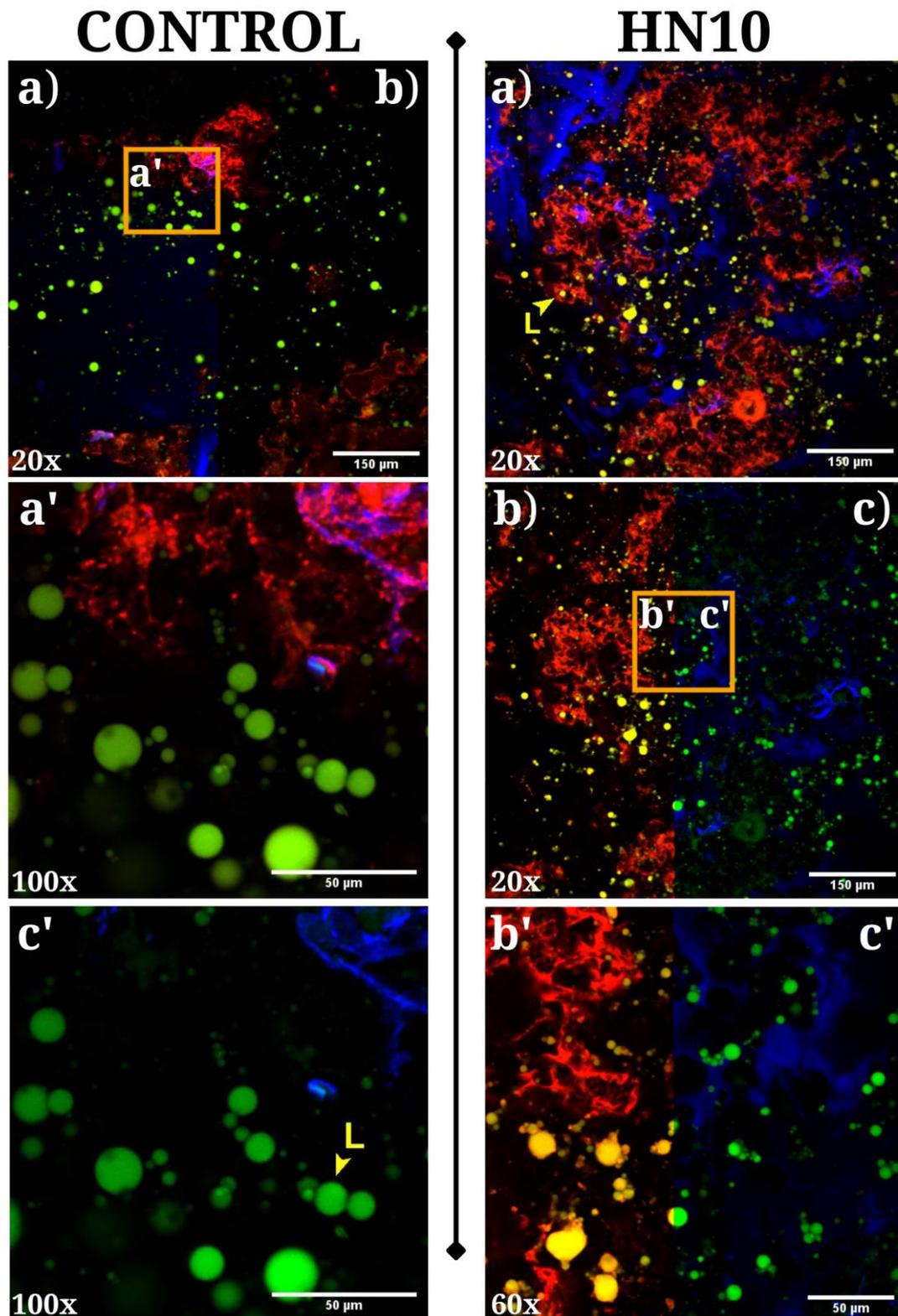


Figura 56. Micrografías de la miga Control y HN10 por CSLM. Muestras teñidas con rojo Nilo (RN), rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a y a') presentan todos los canales encendidos, b y b') se apagó el canal RN y c y c') se apagó el canal de RB. a', c' y b'c' son las imágenes provenientes de los recuadros anaranjados con mayor magnificación. L: Lípidos

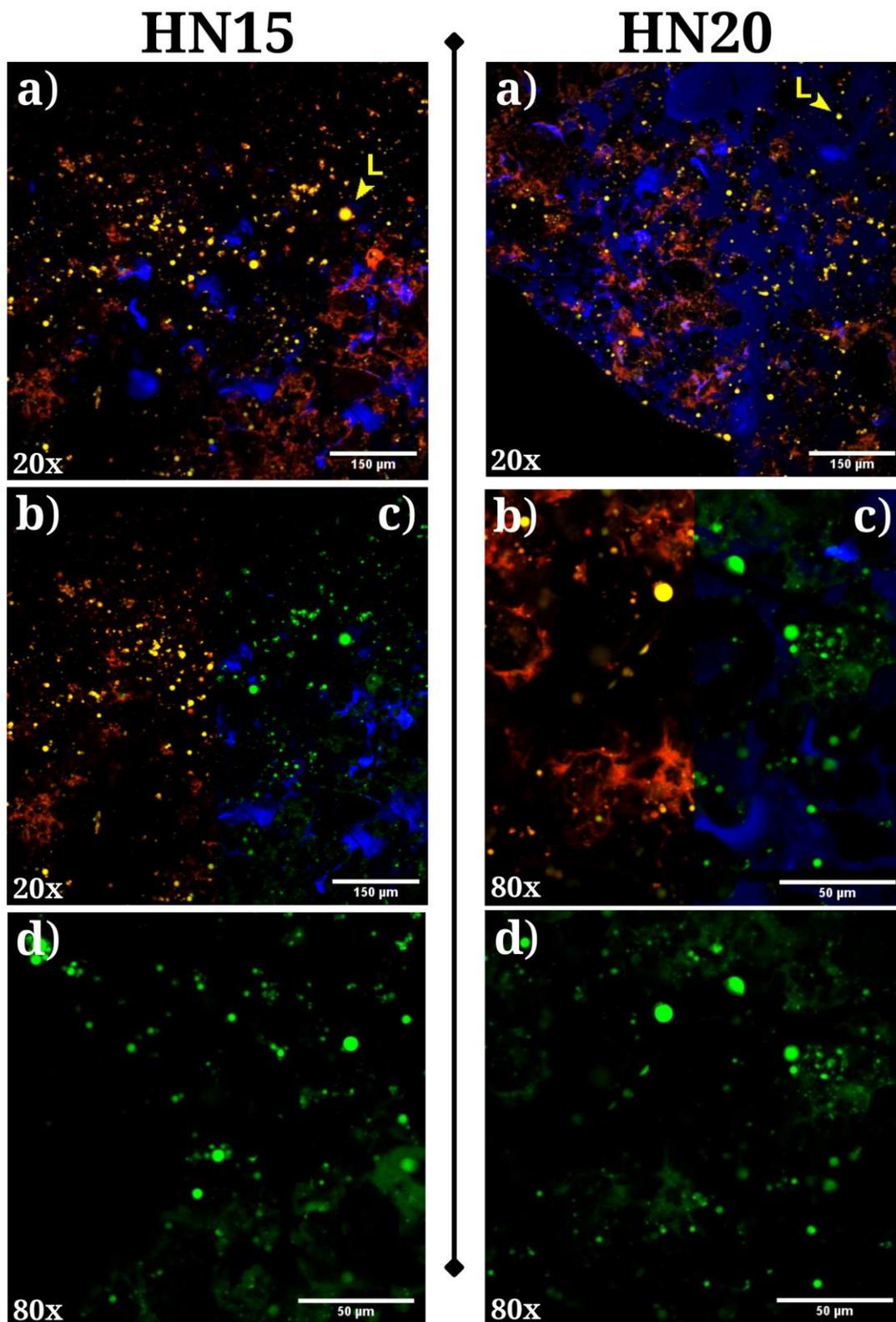


Figura 57. Micrografías de la miga HN15 y HN20 por CSLM. Muestras teñidas con rojo Nilo (RN), rodamina B (RB) y calcoflúor white (CF). Las imágenes a) presentan todos los canales encendidos, b) se apagó el canal RN, c) se apagó el canal de RB y d) sólo el canal RN está encendido. L: Lípidos

En la Figura 56 se muestra las micrografías de la miga control y HN10. La miga control tiene lípidos predominantemente del aceite de girasol y en mucha menor medida de los provenientes de la leche entera y el huevo en polvo. Como es evidente, todos los lípidos observados en las imágenes (Control a-c) tienen formas de gotas brillantes en color verde. Las gotas están suspendidas en la matriz de la miga, la red proteica observable es más discontinua que en la Figura 54. Por otro lado, las micrografías de la miga HN10 muestran una distribución bastante parecida a la del control con la diferencia que las gotas de los lípidos se observan en un tono amarillento por lo que estarían rodeadas por proteína. Esto es mucho más evidente, al eliminar el canal correspondiente a la rodamina b (HN10 c, c'), donde las gotas de lípidos se observan en color verde brillante. Al mismo tiempo, al aumentar la adición de HN (Figura 57) las micrografías de las migas de HN15 y HN20, con todos los canales encendidos, mostraron el mismo efecto amarillento en las gotas de los lípidos atribuible al mismo efecto.

Como era de esperar, con la adición de HN aumentó en las micrografías la presencia de coloración roja y azul mostrando una mayor concentración de proteína y fibra, respectivamente. En particular, en la muestra HN20 se observa, una estructura en forma de película (HN20a) atribuible a la interacción entre la ovoalbúmina (y otras glicoproteínas) y el CF.

Además, es importante reiterar que la cantidad de aceite de girasol fue reducida progresivamente a medida que la adición de HN aumentó. Esto explica, en parte, la reducción en cuanto al tamaño de las gotas de lípidos. Sin embargo, en las micrografías (d) que presentan solamente el canal de rojo Nilo encendido se observa claramente que los lípidos de la nuez siguen atrapados en las estructuras

remanentes de nuez, en concordancia con lo observado en las micrografías de los batidos con rojo Nilo en especial en HN20, permaneciendo éstas estructuras aún después del horneado.

5.4.4. Composición proximal de los budines sin gluten

La composición proximal de los budines (base seca) se muestra en la Tabla 27. Todas las formulaciones con HN fueron significativamente diferentes del control. El contenido de proteínas, fibra dietética total y cenizas aumentó a medida que se incrementó el contenido de la HN. Por el contrario, el contenido de hidratos de carbono y lípidos disminuyó con la adición de HN. En el caso de los lípidos, se relacionó con la reducción progresiva del contenido de aceite de girasol a medida que aumentaba el nivel de la HN para mantener un nivel de lípidos relativamente constante (respecto a la mezcla de harina). Sin embargo, la heterogeneidad intrínseca de la HN podría haber contribuido a obtener una reducción del contenido en lípidos.

El Código Alimentario Argentino en su resolución conjunta 161 y 213 (2013) establece que se consideran alimentos de alto contenido en fibra, cuando estos tengan al menos 5 g de fibra dietaria por porción. Todas las formulaciones con HN entran dentro de esta categoría. Asimismo, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), las cantidades de referencia habitualmente consumidas (RACC, por sus siglas en inglés) es de 125 g, para los "budines de peso elevado" esta categorización depende del valor del volumen específico. Asimismo, la ingesta diaria de referencia (RDI, por sus siglas en inglés) de fibra es de 28 g. Cuando un producto cubre el 20 % o más de la RDI por RACC se considera una "fuente alta" y entre el 10 y el 19% de la RDI por RACC es una

"buena fuente" (Food and Drug Administration, 2020). La cantidad del RDI por RACC de fibra (peso húmedo) cubierto por HN10 y HN15 fue del 17 % y para HN20 fue del 19 %. Por lo tanto, según la metodología de la FDA todas las formulaciones con NH pueden etiquetarse como una buena fuente de fibra, y en el caso de HN20 casi como fuente alta de fibra.

De este modo, los budines elaborados con el subproducto presentaron un mayor contenido de proteínas y fibra dietética y un menor contenido de lípidos que el control, proporcionando un contenido calórico ligeramente inferior (las kcal por 100 gramos de budín seco se redujeron de 431 para el control a 412 para HN20).

Tabla 27. Composición proximal de los budines con adición de harina de nuez

	Proteínas*	Lípidos*	FDT*	Cenizas*	Carb.*	CC
Control	6,30±0,05 ^a	9,0±0,4 ^c	2,1±0,1 ^a	2,45±0,01 ^a	80,2±0,4 ^b	431 ^c
HN10	7,40±0,08 ^b	8,2±0,3 ^b	5,56±0,04 ^b	2,50±0,02 ^b	76,3±0,3 ^a	420 ^b
HN15	8,8±0,1 ^c	7,1±0,4 ^a	5,5±0,4 ^b	2,50±0,01 ^b	76,1±0,6 ^a	415 ^{ab}
HN20	8,79±0,09 ^c	6,9±0,6 ^a	6,1±0,3 ^b	2,55±0,03 ^c	75,7±0,7 ^a	412 ^a

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). *[% , base seca], Carb.: carbohidratos calculados por diferencia, CC: contenido calórico [kcal/100 g solidos], FDT: fibra dietaria total.

5.4.4.1. Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines

En la formulación de los budines las principales fuentes de lípidos fueron el aceite de girasol y la harina de nuez y en menor medida la leche entera y del huevo en polvo. Es importante reiterar que la harina de nuez presentó un 55 % de lípidos en base seca. Con un perfil lipídico caracterizado por un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados.

Dado que se utilizó aceite de girasol en todas las formulaciones, su composición lipídica también fue analizada. El porcentaje de cada ácido graso en el aceite de girasol fue de $82,03 \pm 0,01$, $11,96 \pm 0,01$, $4,15 \pm 0,05$ y $1,87 \pm 0,06$ para los ácidos oleico (18:1 n-9), linoleico (18:2 n-6), palmítico (16:0) y esteárico (18:0), respectivamente. No se detectaron ni ácido mirístico (14:0) ni α -linolénico (18:3 n-3). El elevado contenido en ácido oleico presente en el aceite utilizado, brinda una mayor estabilidad a las altas temperaturas frente al aceite de girasol convencional. Esto es una clara ventaja cuando un alimento, como el caso de los productos panificados, tiene que hornearse (Gullón, 2020). Por otro lado en Argentina, Van Nieuwenhove y colaboradores (2009) reportaron que los principales ácidos grasos presentes en la leche entera son palmítico ($27,9 \pm 4,0$ %), cis-oleico ($20,8 \pm 2,9$ %), esteárico ($12,8 \pm 2,4$ %), mirístico ($12,5 \pm 1,8$ %), trans-oleico ($3,5 \pm 0,5$ %), cáprico ($3,4 \pm 0,1$ %), pentadecanoico ($3,0 \pm 0,4$ %), caproico ($2,4 \pm 0,7$ %), linoleico ($1,2 \pm 0,4$ %), α -linolénico ($0,8 \pm 0,1$ %) y los restantes suman 11,7 %. Además, en poca cantidad se utilizó huevo en polvo, cuya composición de ácidos grasos ha sido descrita por Mazalli y Bragagnolo (2007). Estos autores reportaron: ácido palmítico ($24,7 \pm 0,2$ %), oleico ($20,1 \pm 0,5$ %), esteárico ($16,9 \pm 0,6$ %), linoleico ($16,7 \pm 0,7$ %), mirístico ($3,96 \pm 0,03$ %), α -linolénico ($0,14 \pm 0,00$ %) y sumando los ácidos grasos restantes 17,5 %.

En cuanto a los budines libres de gluten, en la Figura 58 se muestra el porcentaje de los ácidos grasos presentes en las migas de las distintas formulaciones. Como era de esperarse, el porcentaje de ácido oleico fue el más alto en el budín control ($63,9 \pm 0,4^d$) y se redujo progresivamente hasta $23,8 \pm 0,8^a$ % (HN20) a medida que la adición de harina de nuez aumentó. Por otro lado, los ácidos grasos esenciales (linoleico y α -linolénico) aumentaron significativamente

conforme la concentración de HN aumentó. El ácido linoleico pasó de $17,7 \pm 0,1^a$ en el control hasta llegar a $49,1 \pm 0,8^d$ % en HN20. Igualmente, el contenido de ácido α -linolénico se incrementó de $0,44 \pm 0,01^a$, en el control, a $10,4 \pm 0,2^d$ en HN20. Los ácidos grasos esenciales son importantes debido a que el cuerpo humano no puede sintetizarlos y deben ser ingeridos con la dieta (Aires, Capdevila y Segundo, 2005).

Por otro lado, en relación a los ácidos grasos saturados, el perfil lipídico de la miga mostró que las distintas formulaciones tuvieron alrededor de $12,8 \pm 0,5$ % de ácido palmítico. Por otro lado, el ácido esteárico se redujo ligeramente de $4,07 \pm 0,04^b$ a $2,9 \pm 0,1^a$ %, sin detectarse diferencias significativas entre las formulaciones con HN. Algo semejante ocurrió con el ácido mirístico que se redujo de $0,84 \pm 0,01^b$ a $0,71 \pm 0,02^a$ para el control y HN20, respectivamente. La razón por la que la cantidad de este ácido graso es tan pequeña, es debido a que proviene principalmente de la grasa de la leche entera (Jensen, Ferris y Lammi-Keefe, 1991; Van Nieuwenhove, Oliszewski y González, 2009), que a pesar de agregarse en igual cantidad en todos los batidos al aumentar la cantidad de HN los demás ingredientes se diluyen.

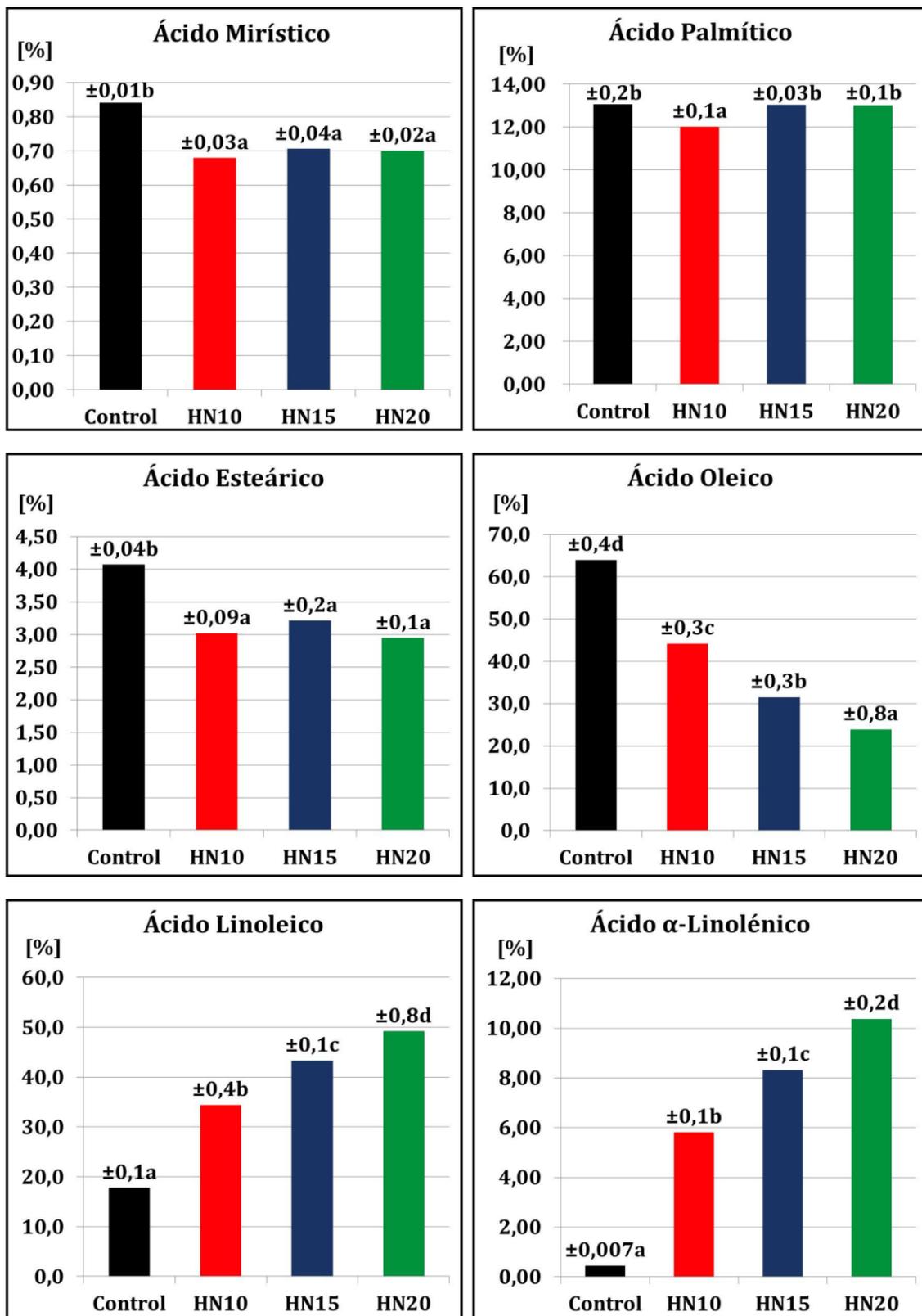


Figura 58. Ácidos grasos presentes en la miga de los budines frescos. [% de ácidos grasos/ cantidad total de ácidos grasos]. Letras diferentes entre formulaciones indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

5.4.4.2. Evaluación sensorial de los budines

Se realizó la evaluación sensorial de las formulaciones de control y HN15. La formulación HN15 fue seleccionada entre las demás muestras con la HN debido a su calidad panadera. A diferencia del HN20, los budines con HN15 presentaron una buena calidad panadera, como un mayor volumen específico, una estructura de miga más compleja (porosidad) y unos parámetros de textura adecuados. La puntuación media de cada atributo se muestra en la Figura 59.

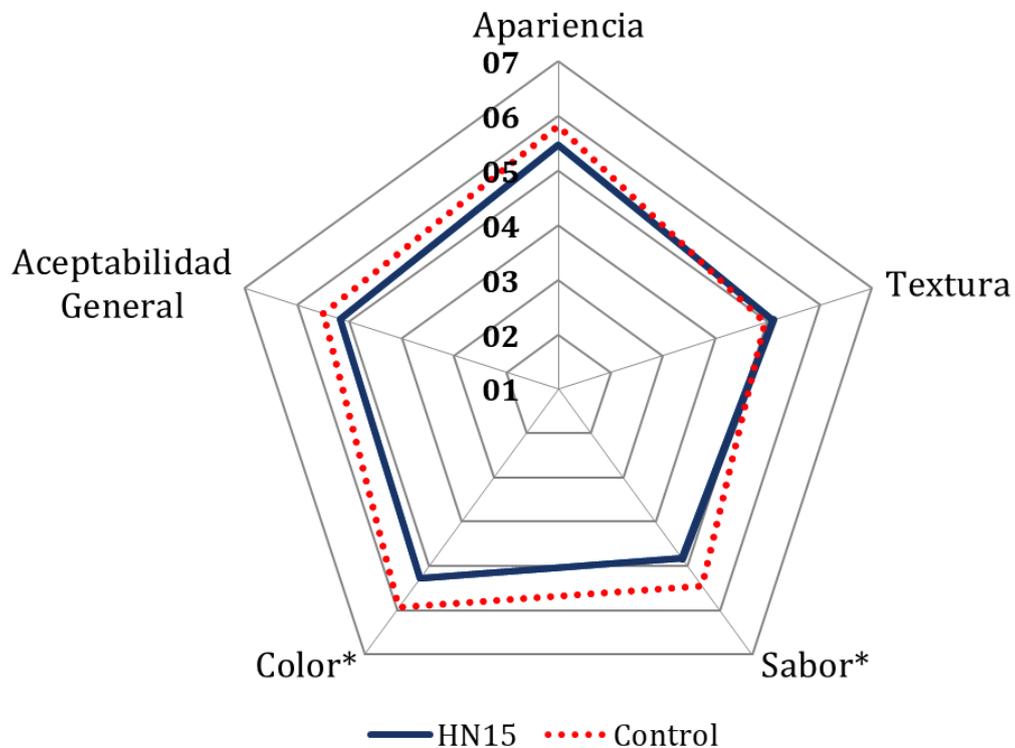


Figura 59. Evaluación sensorial de los budines. *atributos con diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 48$)

Los evaluadores no encontraron diferencias entre las puntuaciones de las muestras en cuanto a la apariencia (Control: $5,8 \pm 1,0$ y HN15: $5,5 \pm 1,2$), la textura (Control: $5,0 \pm 1,6$ y HN15: $5,1 \pm 1,4$) y la aceptabilidad general (Control: $5,5 \pm 1,3$ y HN15: $5,2 \pm 1,4$), mientras que en cuanto al color y el sabor, la diferencia fue ligera

pero significativa. El color amarillento del control fue ligeramente más atractivo que el color marrón de HN15 (Control: $5,9 \pm 1,1$ y HN15: $5,3 \pm 1,4$). Este resultado fue consistente cuando se sustituyó la harina de trigo por HN en pan de trigo (Almoraie, 2019). Por otro lado, la puntuación de sabor del control fue mayor que la de HN15 ($5,4 \pm 1,3$ y $4,8 \pm 1,6$, respectivamente). Asimismo, algunos evaluadores afirmaron que notaron un regusto a nuez al probar HN15 y también que HN15 era menos dulce. Esto último, a causa de que el contenido relativo de azúcar se diluyó por la adición de HN. Por último, todas las puntuaciones promedio de ambas muestras fueron relativamente altas, teniendo en cuenta que la máxima puntuación posible era 7.

5.5. Conclusiones parciales

La adición de la harina de nuez (HN) en budines sin gluten aumentó los contenidos de fibra (hasta 6,1 %) y proteína (hasta 8,8 %), la fracción de aire, la complejidad de los alvéolos y el volumen específico. Siendo este último de gran importancia debido a que, usualmente, el consumidor juzga a los productos panificados por su esponjosidad.

El mayor volumen específico podría estar relacionado con el hecho de que los batidos con HN presentaron mayor consistencia que el batido control y se fijaron a temperaturas mayores que el mismo. Con respecto a las características texturales de la miga, a pesar de que se observó un aumento de la dureza por la adición de HN, estas migas fueron más fáciles de masticar.

A través de las micrográficas de la miga obtenidas por CSLM se pudo observar que la distribución de los lípidos en la matriz de los budines cambia al añadir HN a la formulación, esto debido a que parte de los lípidos siguen atrapados en estructuras remanentes de la nuez.

En cuanto a la composición de ácidos grasos presentes en la miga de los budines, se observó que a medida que HN aumentó, los ácidos grasos saturados se mantuvieron relativamente constantes. Mientras que, se evidenció un aumento significativo de los ácidos linoleico y α -linolénico y una reducción, igualmente significativa del ácido oleico. Esto al sustituirse los lípidos del aceite de girasol por los de HN.

Finalmente, la evaluación sensorial de los budines con un 15 % de HN presentó una aceptación similar a la de la muestra de control. Es importante acotar

que ambos budines recibieron puntuaciones promedio relativamente altas ($\approx 5,4$), teniendo en cuenta que la máxima puntuación posible era 7.

Capítulo 6:

**Almacenamiento de los
budines libres de gluten
con harina de nuez**

Capítulo 6

6.1. Introducción del capítulo

El envejecimiento de los productos sin gluten es un tema de gran importancia dado que suele ser de mayor rapidez que en los productos análogos con gluten y este trae consigo aparejadas grandes pérdidas económicas (Šmídová y Rysová, 2022). Entre los parámetros que suelen emplearse para estudiar la evolución e impacto de este proceso en los productos panificados, se encuentran la evaluación de las características texturales de la miga y la pérdida de humedad, entre otros (Culetu et al., 2021). En el envejecimiento de los productos panificados el almidón juega un rol central dado que a la retrogradación de éste se le atribuye gran parte de los fenómenos no deseados. Con el objetivo de retrasar estos fenómenos en las formulaciones de productos sin gluten suelen emplearse diferentes aditivos, entre ellos, los hidrocoloides dado que contribuyen a disminuir la pérdida de humedad durante el almacenamiento y modifican la gelatinización del almidón durante el horneado y por ende la posterior retrogradación. La retrogradación involucra la reasociación de las cadenas de polisacáridos en estructuras ordenadas y cristalinas. La retrogradación de la amilopectina requiere de varios días y dado que el endurecimiento de los productos panificados ocurre también a lo largo de varios días desde su elaboración, la mayor parte de los modelos que tratan de describir los procesos involucrados en el envejecimiento atribuyen a la retrogradación de la amilopectina como la causa primaria del endurecimiento (Hebeda y Zobel, 1996). Sin embargo, es un proceso complejo en el cual se encuentran involucrados diferentes fenómenos (Ronda y Roos, 2011).

6.2. Objetivos del capítulo

6.2.1. Objetivo general del capítulo

Analizar el efecto de la harina de nuez sobre el deterioro producido durante el almacenamiento de los budines libres de gluten.

6.2.2. Objetivos específicos del capítulo

- Determinar si la adición de la harina de nuez afecta las propiedades tecnológicas de los budines libres de gluten durante el almacenamiento.
- Establecer el efecto de la adicción de la harina de nuez en los cambios fisicoquímicos en los budines durante el almacenamiento.
- Evaluar la estabilidad lipídica de los budines con harina de nuez durante el almacenamiento.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Metodología para el ensayo de almacenamiento

Una vez preparados los budines como se describió previamente (Sección 5.3.3) se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después fueron separados en grupos de cuatro y se colocaron en bolsas herméticas. En total se almacenaron cuatro bolsas individuales, una para cada día de medición (días uno, tres, cinco y siete). Las bolsas fueron almacenadas a $20,6 \pm 0,5$ °C ($72,1 \pm 0,9$ % Hr) durante siete días y se realizaron al menos dos lotes independientes por formulación.

6.3.2. Disponibilidad y contenido de agua de la miga almacenada

La disponibilidad y el contenido de agua en la miga varían debido al envejecimiento de los budines. Para establecer su nivel de variación, la actividad acuosa y la humedad se determinaron siguiendo la misma metodología que para los budines frescos (Sección 5.3.4.1) pero almacenándolos hasta por siete días a 20.°C.

6.3.3. Evaluación de la retrogradación del almidón y disociación del complejo amilosa lípido

La retrogradación de la amilopectina es un proceso reversible por debajo de los 100°C por lo que se puede estudiar por calorimetría diferencial de barrido. Se midió la entalpía involucrada cuando los cristales de amilopectina retrogradados se fundieron mediante la aplicación de un flujo externo de calor. Por lo tanto, si la amilopectina retrograda en mayor o menor medida en las formulaciones después del almacenamiento, el termograma mostrará una transición de mayor o menor magnitud, respectivamente.

En los alimentos, además del almidón, otros compuestos importantes son los lípidos. Estos pueden formar complejos de inclusión con el almidón, los que pueden encontrarse en forma natural en productos como las harinas o formarse durante el procesamiento de los alimentos. Este complejo puede ser estudiado por calorimetría diferencial de barrido ya que es un complejo reversible que se disocia a temperaturas superiores a 100 °C (Huang et al., 2020). A partir de los termogramas se obtienen las temperaturas características de la transición y la entalpía de la misma.

Para esto, en primer lugar, se simuló la cocción de los batidos en el calorímetro. Se colocaron 10 mg de cada formulación de batido (sin polvo de hornear) en una cápsula de aluminio cerrada herméticamente, la que se sometió a un calentamiento controlado desde 10 °C hasta 160 °C a 10 °C/min en un calorímetro DSC Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.). Una vez enfriadas las cápsulas estas fueron almacenadas durante siete días en las mismas condiciones que los budines ($20,6 \pm 0,5$ °C; $72,1 \pm 0,9$ % Hr).

Una vez transcurridos los siete días de almacenamiento las cápsulas se volvieron a someter a un calentamiento controlado en el DSC. Se inició el programa con una isoterma a 5 °C por 4 minutos para proseguir con una rampa desde 10 °C hasta 160 °C a 10 °C/min. Los termogramas se analizaron con el programa Universal Analysis 2000 (TA Instruments-LLC Waters, EE.UU.). Se determinaron las temperaturas de onset (T_0), de pico (T_p) y final (T_f) y las entalpías de retrogradación del almidón (ΔH_R) y de disociación del complejo amilosa lípido (ΔH_{CAL-D7}). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.3.4. Análisis de la textura de miga y corteza durante el almacenamiento

6.3.4.1. Análisis del perfil de textura (TPA) de miga

La evaluación de la textura de la miga durante el almacenamiento nos brinda información acerca de la estabilidad de las distintas formulaciones durante el almacenamiento. La textura se evaluó con la misma metodología que para los budines frescos (Sección 5.3.5.1), pero a los días uno, tres, cinco y siete de almacenados en bolsas plásticas a 20 °C.

6.3.4.2. Determinación de dureza de la corteza

La evaluación de la dureza de la corteza durante el almacenamiento nos brinda información acerca de la estabilidad de los budines durante el mismo. La dureza se midió con el mismo procedimiento que para los budines frescos (Sección 5.3.5.3), pero a los días uno, tres, cinco y siete de almacenados en bolsas plásticas a 20 °C.

6.3.5. Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines durante el almacenamiento

En el campo de los alimentos, el envejecimiento es un término general que describe la pérdida de calidad de flavor (sabor + olor) y textura en función del tiempo (Parker y Ring, 2000). Sabiendo que la proporción de ácidos grasos de los budines frescos fue mayoritariamente de insaturados, es importante conocer si durante el almacenamiento esta composición cambió. Para lo cual se determinó el perfil de ácidos grasos presentes en la miga, por cromatografía gaseosa, siguiendo la misma metodología que para los budines frescos (Sección 5.3.8) con la variación de que los budines fueron almacenados por siete días a 20 °C.

6.3.6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para cada día de almacenamiento y la prueba LSD para determinar la existencia de medias estadísticamente diferentes (α : 0,05). Todas las pruebas se realizaron con el programa Statgraphics - Centurion - XVII Versión-17.2.00 (Statpoint Technologies, Inc, EE.UU.).

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Actividad acuosa (a_w) de la miga durante el almacenamiento

La actividad acuosa, a_w , es un parámetro determinante en la estabilidad de los alimentos, dado que es una medida relacionada a la disponibilidad del agua presente en la matriz alimenticia, lo cual a su vez se relaciona con la facilidad de ésta para migrar dentro del alimento durante el almacenamiento.

En la Figura 60 se observa la actividad acuosa de la miga de los budines frescos y su evolución durante el almacenamiento. En cuanto a los budines frescos, solamente HN15 presentó diferencias significativas respecto a las demás formulaciones. Con valores de $0,959 \pm 0,003$ para HN15 y $\approx 0,962 \pm 0,003$ para HN10, HN20 y Control. Esto guarda concordancia con lo observado en la a_w de los batidos en donde las formulaciones con HN presentaron los menores valores de actividad acuosa, lo cual se relacionó con el mayor contenido de fibra y proteína de estas matrices. Posteriormente, durante el almacenamiento, la a_w de las migas disminuyó con el tiempo. Al comparar a_w entre formulaciones, en los días uno, tres y cinco el budín control presentó valores significativamente más altos en comparación con las formulaciones con HN. Finalmente, al día siete, todas las formulaciones presentaron valores equivalentes ($\approx 0,94 \pm 0,01a$). Aguilar y colaboradores (2016) también observaron una pequeña disminución en la a_w durante el almacenamiento en panificados libres de gluten con harina de castaña.

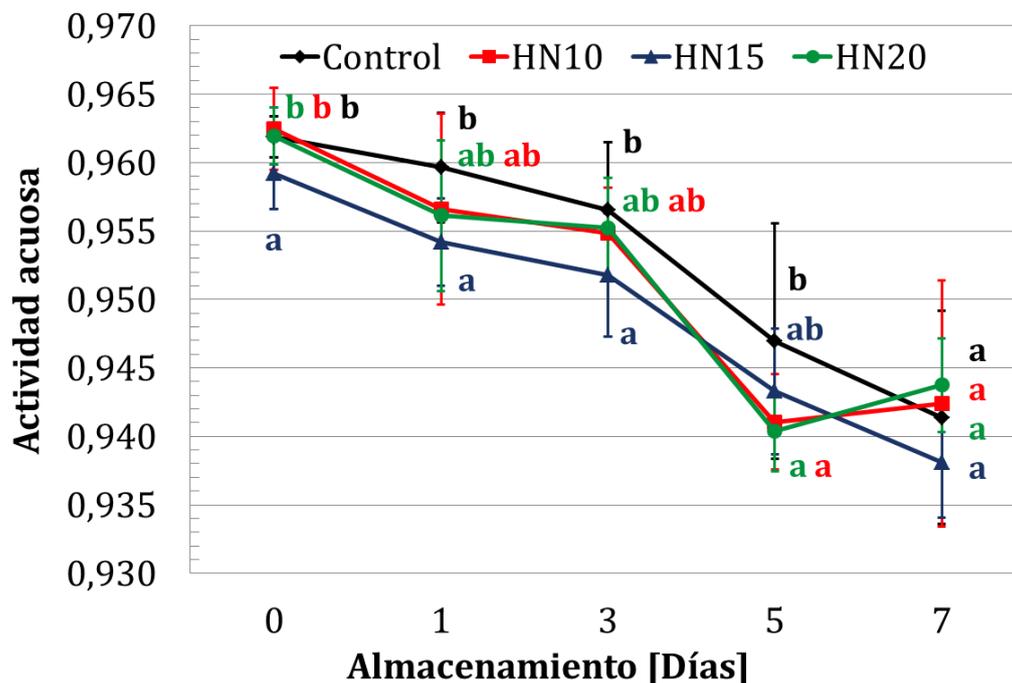


Figura 60. Variación de la actividad acuosa de la miga de los budines con adición de harina de nuez durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$). Los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

6.4.2. Humedad de la miga durante el almacenamiento

El contenido de agua es un factor de gran relevancia en el envejecimiento de los panificados. Durante el almacenamiento el agua migra de la miga hacia la corteza favoreciendo la formación de puentes de hidrogeno entre los constituyentes del almidón, entre el almidón y las proteínas (Arp, Ferrero y Correa, 2019) y entre el almidón y los lípidos.

En la Figura 61 se observa la disminución de la humedad en la miga durante todo el almacenamiento. En los budines frescos la adición de HN produjo migas menos húmedas, aunque este efecto solamente fue significativo para HN15 y

HN20. La humedad inicial de las migas fue de $38,9 \pm 0,3$, $38,8 \pm 0,3$, $38,0 \pm 0,4$ y $38,3 \pm 0,4$ % para control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. Como ha sido reportado por varios autores la humedad de las migas sin gluten decrece durante el almacenamiento, debido a la migración del agua hacia la corteza (Roman et al., 2020; Sabanis, Lebesi y Tzia, 2009). De cualquier manera, la miga control fue más húmeda durante todo el ensayo en comparación con las formulaciones con HN. Además, es importante agregar que en todas las formulaciones se observó el decrecimiento de la humedad, llegando al final del ensayo a valores de $34,7 \pm 0,5$, $34,0 \pm 0,6$, $33,6 \pm 0,6$ y $33,8 \pm 0,3$ % para control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente.

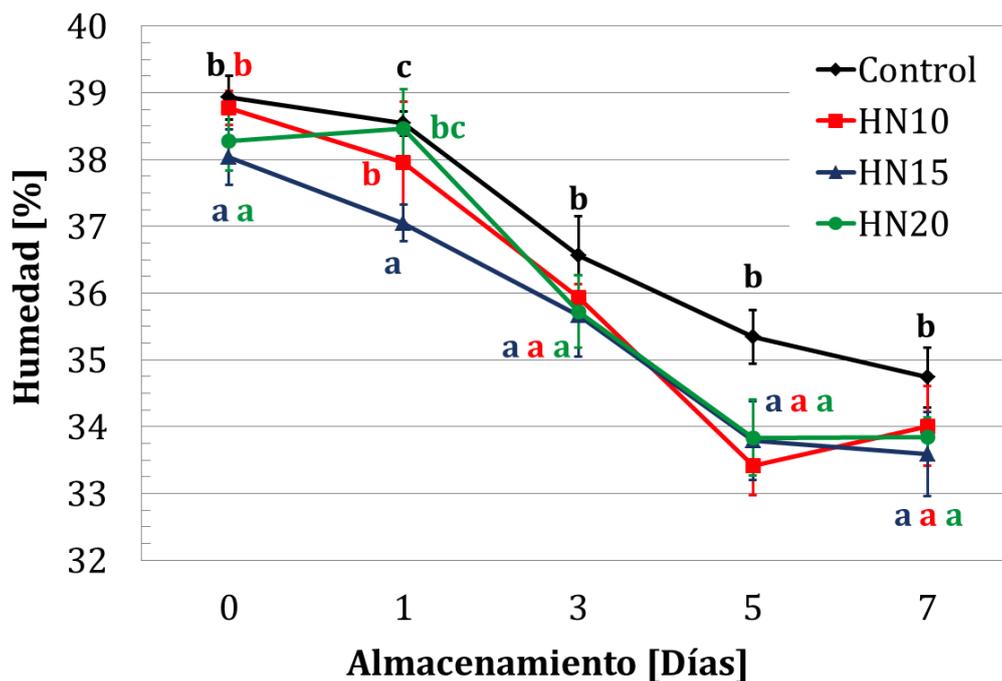


Figura 61. Variación de la humedad en la miga de los budines con adición de harina de nuez durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$). Los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

6.4.3. Evaluación de la retrogradación del almidón

La retrogradación del almidón ha sido estudiada de forma intensiva durante los últimos 50 años, principalmente debido a sus efectos perjudiciales sobre las cualidades sensoriales y de almacenamiento de muchos alimentos ricos en almidón (Wang et al., 2015). Este fenómeno tiene un gran peso en el envejecimiento de los productos panificados. En la Tabla 28 se muestran los valores de los parámetros de retrogradación de amilopectina de los budines con harina de nuez. El rango de temperatura observado (Figura 62) para estos budines coincide con el rango reportado por varios autores para la fusión de la amilopectina (Hug-Iten, Escher y Conde-Petit, 2003; Karim, 2000; Perez-Rea y Antezana-Gomez, 2018)

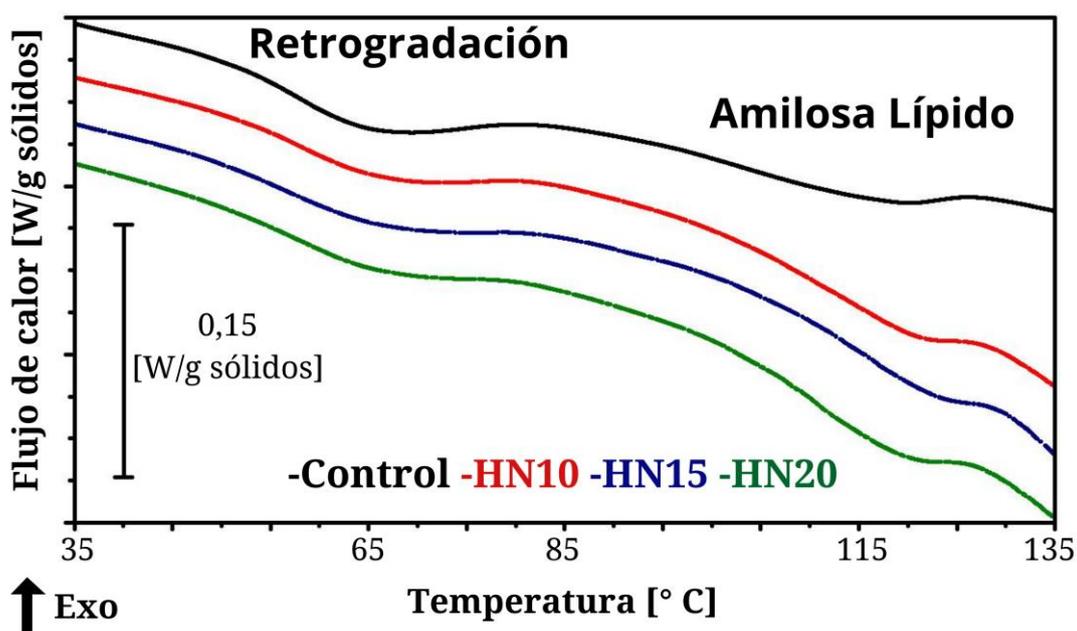


Figura 62. Termogramas por DSC de los budines libres de gluten con harina de nuez. Resaltando las transiciones de retrogradación de amilopectina y la disociación del complejo amilosa lípido

Tabla 28. Parámetros de retrogradación del almidón en los budines sin gluten a los siete días de almacenamiento

	Temperaturas [°C]				Entalpía de retrogradación ΔH_R *
	T_0	T_p	T_f	$\Delta T (T_f - T_0)$	
Control	51,8±0,7 ^a	65,2±0,3 ^a	86±2 ^a	34±2 ^a	2,5±0,1 ^a
HN10	51,6±0,4 ^a	66,8±0,7 ^b	88±1 ^{ab}	36±1 ^{ab}	2,4±0,3 ^b
HN15	50±1 ^a	65,8±0,1 ^{ab}	88,0±0,7 ^{ab}	38±1 ^b	2,1±0,1 ^c
HN20	51,8±0,9 ^a	67±1 ^b	89±1 ^b	37,7±0,2 ^b	1,77±0,02 ^d

Promedio± desvío estándar, Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 3$). T_0 : Temperatura de onset, T_p : Temperatura de pico, T_f : Temperatura final, * [J/g sólidos].

En cuanto al comienzo de la transición, no se observaron diferencias significativas en la T_0 entre las distintas formulaciones. Sin embargo la temperatura de finalización se desplazó hacia valores mayores a medida que aumentó la adición de HN, observándose diferencias significativas al comparar el budín control y HN20.

La entalpía necesaria para fundir los cristales y revertir la retrogradación de la amilopectina se redujo a medida que la adición de HN aumentó y se encontraron diferencias significativas entre los valores de la entalpía para todas las formulaciones estudiadas (Tabla 28). Los valores de entalpía para el control al séptimo día de almacenamiento fueron iguales a los reportados por Purhagen y colaboradores (2012) ($2,86 \pm 0,88$ [J/g sólidos]) para un pan libre de gluten almacenado por 3 días. Por otro lado, la disminución en la extensión de la retrogradación en los budines con harina de nuez puede tener varias explicaciones. Por un lado, puede estar relacionada con el aumento del contenido de proteínas y fibra aportado por la HN, ambos componentes con capacidad de atrapar agua, limitan su movilidad, lo que puede afectar a procesos difusionales como la retrogradación. Además, se ha descrito la formación de enlaces de hidrógeno entre

la fibra y el almidón lo que retrasaría la retrogradación de la amilopectina (Sabanis, Lebesi y Tzia, 2009). Por otro lado, se ha visto que los lípidos también retrasan la retrogradación del almidón a través de diferentes mecanismos posibles (Chang et al., 2021): 1) Los lípidos pueden afectar a la gelatinización e indirectamente modificar la retrogradación ya que la gelatinización parcial da lugar a una reducción de la posterior retrogradación. Esto estaría mediado por la formación de complejos amilosa-lípido que inhibirían la entrada de agua al gránulo, obstaculizando de este modo, el hinchamiento del mismo y la salida de amilosa al reducirse la movilidad de las cadenas de polisacáridos, 2) Durante la retrogradación, las cadenas helicoidales simples libres forman preferentemente complejos amilosa-lípido, lo que inhibe la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas de amilosa, 3) La formación de un núcleo cristalino de amilosa es un proceso clave en el crecimiento posterior del cristal durante la retrogradación. Dado que la formación del complejo-amilosa-lípido reduce la cantidad de amilosa disponible para la formación del núcleo cristalino, de este modo se podría también restringir la retrogradación del almidón.

En general, en los budines con harina de nuez se observó un ligero aumento en los rangos de temperatura y una disminución en la entalpía de la transición, al compararlos con el control. En conjunto, estos parámetros indican que la amilopectina retrograda menos y que los cristales formados son más heterogéneos al adicionar HN (Sciarini, 2011; Serrano, Sciarini y Pérez, 2016).

6.4.4. Disociación del complejo amilosa lípido

Debido a que el estudio de las transiciones térmicas de los batidos permitió observar que en las formulaciones con cantidades crecientes de HN se observa

mayor formación del complejo amilosa lípido (CAL) y a que ésta se ve favorecida durante la mezcla y horneado, se buscó establecer si el almacenamiento afectaba la cantidad de dicho complejo presente en los budines. Es así que se midió su entalpía de disociación después de siete días de almacenamiento.

En la Figura 62 se muestran los termogramas por DSC de los budines en el rango de la transición de disociación de CAL_{D7}. De igual forma, en la Tabla 29 se detallan las temperaturas características y el cambio de entalpía asociado a la transición en las distintas formulaciones. La temperatura de pico observada, en todos los casos, concuerda con los valores previamente reportados para la temperatura de fusión de los complejos amilosa-lípido semicristalinos que ronda los 115 °C (Putseys, Lamberts y Delcour, 2010). A pesar de no observarse diferencias significativas en cuanto al rango de la transición, las entalpías aumentaron significativamente a medida que la adición de HN aumentó.

En la Figura 63 se observa el aumento en el cambio de entalpía de la transición entre el día cero, cuando el batido apenas se convirtió en miga y la entalpía medida al día siete de almacenamiento. Es claro que durante el almacenamiento la formación de CAL en la miga de los budines se vio favorecida. Está misma tendencia fue observada al evaluar tortillas Wonton libres de gluten frescas y almacenadas durante siete días (Prakaywatchara, Wattanapairoj y Thirathumthavorn, 2018) e inclusive, la formación de complejos de inclusión con la amilosa ha sido señalada como una alternativa para retrasar el envejecimiento de este tipo de productos (Mariscal-Moreno et al., 2019). Para que la formación del complejo amilosa-lípido ocurra, las cadenas de amilosa deben tener la movilidad suficiente para interactuar con los lípidos, los que a su vez deben estar en el lugar

correcto, es así que una fase amorfa gomosa sería un medio adecuado para la formación de CAL (Eliasson, 1994; Evans, 1986; Putseys, Lamberts y Delcour, 2010). Por otro lado, se han reportado posibles efectos benéficos para la salud de los CAL por lo que han sido catalogados como almidón resistente tipo V, ya que se ha observado que la formación de estos complejos restringe la disponibilidad del almidón para la hidrólisis enzimática, lo que da como resultado una menor digestibilidad del almidón (Arp, Correa y Ferrero, 2021). Por lo tanto, este aumento durante el almacenamiento podría ser positivo para los consumidores.

Tabla 29. Parámetros de disociación del complejo amilosa lípidos en los budines sin gluten a los siete días de almacenamiento

	Temperaturas [°C]				Entalpía de disociación ΔH_{CAL-D7} *
	T ₀	T _p	T _f	ΔT (T _f -T ₀)	
Control	97 ±2 ^b	116 ±1 ^a	128,5±0,3 ^a	31±3 ^a	1,43±0,02 ^a
HN10	ND	ND	ND	ND	ND
HN15	104±3 ^a	118±1 ^a	131±2 ^a	28±4 ^a	2,63±0,04 ^b
HN20	105±2 ^a	116,5 ±0,6 ^a	128±2 ^a	23±5 ^a	3,18±0,05 ^c

Promedio± desvío estándar, Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$, $n = 3$).ND: no determinado. T₀: Temperatura de onset, T_p: Temperatura de pico, T_f: Temperatura final, * [J/g sólidos].

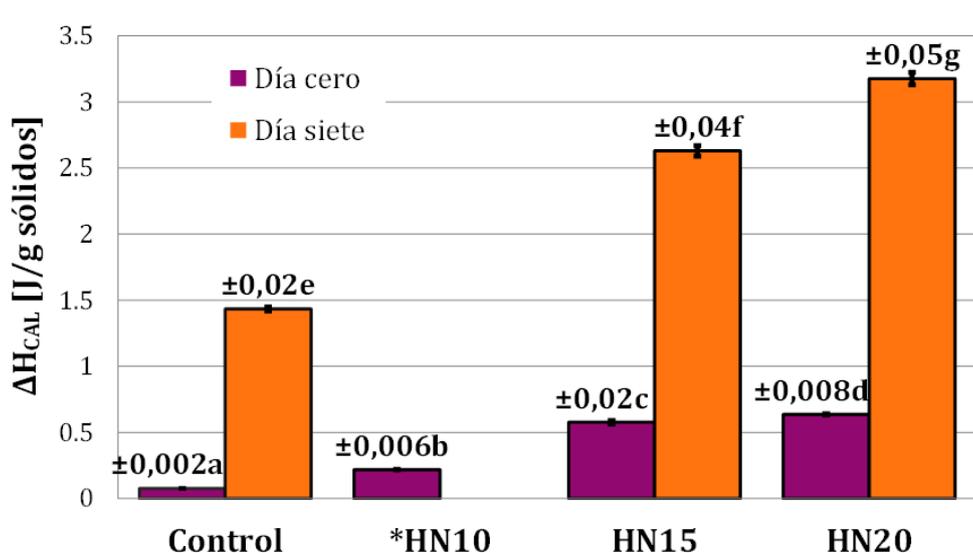


Figura 63. Entalpía de disociación del complejo amilosa lípido en la miga de budines libres de gluten con harina de nuez. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). *HN10 día siete ND: No determinado

6.4.5. Análisis del perfil de textura (TPA) de la miga

La textura es uno de los principales factores que los consumidores tienen en cuenta al calificar la calidad de los productos alimenticios, y, en especial, en el caso de los productos panificados. Los panificados, durante el almacenamiento, sufren cambios relacionados con la migración del agua, la retrogradación del almidón y la cristalización de lípidos. Estos cambios producen una desorganización de la estructura original, cambiando sus atributos texturales (Esteller, Amaral y Lannes, 2004). La suma de los atributos como firmeza, cohesividad, resiliencia, elasticidad y masticabilidad dan como resultado el perfil de textura de los budines. Debido a esto es esencial evaluar los cambios que sufre dicho perfil en los budines con harina de nuez durante el almacenamiento. Para esto, discos de miga almacenados durante uno, tres, cinco y siete días a 20 °C, se comprimieron en dos ciclos sucesivos en el texturómetro y a partir de los resultados se obtuvo el perfil textural de las migas.

La variación de la firmeza de la miga durante todo el almacenamiento se muestra en la Figura 64. En cuanto a la firmeza de la miga de los budines frescos solamente la formulación HN20 presentó una miga más dura (28 ± 4^b N) que el control. Como era de esperar, el envejecimiento produjo un aumento significativo en la firmeza de la miga de todas las formulaciones, con notables diferencias entre sí. Por ejemplo, la firmeza del budín control entre los días cero y uno presentó el mayor incremento de entre todas las formulaciones. Pasando de 26 ± 3 a 34 ± 2 N (31 % de aumento), en contraste HN20 solamente aumentó de 28 ± 4 a 30 ± 4 N (7 % de aumento) en el mismo lapso.

A lo largo de todo el almacenamiento la miga control fue significativamente más dura que las migas con HN. En especial al día cinco donde alcanzó su punto máximo (49 ± 4 N) de firmeza. Ahora bien, al llegar al día siete su firmeza se redujo (41 ± 4 N) debido a que los discos de miga se desgranaban con mayor facilidad. Similar comportamiento se observó con HN10 entre el día cinco y siete. Mientras que la firmeza de HN15 y HN20 simplemente aumentó durante todo el almacenamiento llegando hasta 34 ± 4 y 49 ± 3 N, respectivamente.

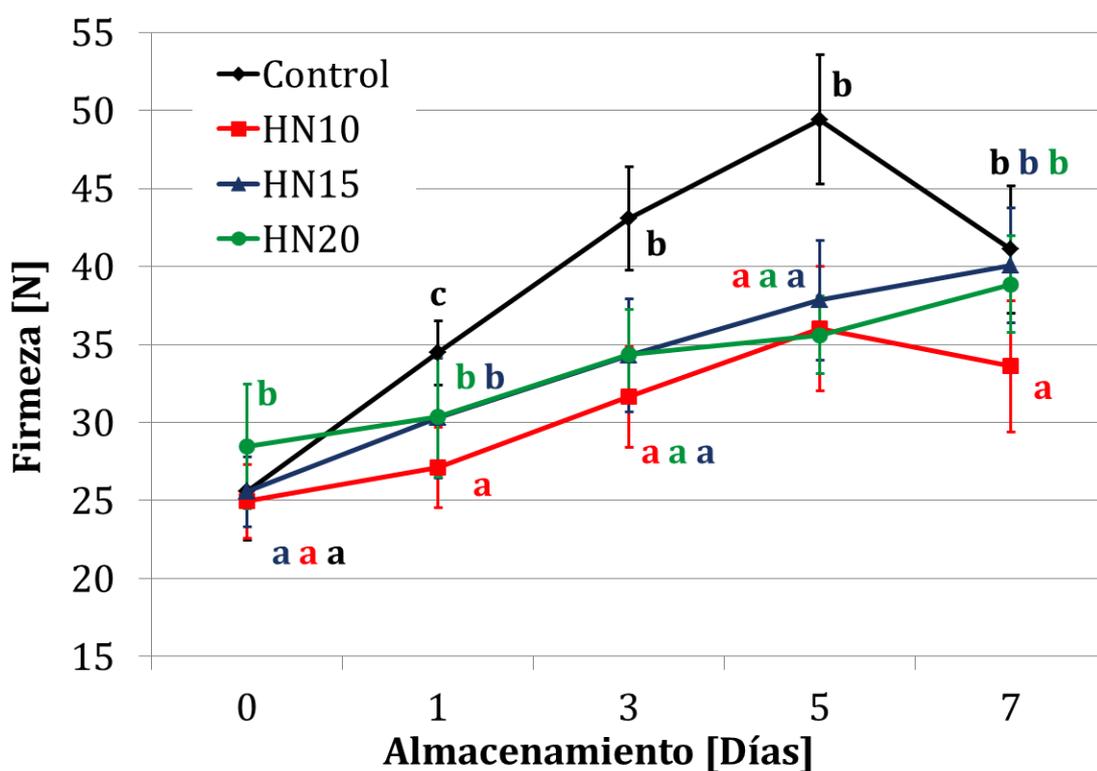


Figura 64. Variación de la firmeza de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

El endurecimiento en productos panificados libres de gluten debido al envejecimiento ha sido ampliamente documentado, lo cual, como ya se ha mencionado, se debe a varios procesos que ocurren en forma simultánea (Carini et

al., 2017; Demirkesen et al., 2014; Rocha Parra, Ribotta y Ferrero, 2015; Sabanis, Lebesi y Tzia, 2009; Sciarini, 2011; Sciarini et al., 2012). Dado que la firmeza es un parámetro clave en los productos panificados, el hecho de que todas las formulaciones de budines con HN durante todo el almacenamiento hayan sido más blandas que el budín control, es un resultado para resaltar. Asimismo, dado que la firmeza inicial de los budines fue similar (con excepción de HN20) este resultado estaría mostrando que la harina de nuez ralentizó el endurecimiento de la miga actuando como un mejorador, efecto que probablemente se encuentre relacionado con la diferente composición de los lípidos aportados por la nuez.

Por otro lado, la cohesividad es una medida del grado de integración que tienen los ingredientes que constituyen la miga. La variación de la cohesividad de la miga con el tiempo de almacenamiento se muestra en la Figura 65. Es posible observar que al día cero el budín control presentó una mayor cohesividad ($0,55 \pm 0,02^b$) en comparación a los budines con HN ($\approx 0,45 \pm 0,03^a$). Es así que, al día uno, la cohesividad de todas las formulaciones se redujo siendo la miga control la que presentó la disminución más pronunciada (descendiendo hasta $0,42 \pm 0,03^b$). A medida que el envejecimiento continuó (días tres, cinco y siete) las migas con HN fueron más cohesivas que la miga control. Este atributo es importante dado que está relacionado con la susceptibilidad de la miga a romperse o desmoronarse (Onyango et al., 2010). Sin embargo, valores muy elevados de cohesividad tampoco son deseados debido a que se relacionan con una mayor dificultad para desintegrar al alimento, y así, formar el bolo alimenticio durante el proceso de deglución (Wee et al., 2018). En este caso, los valores obtenidos no son excesivamente elevados, por lo que se puede argumentar que a partir del día tres las migas con HN presentaron una menor tendencia a desmoronarse que su contraparte control.

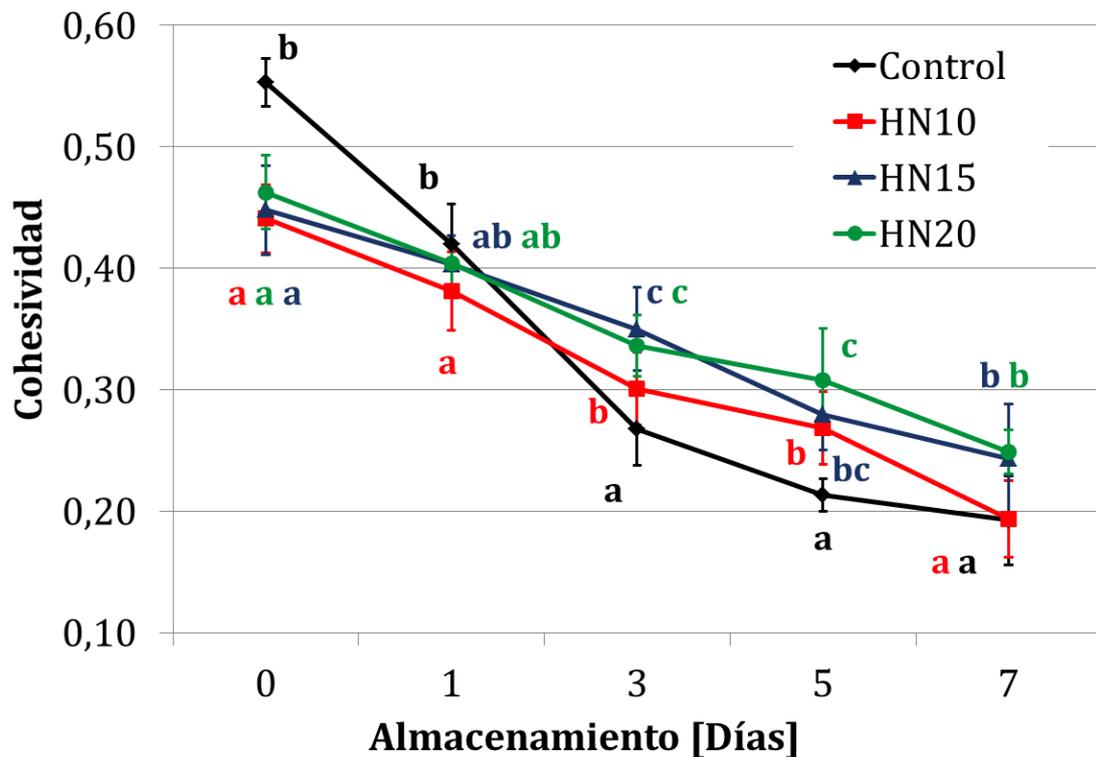


Figura 65. Variación de la cohesividad de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

De la misma manera la resiliencia que se relaciona con la recuperación instantánea de la miga se redujo progresivamente conforme la miga envejeció (Figura 66). De las migas frescas, la miga control fue la que presentó el mayor valor y fue diferente significativamente ($0,35 \pm 0,01^b$) al resto, mientras que las migas con HN no mostraron diferencias significativas entre sí ($\approx 0,25 \pm 0,2^a$). Esta tendencia se repitió al día uno. En cambio, para los días tres y cinco las migas con HN se recuperaron ligeramente mejor que la miga control. Por ejemplo al día cinco, la resiliencia de las migas fue $0,13 \pm 0,01^a$, $0,14 \pm 0,02^{ab}$, $0,15 \pm 0,01^b$ y $0,16 \pm 0,02^b$, para el control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. Finalmente, para el día siete

las migas con HN perdieron resiliencia, es así que la resiliencia presentada por todas las muestras rondó los $\approx 0,12 \pm 0,02$. Es importante agregar que los distintos valores reportados en esta investigación concuerdan con los reportados para miga de magdalenas libres de gluten (Matos, Sanz y Rosell, 2014).

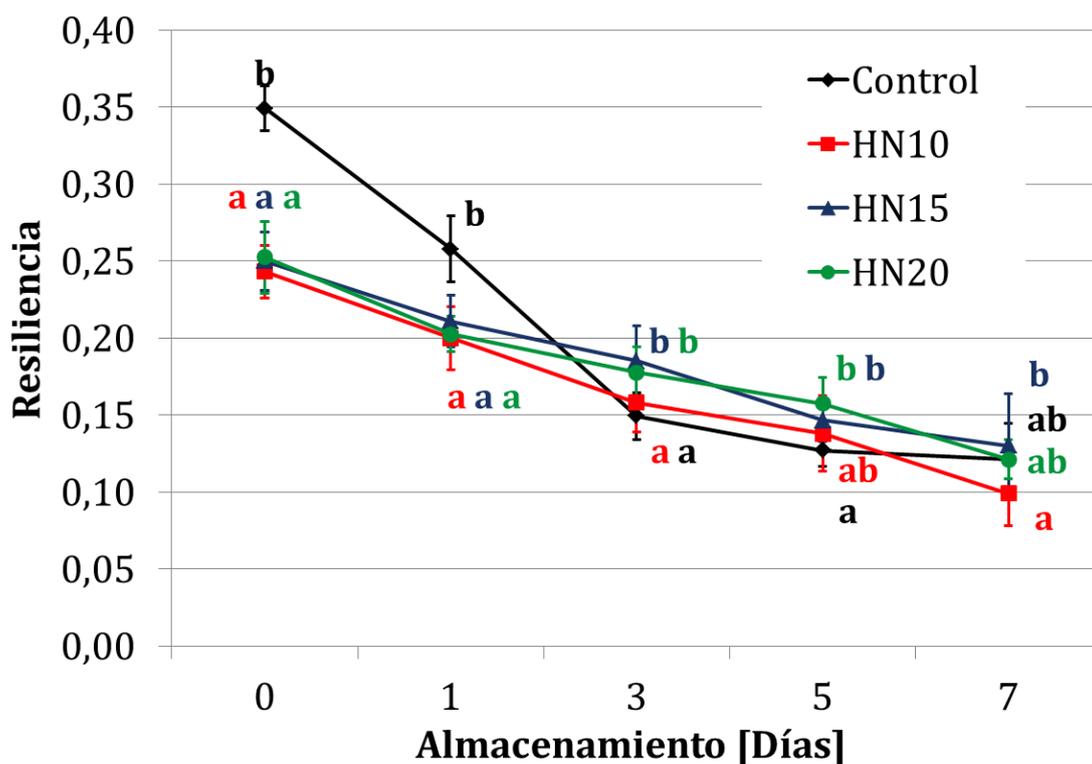


Figura 66. Variación de la resiliencia de la miga de los budines almacenados a 20 °C durante 7 días. Las barras indican el desvió estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

Otro atributo textural importante es la elasticidad (Figura 67), que se relaciona con la recuperación de la miga luego de las dos compresiones. Para los budines frescos sin y con HN los valores obtenidos ($\approx 0,82 \pm 0,04$) son comparables con los informados para muffins preparados con harinas libres de gluten (Matos, Sanz y Rosell, 2014; Shevkani y Singh, 2014). Así mismo, las migas con HN fueron menos elásticas que la miga control hasta el día tres, donde el comportamiento de las

migas se invirtió. De cualquier manera, los resultados de elasticidad mostraron la misma tendencia que lo observado para la cohesividad y la resiliencia. Es decir la elasticidad de la miga se redujo a medida que el tiempo transcurrió.

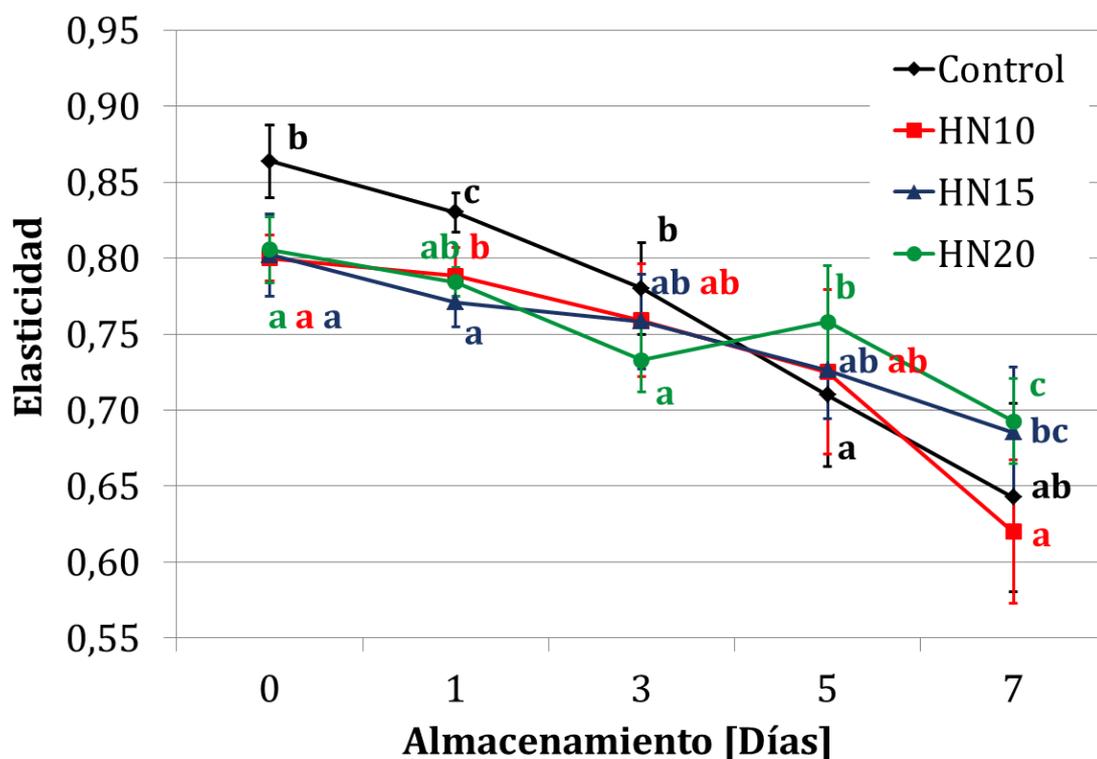


Figura 67. Variación de la elasticidad de la miga de los budines almacenados a 20 °C durante 7 días. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

Finalmente, los cambios en cuanto a masticabilidad de la miga reflejan los cambios en la firmeza, la cohesividad y la elasticidad dado que la masticabilidad es el producto de los tres atributos texturales (Bourne, 2002b). Este atributo brinda una medida del trabajo o energía necesaria por parte del consumidor para masticar la miga antes de ser tragada. En cuanto a los budines frescos (Figura 68) todas las migas con HN fueron más fáciles de masticar que la miga control. Obteniéndose valores de masticabilidad de $12,9 \pm 0,9^c$, $9,2 \pm 0,9^a$, 9 ± 1^a y 11 ± 2^b N

para el control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. Al siguiente día, la miga continuó mostrando el mismo comportamiento que los budines frescos. Es así que al continuar el envejecimiento la masticabilidad de las migas continúa descendiendo pero al día tres se observó un descenso mucho más marcado para los budines control y HN10 ($8,4 \pm 0,9$ y 8 ± 1 N, respectivamente). A partir del día tres el budín control se desmoronaba con mucha más facilidad (debido a la menor cohesividad) comportamiento que siguió empeorando conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento. Mientras que para el día cinco las migas con HN fueron mucho más manejables en comparación con el control. Finalmente, para el día siete, como era de esperar, todas las migas presentaron los valores más bajos de masticabilidad ($\approx 6 \pm 1$ N).

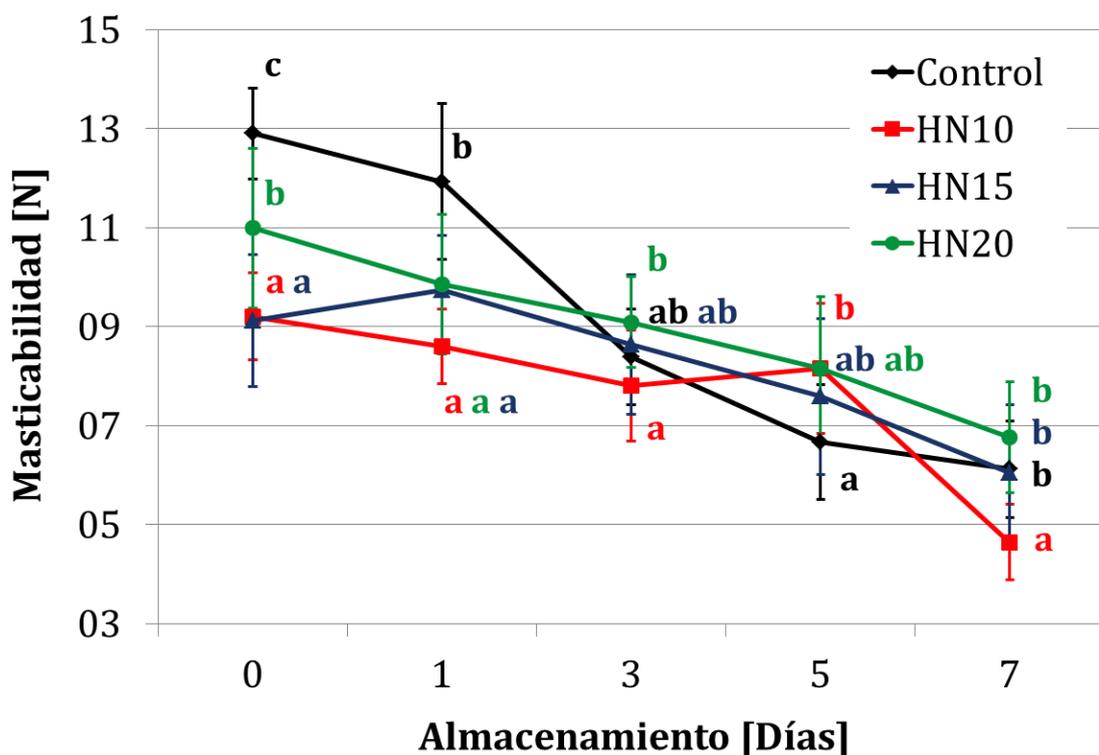


Figura 68. Variación de la masticabilidad [N] de la miga de los budines almacenados a 20 °C. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

6.4.6. Dureza de la corteza durante el almacenamiento

La apariencia es uno de los primeros atributos con que los consumidores pueden calificar a los alimentos. En el caso de los productos panificados la corteza brinda la primera impresión al consumidor, ya sea por su coloración o por su textura. En cuanto a su textura, al envejecer la corteza de los panificados se torna suave y correosa (Parker y Ring, 2000) es por esto que se midió la dureza de la corteza de los budines adicionados con harina de nuez durante el almacenamiento

En la Figura 69 se muestra la evolución de la dureza de la corteza en los budines a medida que el tiempo avanzó. Los budines frescos no presentaron diferencias entre las distintas formulaciones ($\approx 10,3 \pm 0,9$ N). Durante el almacenamiento, la retrogradación de la amilopectina y la migración del agua de la miga hacia la corteza son responsables del envejecimiento de los budines (Hui, 2006). Al día uno las formulaciones con harina de nuez fueron menos duras que el control, aunque sin encontrarse diferencias significativas entre el control y HN10. Además ninguna formulación mostró diferencias significativas entre la dureza medida al día cero y uno. En contraste, la dureza del control al día tres mostró una reducción considerable ($8,3 \pm 0,8$ N), la dureza de las formulaciones con HN también se redujo pero HN15 y HN20 siguieron sin mostrar diferencias significativas con los budines frescos. Al día cinco los budines envejecieron significativamente, presentando durezas de $7,5 \pm 0,9$; 9 ± 1 ; 9 ± 1 y $8,8 \pm 0,9$ N para control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. Claramente las formulaciones con HN envejecieron en menor grado en comparación con el control. Finalmente al día siete la dureza de la corteza de todas las muestras se redujo significativamente ($\approx 8 \pm 1$ N) presentando una textura gomosa y frágil. Varias autores han reportado la

misma tendencia de disminución de la dureza de la corteza para productos libres de gluten almacenados (Gallagher et al., 2003; Paciulli et al., 2016; Sabanis, Tzia y Papadakis, 2008)

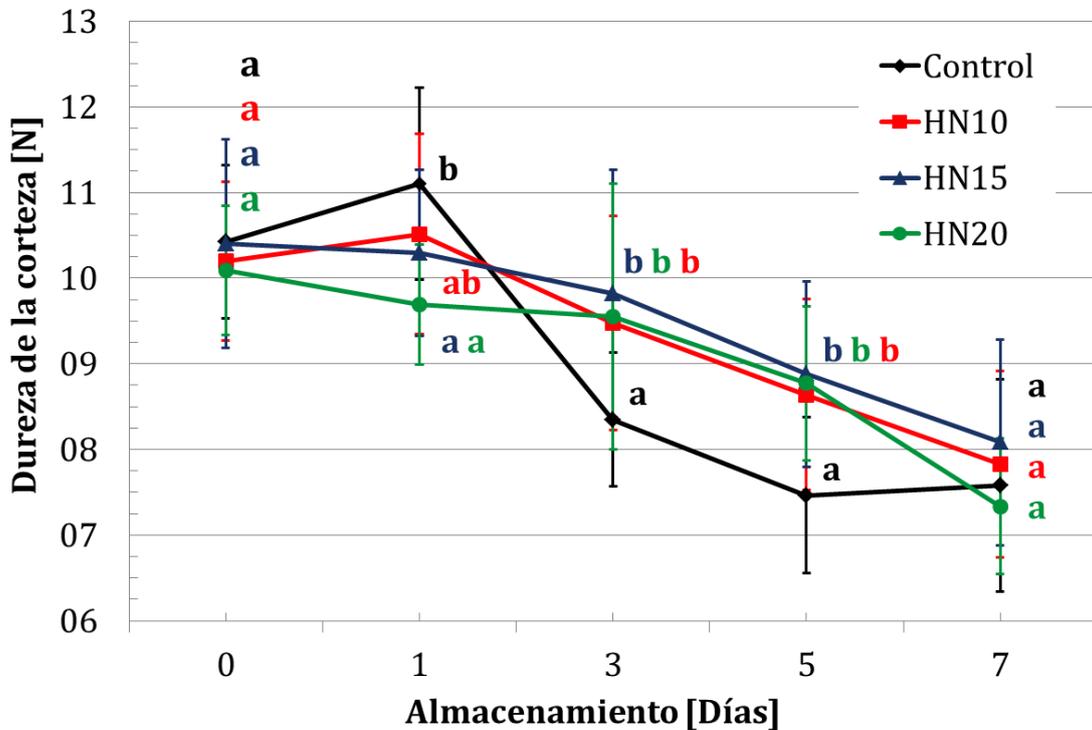


Figura 69. Evolución de la dureza de la corteza de los budines durante el almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar. Letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) y los colores en las letras indican la formulación a la que corresponde

6.4.7. Perfil de ácidos grasos presentes en la miga de los budines durante el almacenamiento

En la Figura 70 se muestran los resultados obtenidos en los budines frescos y almacenados, al analizar el perfil de ácidos grasos y agrupar los mismos de acuerdo a grado de saturación/insaturación. En los budines frescos, es evidente que las proporciones de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados descendieron al aumentar el nivel de harina de nuez. Mientras que al incrementarse la concentración de HN la concentración de poliinsaturados se

incrementó. Es así que en todas las formulaciones los ácidos grasos insaturados representan entre 82-84 % (en relación a los ácidos grasos totales), estos ácidos grasos insaturados presentan uno o más dobles enlaces entre los carbonos que forman su cadena principal (Burdge y Calder, 2014), estos dobles enlaces a parte de hacerlos más saludables los vuelven más susceptibles a cambios externos; cambios que podrían darse durante el envejecimiento de los budines. Debido a esto se determinó el perfil de ácidos grasos presentes en la miga después de siete días de almacenamiento a 20 °C.

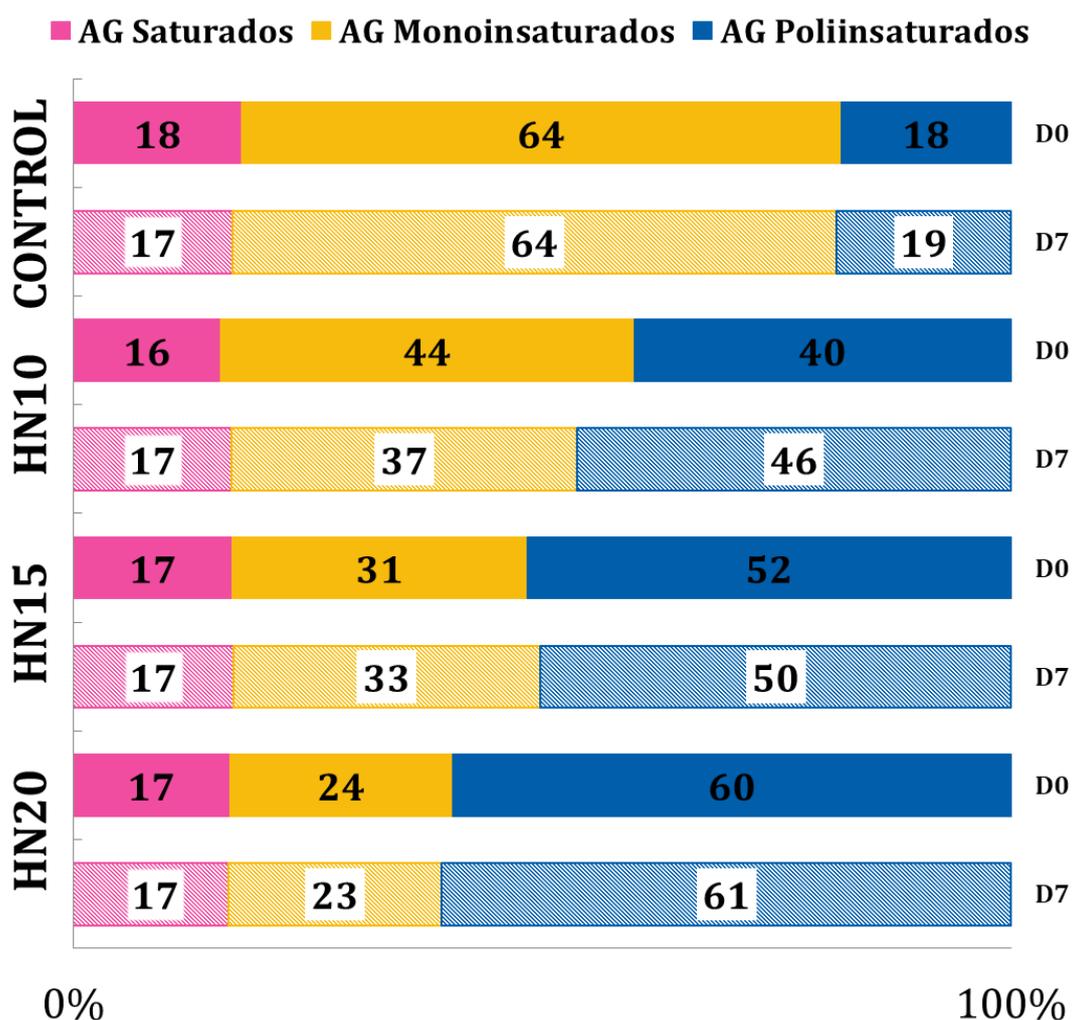


Figura 70. Perfil de ácidos grasos (AG), por grado de saturación, presentes en la miga de los budines [% AG/ AG totales]. D0: día cero y D7: día siete

En términos generales, el perfil de ácidos grasos presentes en los budines almacenados mostró la misma distribución que los budines frescos. Todas las formulaciones presentaron una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados que de saturados. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados al día 7 se obtuvieron los siguientes valores: $64,4 \pm 0,3$ %, $36,9 \pm 0,6$ %, $32,71 \pm 0,07$ % y $22,8 \pm 0,06$ % para el control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. La misma reducción fue observada en el budín fresco cuando se aumentó la concentración de HN, debido a la reducción en el contenido de ácido oleico proveniente del aceite de girasol. Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados aumentaron su concentración conforme la adición de HN creció. Partiendo de $18,7 \pm 0,1$ %, 46 ± 1 %, $50,2 \pm 0,2$ % y $60,7 \pm 0,6$ % para el control, HN10, HN15 y HN20, respectivamente. Por último, los ácidos grasos saturados permanecieron relativamente constantes alrededor del 17 % para todas las formulaciones. Es así que estos valores son comparables con los obtenidos para el budín fresco (Figura 70).

Con la finalidad de poder comparar las distintas formulaciones, se calculó la cantidad en gramos de ácidos grasos por cada 100 g de budín en base seca. Es así que en la Tabla 30 se muestra la variación de los ácidos grasos presentes en la miga de los budines frescos y los almacenados por siete días a 20 °C. Como es evidente, al observar los valores, la variación entre el día cero y siete es mínima aunque estadísticamente significativa, todas menos para HN20. Las diferencias significativas detectadas podrían estar relacionadas con los bajos valores del desvío estándar. Sin embargo, las variaciones se encuentran dentro del error experimental esperado para este tipo de ensayos.

Distintos autores han observado un comportamiento similar durante el envejecimiento de productos panificados con y sin gluten, esto es, un perfil de ácidos grasos relativamente estable durante el almacenamiento (Caponio et al., 2009; Rajiv et al., 2012). Por otro lado, Koczoń y colaboradores (2016) reportaron variaciones en cuanto al perfil de ácidos grasos de galletas pero ante almacenamientos mucho más prolongados (diez meses). Finalmente, hay autores que han encontrado resultados mixtos dependiendo de la formulación de sus respectivas muestras (Antoniewska et al., 2018; Daglioglu et al., 2004).

Tabla 30. Variación del contenido de ácidos grasos (AG) presentes en la miga durante el almacenamiento. [g ácido graso/ 100 g de budín en base seca]

AG	Control		HN10	
	Día Cero	Día Siete	Día Cero	Día Siete
14:00	0,076 ±0,001a	0,070 ±0,002a	0,056 ±0,002a	0,059 ±0,004a
16:00	1,17 ±0,02b	1,11 ±0,01a	0,98 ±0,01a	1,09 ±0,01b
18:00	0,366 ±0,003b	0,349 ±0,003a	0,247 ±0,007a	0,24 ±0,01a
18:1 n9	5,73 ±0,03a	5,80 ±0,02a	3,62 ±0,02b	3,02 ±0,05a
18:2 n6	1,60 ±0,01a	1,64 ±0,01b	2,82 ±0,03a	3,30 ±0,09b
18:3 n3	0,039 ±0,001a	0,04 ±0,00a	0,48 ±0,01a	0,49 ±0,03a

AG	HN15		HN20	
	Día Cero	Día Siete	Día Cero	Día Siete
14:00	0,050 ±0,003a	0,047 ±0,003a	0,049 ±0,001a	0,046 ±0,002a
16:00	0,926 ±0,002a	0,944 ±0,001b	0,90 ±0,01a	0,88 ±0,01a
18:00	0,23 ±0,01a	0,22 ±0,01a	0,20 ±0,01a	0,21 ±0,01a
18:1 n9	2,23 ±0,02a	2,32 ±0,01b	1,65 ±0,05a	1,57 ±0,04a
18:2 n6	3,07 ±0,01b	3,007 ±0,003a	3,39 ±0,06a	3,45 ±0,03a
18:3 n3	0,59 ±0,01a	0,56 ±0,01a	0,72 ±0,01a	0,74 ±0,01a

Promedio ±desvío estándar. [g de ácido graso/ 100 g de budín en base seca]. Ácidos grasos 14:00, 16:00, 18:00, 18:1 n9, 18:2 n6, 18:3 n3 corresponden a los ácidos mirístico, esteárico, palmítico, oleico, linoleico y α -linolenico, respectivamente. AG: ácidos grasos.

6.5. Conclusiones parciales

Como era de esperar, durante el almacenamiento de los budines se observaron cambios propios del envejecimiento de productos panificados. Entre estos cambios se observó la pérdida de humedad, disminución de la actividad acuosa, endurecimiento de la miga, ablandamiento de la corteza, entre otros. No obstante, los budines con harina de nuez mostraron una atenuación en estos procesos. Por ejemplo, el análisis por calorimetría mostró una reducción significativa en el cambio de la entalpía de retrogradación (Día 7) a medida que la concentración de HN aumentó. Este efecto puede deberse principalmente a la dilución del almidón en las formulaciones y a la diferente composición de los lípidos presentes en las mismas.

Asimismo, al medir la entalpía de disociación del complejo amilosa lípido después de un almacenamiento de siete días, se observó un aumento significativo en el cambio de la entalpía de disociación, evidenciando que durante el almacenamiento de los budines la concentración de este complejo aumentó conforme el nivel de HN.

Finalmente, al analizar los perfiles de ácidos grasos presentes en la miga de los budines almacenados, estos mostraron la misma distribución que en los budines frescos. Siendo aproximadamente 83 % ácidos grasos insaturados y 17 % de ácidos grasos saturados.

Capítulo 7: Conclusiones generales

Capítulo 7

7.1. Conclusiones

La caracterización de la harina de nuez demostró que, ésta, conserva gran parte de las propiedades de la nuez y del aceite de nuez, siendo una buena fuente de micro y macronutrientes, en comparación con algunas harinas utilizadas habitualmente en la panificación. La harina de nuez presenta una muy buena relación de ácidos grasos insaturados/saturados (9,06), un buen perfil de aminoácidos y un importante contenido en compuestos bioactivos. Además, la HN mostró buenas propiedades tecno-funcionales, es decir, su incorporación podría mejorar las características nutricionales y tecnológicas de los nuevos productos de panadería. Asimismo, teniendo en cuenta que la HN tiene una *aw* relativamente baja y un alto contenido en lípidos, la estabilidad oxidativa es un factor determinante en su vida útil. Es así que, la HN demostró ser más estable a la oxidación que el aceite de nuez, siendo la vida útil estimada a 20 °C de casi 17 meses. Del mismo modo, a través del almacenamiento en tiempo real de la HN en distintas condiciones, se evidenció una muy baja presencia de compuesto de oxidación primaria (bajos índice de peróxidos) y secundaria (bajos índice de p-anisidina) luego de 10 meses de almacenamiento con y sin vacío y a distintas temperaturas (-20,0 y 20°C). No obstante, se recomienda siempre almacenar la harina de nuez alejada de la luz.

Por otro lado, la adición de la harina de nuez afectó en gran medida a las características microestructurales de los batidos, dando lugar a un comportamiento reológico y una movilidad molecular diferenciada entre el batido control y los batidos con el subproducto. La HN presentó una alta afinidad por el

agua lo que se reflejó en menores tiempos de relajación por RMN y en la reducción de la actividad acuosa y del agua congelable de los batidos, a medida que la adición de HN aumentó. Del mismo modo, la adición de HN mejoró la consistencia de los batidos, haciéndolos mucho más fáciles de manejar. Este incremento de la consistencia y viscosidad de los batidos al incrementar el nivel de HN es compatible con la formación de una estructura proteica (y que contiene lípidos provenientes de la nuez) en la matriz tal como se observó por CSLM.

En cuanto a los productos terminados, la utilización de la harina de nuez en budines sin gluten aumentó los contenidos de fibra y proteína, el volumen específico, la fracción de aire y la complejidad de los alvéolos. El mayor volumen específico podría estar relacionado con el hecho de que los batidos con HN se fijaron a temperaturas más altas que el control, tal como se observó en los ensayos termoreológicos, y presentaron mayor consistencia que el batido control. También se observó un aumento de la dureza de la miga por la adición de HN, pero al mismo tiempo, estas migas fueron más fáciles de masticar. De igual manera, la evaluación sensorial de los budines con un 15 % de HN presentó una aceptación similar a la de la muestra de control. Por lo tanto, estos resultados demostraron que la HN es un ingrediente adecuado para incorporar a budines sin gluten.

Durante el almacenamiento los budines con HN mostraron una atenuación de los cambios típicos relacionados con el envejecimiento: pérdida de humedad, disminución de la actividad acuosa, endurecimiento de la miga y ablandamiento de la corteza. Este efecto puede relacionarse principalmente con la dilución del almidón en las formulaciones y con la diferente composición de los lípidos presentes en las mismas. Además, se observó una reducción de la retrogradación

del almidón, generalmente relacionada con el incremento de la dureza, y un incremento significativo de la formación del complejo amilosa-lípido en presencia de HN. A este complejo se le han atribuido posibles propiedades funcionales ya que es catalogado como almidón resistente tipo V. Por otro lado, en términos generales, el perfil de ácidos grasos presentes en los budines almacenados mostró la misma distribución que los budines frescos.

Finalmente, estos resultados contribuyen al conocimiento y a las posibles aplicaciones de la harina de nuez, un subproducto de la producción de aceite, con gran potencial para ser utilizado en productos panificados dado su perfil nutricional y sus propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales.

Referencias

- AACC (2007), *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, APPROVED METHODS, núm. v. 1-2, AACC.
- AACC (2000), "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists", The American Association of Cereal Chemists.
- Abugoch, Lilian, Eduardo Castro, Cristian Tapia, Maria Cristina Añon, Pilar Gajardo y Andrea Villarroel (2009), "Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa* Willd .) during storage", *international journal of food science & technology*, pp. 2013-2020, <10.1111/j.1365-2621.2009.02023.x>, de 2009.
- Aggett, Peter J. (2020), "Iron", *Present Knowledge in Nutrition*, Elsevier, pp. 375-392.
- Aguilar, Núria, Elena Albanell, Begoña Miñarro y Marta Capellas (2016), "Chestnut flour sourdough for gluten-free bread making", *European Food Research and Technology*, pp. 1795-1802, <10.1007/s00217-016-2679-z>, octubre de 2016.
- Ai, Yongfeng, Jovin Hasjim y Jay-lin Jane (2013), "Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch", *Carbohydrate Polymers*, pp. 120-127, <10.1016/j.carbpol.2012.08.092>, enero de 2013.
- Aires, David, Núria Capdevila y María José Segundo (2005), "Ácidos grasos esenciales", *Offarm*, pp. 96-102, de 2005.
- Alaiz, Manuel, José L. Navarro, Julio Girón y Eduardo Vioque (1992), "Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate", *Journal of Chromatography A*, pp. 181-186, <[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80236-N](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80236-N)>, de 1992.
- Albani, Jihad R. y Yves D. Plancke (1999), "Interaction between calcofluor white and carbohydrates of α 1-acid glycoprotein", *Carbohydrate Research*, pp. 194-200, <10.1016/S0008-6215(99)00128-7>, mayo de 1999.
- Almoraie, Noha M. (2019), "The Effect of Walnut Flour on the Physical and Sensory Characteristics of Wheat Bread", *International Journal of Food Science*, pp. 1-7, <10.1155/2019/5676205>, consultado el 20 de enero de 2019.
- Amaral, Joana S., Susana Casal, José A. Pereira, Rosa M. Seabra y Beatriz P. P. Oliveira (2003), "Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions,

- Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 7698-7702, <10.1021/jf030451d>, consultado el 1 de diciembre de 2003.
- Ancuța, Petraru y Amariei Sonia (2020), "Oil Press-Cakes and Meals Valorization through Circular Economy Approaches: A Review", *Applied Sciences*, pp. 7432, <10.3390/app10217432>, consultado el 22 de octubre de 2020.
- Antoniewska, Agata, Jarosława Rutkowska, Montserrat Martinez Pineda y Agata Adamska (2018), "Antioxidative, nutritional and sensory properties of muffins with buckwheat flakes and amaranth flour blend partially substituting for wheat flour", *LWT*, pp. 217-223, <10.1016/j.lwt.2017.10.039>, marzo de 2018.
- AOCS (2017), "p-Anisidine Value. Official Method Cd 18-90", The American Oil Chemists' Society.
- Arendt, Elke K., Andrew Morrissey, Michelle M. Moore y Fabio Dal Bello (2008), "Gluten-free breads", *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, Elsevier, pp. 289- VII.
- Arendt, Elke K. y Fabio Dal Bello (2011), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, San Diego, CA, USA, Elsevier Science & Technology Books.
- Arp, C.G., M. J. Correa y C. Ferrero (2018), "Rheological and Microstructural Characterization of Wheat Dough Formulated with High Levels of Resistant Starch", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 1149-1163, <10.1007/s11947-018-2083-8>, de 2018.
- Arp, Carlos Gabriel, María Jimena Correa y Cristina Ferrero (2021), "Resistant starches: a smart alternative for the development of functional breads and other starch-based foods", *Food Hydrocolloids*, pp. 106949, <10.1016/j.foodhyd.2021.106949>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21003659>>, consultado el 11 de junio de 2021.
- Arp, Carlos Gabriel, María Jimena Correa y Cristina Ferrero (2018), "Rheological and Microstructural Characterization of Wheat Dough Formulated with High Levels of Resistant Starch", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 1149-1163, <10.1007/s11947-018-2083-8>, junio de 2018.
- Arp, Carlos Gabriel, Cristina Ferrero y María J. Correa (2019), "Panificados Con Almidón Resistente Aptos Para Regímenes Especiales: Formulación Y Caracterización Físicoquímica, Sensorial Y Nutricional", Argentina, Universidad Nacional de La Plata.

- Arranz, Sara, Jara Pérez-Jiménez y Fulgencio Saura-Calixto (2008), "Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter", <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/2083195>>, de 2008.
- Ashogbon, AO y ET Akintayo (2012), "Morphological, functional and pasting properties of starches separated from rice cultivars grown in Nigeria", de 2012.
- Assifaoui, A., D. Champion, E. Chiotelli y A. Verel (2006), "Characterization of water mobility in biscuit dough using a low-field ¹H NMR technique", *Carbohydrate Polymers*, pp. 197-204, <10.1016/j.carbpol.2005.11.020>, mayo de 2006.
- Ayo, J., J. Carballo, M. T. Solas y F. Jiménez-Colmenero (2008), "Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content", *Food Chemistry*, pp. 1547-1552, <10.1016/j.foodchem.2007.09.019>, abril de 2008.
- Bach, Jean-François (2018), "The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals", *Nature Reviews Immunology*, pp. 105-120, <10.1038/nri.2017.111>, febrero de 2018.
- Badui Dergal, Salvador (2016), *Química de los alimentos*, México, Pearson Educación.
- Balet, Sandra, Anina Guelpa, Glen Fox y Marena Manley (2019), "Rapid Visco Analyser (RVA) as a Tool for Measuring Starch-Related Physicochemical Properties in Cereals: a Review", *Food Analytical Methods*, pp. 2344-2360, <10.1007/s12161-019-01581-w>, octubre de 2019.
- Bao, Jinsong y Christine J. Bergman (2018), "Rice Flour and Starch Functionality", *Starch in Food*, Elsevier, pp. 373-419.
- Bechtel, D. B. y B. O. Juliano (1980), "Formation of Protein Bodies in the Starchy Endosperm of Rice (*Oryza sativa* L.): A Re-investigation*", *Annals of Botany*, pp. 503-509, <10.1093/oxfordjournals.aob.a085852>, mayo de 1980.
- Belorio, Mayara y Manuel Gómez (2020), "Gluten-free muffins versus gluten containing muffins: Ingredients and nutritional differences", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 249-253, <10.1016/j.tifs.2020.03.015>, agosto de 2020.
- Benzie, I. F. y J. J. Strain (1999), "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and

- ascorbic acid concentration", *Methods in Enzymology*, pp. 15-27, <10.1016/s0076-6879(99)99005-5>, de 1999.
- Bertrand, Robert, William Holmes, Cory Orgeron, Carl McIntyre, Rafael Hernandez y Emmanuel D. Revellame (2019), "Rapid Estimation of Parameters for Gelatinization of Waxy Corn Starch", *Foods*, pp. 556, <10.3390/foods8110556>, consultado el 6 de noviembre de 2019.
- Betancur-Ancona, David, Gwendolyne Peraza-Mercado, Yolanda Moguel-Ordoñez y Sonia Fuertes-Blanco (2004), "Physicochemical characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Jack bean (*Canavalia ensiformis*) fibrous residues", *Food Chemistry*, pp. 287-295, <10.1016/S0308-8146(03)00213-9>, consultado el 1 de febrero de 2004.
- Blanchard, C., H. Labouré, A. Verel y D. Champion (2012), "Study of the impact of wheat flour type, flour particle size and protein content in a cake-like dough: Proton mobility and rheological properties assessment", *Journal of Cereal Science*, pp. 691-698, <10.1016/j.jcs.2012.08.005>, noviembre de 2012.
- Borderías, A. J., I. Sánchez-Alonso y M. Pérez-Mateos (2005), "New applications of fibres in foods: Addition to fishery products", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 458-465, <10.1016/j.tifs.2005.03.011>, consultado el 1 de octubre de 2005.
- Bourne, Malcolm C. (2002a), *Food texture and viscosity: concept and measurement*, Food science and technology international series, , San Diego, Academic Press.
- Bourne, Malcolm C. (2002b), "Principles of Objective Texture Measurement", *Food Texture and Viscosity*, Elsevier, pp. 107-188.
- Bozdogan, Neslihan, Seher Kumcuoglu y Sebnem Tavman (2019), "Investigation of the effects of using quinoa flour on gluten-free cake batters and cake properties", *Journal of Food Science and Technology*, pp. 683-694, <10.1007/s13197-018-3523-1>, febrero de 2019.
- Bradford, Marion M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, pp. 248-254, <10.1016/0003-2697(76)90527-3>, mayo de 1976.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier y C. Berset (1995), "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 25-30, <10.1016/S0023-6438(95)80008-5>, de 1995.

- Buera, M. Pilar, R. D. Lozano y C. Petriella (1985), "Definition of colour in the non-enzymatic browning process", *Die Farbe* 32/33, pp. 316-326.
- Burbano, Juan J., Darío M. Cabezas y M. Jimena Correa (2022), "Effect of walnut flour addition on rheological, thermal and microstructural properties of a gluten free-batter", *LWT*, pp. 112819, <10.1016/j.lwt.2021.112819>, enero de 2022.
- Burbano, Juan José y María Jimena Correa (2021), "Composition and Physicochemical Characterization of Walnut Flour, a By-product of Oil Extraction", *Plant Foods for Human Nutrition*, <10.1007/s11130-021-00898-4>, <<https://link.springer.com/10.1007/s11130-021-00898-4>>, consultado el 25 de mayo de 2021.
- Burdge, Graham C. y Philip C. Calder (2014), "Introduction to Fatty Acids and Lipids", *World Review of Nutrition and Dietetics*, eds. P.C. Calder, D.L. Waitzberg, y B. Koletzko, Basel, S. KARGER AG, pp. 1-16.
- C.A.A Art 696 (2011), *CAA Art 696*, Capítulo IX Alimentos Farinceos - Cereals, Harinas y Derivados.
- C.A.A (Art 1338) (2011), *CAA Art. 1383*, Código Alimentario Argentino. (Art. 1383). Capítulo XVII-Alimentos de Regimen o Dietéticos.
- Caio, Giacomo, Umberto Volta, Anna Sapone, Daniel A. Leffler, Roberto De Giorgio, Carlo Catassi y Alessio Fasano (2019), "Celiac disease: a comprehensive current review", *BMC Medicine*, pp. 142, <10.1186/s12916-019-1380-z>, diciembre de 2019.
- Calado, João y Mariana Verdelho Machado (2022), "Celiac Disease Revisited", *GE - Portuguese Journal of Gastroenterology*, pp. 111-124, <10.1159/000514716>, de 2022.
- Caponio, Francesco, Carmine Summo, Vito M. Paradiso, Antonella Pasqualone y Tommaso Gomes (2009), "Evolution of the oxidative and hydrolytic degradation of biscuits' fatty fraction during storage: Evolution of lipid degradation of biscuits during storage", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 1392-1396, <10.1002/jsfa.3600>, junio de 2009.
- Cappelli, Alessio, Noemi Oliva y Enrico Cini (2020), "A Systematic Review of Gluten-Free Dough and Bread: Dough Rheology, Bread Characteristics, and Improvement Strategies", *Applied Sciences*, pp. 6559, <10.3390/app10186559>, consultado el 20 de septiembre de 2020.

- Capriles, Vanessa D. y José Alfredo G. Arêas (2014), "Novel Approaches in Gluten-Free Breadmaking: Interface between Food Science, Nutrition, and Health: Novel approaches in gluten-free bread...", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 871-890, <10.1111/1541-4337.12091>, septiembre de 2014.
- Carini, Eleonora, Elena Curti, Fabio Fattori, Maria Paciulli y Elena Vittadini (2017), "Staling of gluten-free breads: physico-chemical properties and ¹H NMR mobility", *European Food Research and Technology*, pp. 867-877, <10.1007/s00217-016-2801-2>, mayo de 2017.
- Catassi, Carlo, Debby Kryszak, Bushra Bhatti, Craig Sturgeon, Kathy Helzlsouer, Sandra L. Clipp, Daniel Gelfond, Elaine Puppa, Anthony Sferruzza y Alessio Fasano (2010), "Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974", *Annals of Medicine*, pp. 530-538, <10.3109/07853890.2010.514285>, octubre de 2010.
- Catassi, Carlo y Alessio Fasano (2008), "Celiac disease", *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, eds. Elke K. Arendt y Fabio Dal Bello, Burlington, MA, USA, Academic Press, pp. 1-27.
- Cauvain, Stanley P. (2007), "Other Cereals in Breadmaking", *Technology of Breadmaking*, Boston, MA, Springer US, pp. 371-388.
- Cauvain, Stanley P. (2003), *Bread making: improving quality*, Boca Raton; Cambridge, Eng., CRC Press ; Woodhead.
- Cauvain, Stanley P. y Linda S. Young (2006), *Baked products: science, technology and practice*, Oxford ; Ames, Iowa, Blackwell Pub.
- Cevoli, Chiara, Federica Balestra, Luigi Ragni y Angelo Fabbri (2013), "Rheological characterisation of selected food hydrocolloids by traditional and simplified techniques", *Food Hydrocoll.*, pp. 142-150, <10.1016/j.foodhyd.2013.02.022>, agosto de 2013.
- Chang, Qing, Baodong Zheng, Yi Zhang y Hongliang Zeng (2021), "A comprehensive review of the factors influencing the formation of retrograded starch", *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 163-173, <10.1016/j.ijbiomac.2021.07.050>, septiembre de 2021.
- Chapman, Kathryn W., Ifat Sagi, Joe M. Regenstein, Tony Bimbo, Jane B. Crowther y Clyde E. Stauffer (1996), "Oxidative stability of hydrogenated menhaden oil shortening blends in cookies, crackers, and snacks", *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 167-172, <10.1007/BF02523890>, de 1996.

- Cheftel, Jean-Claude y Henri Cheftel (1992), *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*, Zaragoza, Acribia.
- Chinachoti, Pavinee y Yael Vodovotz (eds.) (2000), *Bread Staling*, CRC Press, septiembre.
- Cian, Raúl E., Antonela G. Garzón, David Betancur Ancona, Luis Chel Guerrero y Silvina R. Drago (2015), "Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 881-888, <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.043>>, de 2015.
- Claxton, Nathan S., Thomas J. Fellers y Michael W. Davidson (2006), "Microscopy, Confocal", *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, ed. John G. Webster, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., pp. emd291.
- Codex STAN 118-79 (1979), *Codex STAN 118-79*, Codex STAN 118-79.
- Codigo Alimentario Argentino (2013), *Resolución Conjunta 161/2013 y 213/2013*.
- Cofrades, S., A. Serrano, J. Ayo, J. Carballo y F. Jiménez-Colmenero (2008), "Characteristics of meat batters with added native and preheated defatted walnut", *Food Chemistry*, pp. 1506-1514, <[10.1016/j.foodchem.2007.10.006](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.006)>, abril de 2008.
- Correa, María J., Juan J. Burbano Moreano, Luciano M. Guardianelli, Adriana R. Weisstaub, Angela Zuleta y María V. Salinas (2021), "Garlic: A natural bread improver for wheat bread with a high level of resistant starch", *Journal of Food Processing and Preservation*, pp. e15519, <[10.1111/jfpp.15519](https://doi.org/10.1111/jfpp.15519)>, <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.15519>>, de 2021.
- Correa, María Jimena, Evelina Ferrer, María Cristina Añón y Cristina Ferrero (2014a), "Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins", *Food Hydrocolloids*, pp. 91-99, <[10.1016/j.foodhyd.2013.04.020](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.020)>, marzo de 2014.
- Correa, María Jimena, Evelina Ferrer, María Cristina Añón y Cristina Ferrero (2014b), "Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins", *Food Hydrocolloids*, pp. 91-99, <[10.1016/j.foodhyd.2013.04.020](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.020)>, <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13001355>>, marzo de 2014.

- Costantini, Lara, Lea Lukšič, Romina Molinari, Ivan Kreft, Giovanni Bonafaccia, Laura Manzi y Nicolò Merendino (2014), "Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients", *Food Chemistry*, pp. 232-240, <10.1016/j.foodchem.2014.05.095>, diciembre de 2014.
- Crockett, Rachel, Pauline Ie y Yael Vodovotz (2011), "How Do Xanthan and Hydroxypropyl Methylcellulose Individually Affect the Physicochemical Properties in a Model Gluten-Free Dough?", *Journal of Food Science*, pp. E274-E282, <10.1111/j.1750-3841.2011.02088.x>, abril de 2011.
- Culetu, Alina, Denisa Eglantina Duta, Maria Papageorgiou y Theodoros Varzakas (2021), "The Role of Hydrocolloids in Gluten-Free Bread and Pasta; Rheology, Characteristics, Staling and Glycemic Index", *Foods*, pp. 3121, <10.3390/foods10123121>, consultado el 16 de diciembre de 2021.
- Culver, Catherine A., Ronald E. Wrolstad y American Chemical Society (eds.) (2008), *Color quality of fresh and processed foods*, ACS symposium series, núm. 983, Washington, DC: [New York], American Chemical Society; Distributed by Oxford University Press.
- Daglioglu, Orhan, Murat Tasan, Umit Gecgel y Figen Daglioglu (2004), "Changes in Oxidative Stability of Selected Bakery Products during Shelf Life", *Food Science and Technology Research*, pp. 464-468, <10.3136/fstr.10.464>, de 2004.
- Defloor, Isabelle, Isabel Dehing y JA Delcour (1998), "Physico-chemical properties of cassava starch", *Starch-Stärke*, Wiley Online Library, pp. 58-64, de 1998.
- Demirkesen, Ilkem, Osvaldo H. Campanella, Gulum Sumnu, Serpil Sahin y Bruce R. Hamaker (2014), "A Study on Staling Characteristics of Gluten-Free Breads Prepared with Chestnut and Rice Flours", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 806-820, <10.1007/s11947-013-1099-3>, marzo de 2014.
- Demirkesen, Ilkem, Behic Mert, Gulum Sumnu y Serpil Sahin (2010), "Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations", *Journal of Food Engineering*, consultado el 1 de enero de 2010.
- Dhingra, Devinder, Mona Michael, Hradesh Rajput y R. T. Patil (2012), "Dietary fibre in foods: a review", *Journal of Food Science and Technology*, pp. 255-266, <10.1007/s13197-011-0365-5>, junio de 2012.
- Dickinson, Eric (2003), "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems", *Food Hydrocolloids*, pp. 25-39, <10.1016/S0268-005X(01)00120-5>, enero de 2003.

- Dieli-Crimi, Romina, M. Carmen Cénit y Concepción Núñez (2015), "The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications", *Journal of Autoimmunity*, pp. 26-41, <10.1016/j.jaut.2015.07.003>, noviembre de 2015.
- Doona, C. J. y Moo-Yeol Baik (2007), "Molecular mobility in model dough systems studied by time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Journal of Cereal Science*, pp. 257-262, <10.1016/j.jcs.2006.07.015>, mayo de 2007.
- Dourado, Fernando, António Barros, Manuel Mota, Manuel A. Coimbra y Francisco M. Gama (2004), "Anatomy and cell wall polysaccharides of almond (*Prunus dulcis* D. A. Webb) seeds", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1364-1370, <10.1021/jf030061r>, consultado el 10 de marzo de 2004.
- Eliasson, Ann-Charlotte (1994), "Interactions between starch and lipids studied by DSC", *Thermochimica Acta*, pp. 343-356, <10.1016/0040-6031(94)80101-0>, noviembre de 1994.
- Elleuch, Mohamed, Dorothea Bedigian, Olivier Roiseux, Souhail Besbes, Christophe Blecker y Hamadi Attia (2011), "Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review", *Food Chemistry*, pp. 411-421, <10.1016/j.foodchem.2010.06.077>, consultado el 15 de enero de 2011.
- Espinoza, Eli (2017), "Evaluación de vida útil de los alimentos (shelf life): Efecto de la temperatura", *Ciencia y desarrollo*, pp. 90-94, de 2017.
- Esteller, Mauricio Sergio, Renata Lira Amaral y Suzana Caetano Da Silva Lannes (2004), "Effect Of Sugar And Fat Replacers On The Texture Of Baked Goods", *Journal of Texture Studies*, pp. 383-393, <10.1111/j.1745-4603.2004.tb00602.x>, octubre de 2004.
- Evans, I. D. (1986), "An Investigation of Starch/Surfactant Interactions Using Viscosimetry and Differential Scanning Calorimetry", *Starch - Stärke*, pp. 227-235, <10.1002/star.19860380705>, de 1986.
- Faltermaier, Andrea, Martin Zarnkow, Thomas Becker, Martina Gastl y Elke K. Arendt (2015), "Common wheat (*Triticum aestivum* L.): evaluating microstructural changes during the malting process by using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy", *European Food Research and Technology*, pp. 239-252, <10.1007/s00217-015-2450-x>, agosto de 2015.

- FAO, F. Agriculture Organization of the United Nations (2003), *Food Energy- Methods of Analysis and Conversion Factors.*., Food and Nutrition Paper, núm. 77, Rome, Italy.
- FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (1999), *Codex alimentarius : standard for named vegetable oils*, First edition. Rome : World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007.
- Farhoosh, Reza (2007), "Shelf-life prediction of edible fats and oils using Rancimat", *Lipid Technology*, pp. 232-234, <10.1002/lite.200700073>, octubre de 2007.
- Fasano, Alessio y Carlo Catassi (2001), "Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum", *Gastroenterology*, pp. 636-651, <10.1053/gast.2001.22123>, febrero de 2001.
- Feldman, Elaine B. (2002), "The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease", *The Journal of Nutrition*, pp. 1062S-1101S, <10.1093/jn/132.5.1062S>, mayo de 2002.
- Fennema, Owen R., Srinivasan Damodaran Parkin, Kirk, James N. BeMiller y K. Huber (2010), *Química de los Alimentos*, Zaragoza, Acribia.
- Folch, Jordi, M. Lees y G. H. Sloane Stanley (1957), "A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES", *Journal of Biological Chemistry*, pp. 497-509, <10.1016/S0021-9258(18)64849-5>, mayo de 1957.
- Food and Drug Administration (2020), *Food Labeling - FDA*, 21CFR101.54.
- Frankel, Edwin N. (2005), *Lipid oxidation*, Oily Press lipid library, núm. 18, Bridgwater, Oily Press.
- Fu, Meixia, Xuyang Sun, Di Wu, Linghan Meng, Xiao Feng, Weiwei Cheng, Chengcheng Gao, Yuling Yang, Xinchun Shen y Xiaozhi Tang (2020), "Effect of partial substitution of buckwheat on cooking characteristics, nutritional composition, and in vitro starch digestibility of extruded gluten-free rice noodles", *LWT*, pp. 109332, <10.1016/j.lwt.2020.109332>, mayo de 2020.
- Gabriele, Domenico, Bruno de Cindio y Paolo D'Antona (2001), "A weak gel model for foods", *Rheologica Acta*, pp. 120-127, <10.1007/s003970000139>, consultado el 1 de marzo de 2001.
- Gallagher, E., A. Kunkel, T. R. Gormley y E. K. Arendt (2003), "The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified

- atmosphere", *European Food Research and Technology*, pp. 44-48, <10.1007/s00217-003-0818-9>, consultado el 1 de diciembre de 2003.
- Gallagher, E., T. R. Gormley y E. K. Arendt (2004), "Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 143-152, <10.1016/j.tifs.2003.09.012>, marzo de 2004.
- Garro Linck, Leonel (2016), "Estudio y caracterización de sistemas porosos por Resonancia Magnética Nuclear", de 2016.
- Gelders, Greta G., Hans Goesaert y Jan A. Delcour (2006), "Amylose-Lipid Complexes as Controlled Lipid Release Agents during Starch Gelatinization and Pasting", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1493-1499, <10.1021/jf051743c>, consultado el 1 de febrero de 2006.
- Goesaert, H., K. Brijs, W. S. Veraverbeke, C. M. Courtin, K. Gebruers y J. A. Delcour (2005), "Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 12-30, <10.1016/j.tifs.2004.02.011>, enero de 2005.
- Goldstein, Joseph (ed.) (2003), *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Gómez, Manuel (2022), "Gluten-free bakery products: Ingredients and processes", *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, pp. 189-238.
- Goranova, Zhivka, Maria Marudova y Marianna Baeva (2019), "Influence of functional ingredients on starch gelatinization in sponge cake batter", *Food Chemistry*, pp. 124997, <10.1016/j.foodchem.2019.124997>, noviembre de 2019.
- Goswami, D., R. K. Gupta, D. Mridula, M. Sharma y S. K. Tyagi (2015), "Barnyard millet based muffins: Physical, textural and sensory properties", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 374-380, <10.1016/j.lwt.2015.05.060>, noviembre de 2015.
- Guardianelli, Luciano M., María V. Salinas y María C. Puppo (2019), "Chemical and thermal properties of flours from germinated amaranth seeds", *Journal of Food Measurement and Characterization*, pp. 1078-1088, <10.1007/s11694-018-00023-1>, consultado el 1 de junio de 2019.
- Gujral, Hardeep Singh y Cristina M. Rosell (2004), "Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase", *Food Research International*, pp. 75-81, <10.1016/j.foodres.2003.08.001>, enero de 2004.

- Gularte, Márcia Arocha, Esther de la Hera, Manuel Gómez y Cristina M. Rosell (2012), "Effect of different fibers on batter and gluten-free layer cake properties", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 209-214, <10.1016/j.lwt.2012.03.015>, octubre de 2012.
- Gularte, Márcia Arocha, Manuel Gómez y Cristina M. Rosell (2012), "Impact of Legume Flours on Quality and In Vitro Digestibility of Starch and Protein from Gluten-Free Cakes", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 3142-3150, <10.1007/s11947-011-0642-3>, noviembre de 2012.
- Gullón (2020), "Propiedades del aceite de girasol alto oleico".
- Gupta, U. C. y S. C. Gupta (2014), "Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review", *Pedosphere*, pp. 13-38, <10.1016/S1002-0160(13)60077-6>, consultado el 1 de febrero de 2014.
- Gutiérrez, Luis Fernando, Sebastian Arias, Danny Garzón, Diana Marcela López y Andrea Osorio (2014), "Transición vítrea en alimentos: sistemas binarios agua-carbohidratos", *Revista Vector*, pp. 21-28, de 2014.
- Gutiérrez, Orlando M. (2020), "Phosphorus", *Present Knowledge in Nutrition*, Elsevier, pp. 335-348.
- Guy, R. C. E. y H. R. Pithawala (2007), "Rheological studies of high ratio cake batters to investigate the mechanism of improvement of flours by chlorination or heat treatment", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 153-166, <10.1111/j.1365-2621.1981.tb01005.x>, consultado el 28 de junio de 2007.
- Hager, Anna-Sophie, Anika Wolter, Mariko Czerny, Jürgen Bez, Emanuele Zannini, Elke K. Arendt y Michael Czerny (2012), "Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts", *European Food Research and Technology*, pp. 333-344, <10.1007/s00217-012-1763-2>, agosto de 2012.
- Hager, Anna-Sophie, Geertrui M. Bosmans y Jan A. Delcour (2014), "Physical and Molecular Changes during the Storage of Gluten-Free Rice and Oat Bread", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 5682-5689, <10.1021/jf502036x>, consultado el 18 de junio de 2014.
- Halliwell, Barry, M. Antonia Murcia, Susanna Chirico y Okezie I. Aruoma (1995), "Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 7-20, <10.1080/10408399509527682>, enero de 1995.

- Han, Hye M., Jun H. Cho, Hang W. Kang y Bong K. Koh (2012), "Rice varieties in relation to rice bread quality: Rice for rice bread", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 1462-1467, <10.1002/jsfa.4727>, mayo de 2012.
- Hasjim, Jovin, Sun-Ok Lee, Suzanne Hendrich, Stephen Setiawan, Yongfeng Ai y Jaylin Jane (2010), "Characterization of a Novel Resistant-Starch and Its Effects on Postprandial Plasma-Glucose and Insulin Responses", *Cereal Chemistry*, pp. 257-262, <10.1094/CCHEM-87-4-0257>, julio de 2010.
- Hebeda, Ronald E. y Henry F. Zobel (eds.) (1996), *Baked goods freshness: technology, evaluation, and inhibition of staling*, Food science and technology, núm. 75, New York, Marcel Dekker.
- de la Hera, Esther, Mario Martínez, Bonastre Oliete y Manuel Gómez (2013), "Influence of Flour Particle Size on Quality of Gluten-Free Rice Cakes", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 2280-2288, <10.1007/s11947-012-0922-6>, septiembre de 2013.
- Hernández, Natalia, Sheila Martínez, Bárbara Ruiz, Julia Gargallo, Sara Malén y Teresa Delgado (2021), "Celiaquía en adultos. Una revisión sistemática", <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8067381>>, de 2021.
- Herranz, Beatriz, Wenceslao Canet, María José Jiménez, Raúl Fuentes y María Dolores Álvarez (2016), "Characterisation of chickpea flour-based gluten-free batters and muffins with added biopolymers: rheological, physical and sensory properties", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 1087-1098, <10.1111/ijfs.13092>, mayo de 2016.
- Hesso, Nesrin, Catherine Loisel, Sylvie Chevallier, Alessandra Marti, Patricia Le-Bail, Alain Le-Bail y Koushik Seetharaman (2015), "The role of ingredients on thermal and rheological properties of cake batters and the impact on microcake texture", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 1171-1178, <10.1016/j.lwt.2015.04.041>, octubre de 2015.
- Hesso, Nesrin, Alessandra Marti, Patricia Le-Bail, Catherine Loisel, Sylvie Chevallier, Alain Le-Bail y Koushik Seetharaman (2015), "Conformational changes of polymers in model batter systems", *Food Hydrocolloids*, pp. 101-107, <10.1016/j.foodhyd.2015.05.010>, octubre de 2015.
- Horiba Scientific (2018), "Refractive Index Selection", *Measurement Techniques*, núm. AN157, Horiba Scientific.
- Horstmann, Stefan, Kieran Lynch y Elke Arendt (2017), "Starch Characteristics Linked to Gluten-Free Products", *Foods*, pp. 29, <10.3390/foods6040029>, consultado el 6 de abril de 2017.

- Horvath, Michael y Christoph Lipka (2017), "Color gamut plotted within the CIE XYZ and CIE LAB color space", *User: Datumizer*.
- Huang, Qiang, Xu Chen, Shaokang Wang y Jianzhong Zhu (2020), "Amylose-Lipid Complex", *Starch Structure, Functionality and Application in Foods*, ed. Shujun Wang, Singapore, Springer Singapore, pp. 57-76.
- Hug-Iten, S., F. Escher y B. Conde-Petit (2003), "Staling of Bread: Role of Amylose and Amylopectin and Influence of Starch-Degrading Enzymes", *Cereal Chemistry Journal*, pp. 654-661, <10.1094/CCHEM.2003.80.6.654>, noviembre de 2003.
- Hui, Y. H. (ed.) (2006), *Handbook of food science, technology, and engineering*, Food science and technology, núm. 148, Boca Raton, Taylor & Francis.
- Hui, Y. H. y Harold Corke (2006), *Bakery products: science and technology*.
- Jensen, Robert G., Ann M. Ferris y Carol J. Lammi-Keefe (1991), "The Composition of Milk Fat", *Journal of Dairy Science*, pp. 3228-3243, <10.3168/jds.S0022-0302(91)78509-3>, septiembre de 1991.
- Jensen, Sidsel, Henrik Oestdal, Morten R. Clausen, Mogens L. Andersen y Leif H. Skibsted (2011), "Oxidative stability of whole wheat bread during storage", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 637-642, <10.1016/j.lwt.2010.10.011>, abril de 2011.
- Juliano, Bienvenido O. (ed.) (1985), *Rice: chemistry and technology*, AACC monograph series, , St. Paul, Minn., USA, American Association of Cereal Chemists.
- Juszczak, Lesław, Teresa Fortuna y Franciszek Krok (2003), "Non-contact Atomic Force Microscopy of Starch Granules Surface. Part I. Potato and Tapioca Starches", *Starch - Stärke*, pp. 1-7, <10.1002/star.200390012>, enero de 2003.
- Karim, A. (2000), "Methods for the study of starch retrogradation", *Food Chemistry*, pp. 9-36, <10.1016/S0308-8146(00)00130-8>, octubre de 2000.
- Kaur, Lovedeep, Jaspreet Singh, Owen J. McCarthy y Harmit Singh (2007), "Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches", *Journal of Food Engineering*, pp. 383-394, <10.1016/j.jfoodeng.2007.02.059>, octubre de 2007.
- Kelly, P. A. (2015), "Mechanics Lecture Notes: An introduction to Solid Mechanics".

- Koczoń, Piotr, Edyta Lipińska, Ewa Czerniawska-Piątkowska, Małgorzata Mikuła y Bartłomiej J. Bartyzel (2016), "The change of fatty acids composition of Polish biscuits during storage", *Food Chemistry*, pp. 341-348, <10.1016/j.foodchem.2016.02.019>, julio de 2016.
- Krzywicka, Barbara, Katarzyna Herman, Małgorzata Kowalczyk-Zajac y Tomasz Pytrus (2014), "Celiac Disease and Its Impact on the Oral Health Status – Review of the Literature", *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, pp. 675-681, <10.17219/acem/37212>, de 2014.
- Labuckas, Diana, Damián Maestri y Alicia Lamarque (2014), "Effect of different oil extraction methods on proximate composition and protein characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) flour", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 794-799, <10.1016/j.lwt.2014.06.038>, consultado el 1 de diciembre de 2014.
- Labuckas, Diana, Damián Maestri y Alicia Lamarque (2011), "Lipid and protein stability of partially defatted walnut flour (*Juglans regia* L.) during storage: Walnut flour stability", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 1388-1397, <10.1111/j.1365-2621.2011.02632.x>, julio de 2011.
- Labuckas, Diana O., Damián M. Maestri, Milton Perelló, Marcela L. Martínez y Alicia L. Lamarque (2008), "Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins", *Food Chemistry*, pp. 607-612, <10.1016/j.foodchem.2007.08.051>, consultado el 15 de marzo de 2008.
- Labuckas, Damián Maestri y Alicia Lamarque (2014), "Effect of different oil extraction methods on proximate composition and protein characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) flour", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 794-799, <10.1016/j.lwt.2014.06.038>, consultado el 1 de diciembre de 2014.
- Labuza, T. P. (1984), "Application of chemical kinetics to deterioration of foods", *Journal of Chemical Education*, pp. 348, <10.1021/ed061p348>, de 1984.
- Laguerre, M., J. Lecomte y P. Villeneuve (2007), "Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges", *Progress in Lipid Research*, pp. 244-282, <10.1016/j.plipres.2007.05.002>, septiembre de 2007.
- Langevin, Dominique (2019), "Coalescence in foams and emulsions: Similarities and differences", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Memorial Volume, pp. 23-31, <10.1016/j.cocis.2019.09.001>.

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029419300391>>, consultado el 1 de diciembre de 2019.

Larrosa, Virginia Judit, Alicia Califano y Noemí Zaritzky (2014), "Efectos de los hidrocoloides en las características fisicoquímicas y reológicas de pastas libres de gluten aptas para individuos celíacos", Universidad Nacional de La Plata.

Lebwohl, Benjamin y Alberto Rubio-Tapia (2021), "Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease", *Gastroenterology*, pp. 63-75, <10.1053/j.gastro.2020.06.098>, enero de 2021.

Lee, Suyong, Sanghoon Kim y George E. Inglett (2005), "Effect of Shortening Replacement with Oatrim on the Physical and Rheological Properties of Cakes", *Cereal Chemistry Journal*, pp. 120-124, <10.1094/CC-82-0120>, marzo de 2005.

Lehninger, Albert L., David L. (David Lee) Nelson y Michael M. Cox (2005), *Lehninger principios de bioquímica*, Principios de bioquímica, , Barcelona, Omega.

Lezcano, E. (2011a), "Productos panificados", *Alimentos Argentinos*, <<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>>, de 2011.

Lezcano, E. (2011b), "Sabores para el Festejo, productos batidos y bebidas espumantes", *Alimentos Argentinos*, <<http://www.ciap.org.ar/Sitio/Archivos/Alimentos%20Argentinos%20N%2052.pdf>>, de 2011.

Liu, Edwin, Fran Dong, Anna E. Barón, Iman Taki, Jill M. Norris, Brigitte I. Frohnert, Edward J. Hoffenberg y Marian Rewers (2017), "High Incidence of Celiac Disease in a Long-term Study of Adolescents With Susceptibility Genotypes", *Gastroenterology*, pp. 1329-1336.e1, <10.1053/j.gastro.2017.02.002>, mayo de 2017.

de Lorgeril, Michel y Patricia Salen (2014), "Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved?", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, pp. 577-581, <10.3109/09637486.2014.886185>, agosto de 2014.

Lundin, Knut E. A. y Cisca Wijmenga (2015), "Coeliac disease and autoimmune disease—genetic overlap and screening", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, pp. 507-515, <10.1038/nrgastro.2015.136>, septiembre de 2015.

- Majzoobi, Mahsa, Zahra Vosooghi Poor, Jalal Jamalian y Asgar Farahnaky (2016), "Improvement of the quality of gluten-free sponge cake using different levels and particle sizes of carrot pomace powder", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 1369-1377, <10.1111/ijfs.13104>, junio de 2016.
- Mäkinen, Outi E., Emanuele Zannini y Elke K. Arendt (2013a), "Germination of Oat and Quinoa and Evaluation of the Malts as Gluten Free Baking Ingredients", *Plant Foods for Human Nutrition*, pp. 90-95, <10.1007/s11130-013-0335-3>, <<https://doi.org/10.1007/s11130-013-0335-3>>, consultado el 1 de marzo de 2013.
- Mäkinen, Outi E., Emanuele Zannini y Elke K. Arendt (2013b), "Germination of Oat and Quinoa and Evaluation of the Malts as Gluten Free Baking Ingredients", *Plant Foods for Human Nutrition*, pp. 90-95, <10.1007/s11130-013-0335-3>, marzo de 2013.
- Mao, Xiaoying y Yufei Hua (2012), "Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.)", *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 1561-1581, <10.3390/ijms13021561>, de 2012.
- Mariotti, François, Daniel Tomé y Philippe Patureau Mirand (2008), "Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 177-184, <10.1080/10408390701279749>, consultado el 31 de enero de 2008.
- Mariscal-Moreno, Rosa María, Juan de Dios Figueroa-Cárdenas, David Santiago-Ramos y Patricia Rayas-Duarte (2019), "Amylose lipid complexes formation as an alternative to reduce amylopectin retrogradation and staling of stored tortillas", *International Journal of Food Science & Technology*, Wiley Online Library, pp. 1651-1657, de 2019.
- Marshall, Wayne E. y James I. Wadsworth (eds.) (1994), *Rice science and technology*, Food science and technology, núm. 59, New York, Marcel Dekker.
- Martínez, Marcela (2014), "Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L.): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa", Universidad Nacional de Córdoba.
- Martínez, Marcela L., Diana O. Labuckas, Alicia L. Lamarque y Damián M. Maestri (2010), "Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. n/a-n/a, <10.1002/jsfa.4059>, consultado el 28 de junio de 2010.

- Martínez, Marcela L. y Damián M. Maestri (2008), "Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina", *European Journal of Lipid Science and Technology*, pp. 1183-1189, <10.1002/ejlt.200800121>, diciembre de 2008.
- Martínez, Marcela L., Miguel A. Mattea y Damián M. Maestri (2006), "Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 791-796, <10.1007/s11746-006-5016-z>, septiembre de 2006.
- Martinez, Mario M. y Manuel Gomez (2019), "Current Trends in the Realm of Baking: When Indulgent Consumers Demand Healthy Sustainable Foods", *Foods*, pp. 518, <10.3390/foods8100518>, consultado el 21 de octubre de 2019.
- Martins, Z. E., O. Pinho y I. M. P. L. V. O. Ferreira (2017), "Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 106-128, <10.1016/j.tifs.2017.07.003>, consultado el 1 de septiembre de 2017.
- Matos, María E., Teresa Sanz y Cristina M. Rosell (2014), "Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins", *Food Hydrocolloids*, pp. 150-158, <10.1016/j.foodhyd.2013.05.007>, marzo de 2014.
- Mazalli, Mônica Roberta y Neura Bragagnolo (2007), "Effect of Storage on Cholesterol Oxide Formation and Fatty Acid Alterations in Egg Powder", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, American Chemical Society, pp. 2743-2748, <10.1021/jf063267b>, consultado el 1 de abril de 2007.
- McAllister, Brian P., Emmanuelle Williams y Kofi Clarke (2019), "A Comprehensive Review of Celiac Disease/Gluten-Sensitive Enteropathies", *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, pp. 226-243, <10.1007/s12016-018-8691-2>, octubre de 2019.
- McClements, D. Julian (2001), "Emulsion Droplet Size Determination", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, <10.1002/0471142913.fad0303s00>, <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.fad0303s00>>, abril de 2001.
- McClements, David Julian (2015), "Emulsion Stability", *Food Emulsions*, CRC Press.

- McClements, David Julian (ed.) (2007), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods*, Woodhead Publishing in food science, technology and nutrition, , Boca Raton, CRC Press.
- Metrohm AG (2009), "Manual 743 Rancimat", Switzerland.
- Mezaize, S., S. Chevallier, A. Le-Bail y M. de Lamballerie (2010), "Gluten-free frozen dough: Influence of freezing on dough rheological properties and bread quality", *Food Research International*, pp. 2186-2192, <10.1016/j.foodres.2010.07.030>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910002607>>, consultado el 1 de octubre de 2010.
- Miraliakbari, Homan y Fereidoon Shahidi (2008), "Oxidative Stability of Tree Nut Oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 4751-4759, <10.1021/jf8000982>, consultado el 1 de junio de 2008.
- Mizrahi, S. (2004), *Accelerated shelf-life tests*, ed. R Steele, CRC, enero.
- Mora, Mabel (2012), "Prevalencia de enfermedad celíaca: estudio multicéntrico en población pediátrica de cinco distritos urbanos de la Argentina", *Archivos Argentinos de Pediatría*, pp. 490-496, <10.5546/aap.2012.490>, consultado el 1 de diciembre de 2012.
- Mora, Yesica N., Juan C. Contreras, Cristóbal N. Aguilar, Paola Meléndez, Ileana De la Garza y Raúl Rodríguez (2013), "Chemical Composition and Functional Properties from Different Sources of Dietary Fiber", *American Journal of Food and Nutrition*, Science and Education Publishing, pp. 27-33, <10.12691/ajfn-1-3-2>, consultado el 16 de noviembre de 2013.
- Moreira, R., F. Chenlo y S. Arufe (2015), "Starch transitions of different gluten free flour doughs determined by dynamic thermal mechanical analysis and differential scanning calorimetry", *Carbohydrate Polymers*, pp. 160-167, <10.1016/j.carbpol.2015.03.062>, agosto de 2015.
- Morris, Claudia R., Jill Hamilton-Reeves, Robert G. Martindale, Menaka Sarav y Juan B. Ochoa Gautier (2017), "Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine", *Nutrition in Clinical Practice*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 30S-47S, <10.1177/0884533617691250>, abril de 2017.
- Morrison, W. R., T. P. Milligan y M. N. Azudin (1984), "A relationship between the amylose and lipid contents of starches from diploid cereals", *Journal of Cereal Science*, pp. 257-271, <10.1016/S0733-5210(84)80014-4>, enero de 1984.

- Mossoba, Magdi M., Hormoz Azizian, Cynthia Tyburczy, John K. G. Kramer, Pierluigi Delmonte, Ali-Reza Fardin Kia y Jeanne I. Rader (2013), "Rapid FT-NIR Analysis of Edible Oils for Total SFA, MUFA, PUFA, and Trans FA with Comparison to GC", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 757-770, <10.1007/s11746-013-2234-z>, junio de 2013.
- do Nascimento, Amanda Bagolin, Giovanna Medeiros Rataichesk Fiates, Adilson dos Anjos y Evanilda Teixeira (2013), "Analysis of ingredient lists of commercially available gluten-free and gluten-containing food products using the text mining technique", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, pp. 217-222, <10.3109/09637486.2012.718744>, marzo de 2013.
- Negueruela, Angel I. (2012), "Is it the color measured in food the color that we see?", *Color in food: technological and psychophysical aspects*, eds. José Luis Caivano y María del Pilar Buera, Boca Raton (Fla.), CRC press, pp. 81-90.
- Niamh, M. (2016), "¿Cuáles son los aceites especiales de moda en Europa?", *A&G 103 Tomo XXVI*, pp. 182-183, de 2016.
- Nicholson, R. A. y A. G. Marangoni (2019), "Chapter 5. Food Structure Development in Oil and Fat Systems", *Food Chemistry, Function and Analysis*, eds. Fotis Spyropoulos, Aris Lazidis, y Ian Norton, Cambridge, Royal Society of Chemistry, pp. 115-133.
- Öhgren, Camilla, Patricia Lopez-Sanchez y Niklas Lorén (2019), "Chapter 12. Food Structure Analysis Using Light and Confocal Microscopy", *Food Chemistry, Function and Analysis*, eds. Fotis Spyropoulos, Aris Lazidis, y Ian Norton, Cambridge, Royal Society of Chemistry, pp. 285-308.
- Okada, H., C. Kuhn, H. Feillet y J. F. Bach (2010), "The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update", *Clinical and Experimental Immunology*, pp. 1-9, <10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x>, consultado el 11 de marzo de 2010.
- Okumus, Bahar Nur, Zeynep Tacer-Caba, Kevser Kahraman y Dilara Nilufer-Erdil (2018), "Resistant starch type V formation in brown lentil (*Lens culinaris* Medikus) starch with different lipids/fatty acids", *Food Chemistry*, pp. 550-558, <10.1016/j.foodchem.2017.07.157>, febrero de 2018.
- Onyango, Calvin, Christopher Mutungi, Günter Unbehend y Meinolf G. Lindhauer (2010), "Batter rheology and bread texture of sorghum-based gluten-free formulations modified with native or pregelatinised cassava starch and α -amylase: α -Amylase in sorghum batter and bread", *International Journal of*

- Food Science & Technology*, pp. 1228-1235, <10.1111/j.1365-2621.2010.02265.x>, junio de 2010.
- O'Shea, Norah, Linda Doran, Mark Auty, Elke Arendt y Eimear Gallagher (2013), "The rheology, microstructure and sensory characteristics of a gluten-free bread formulation enhanced with orange pomace", *Food & Function*, pp. 1856-1863, <10.1039/C3FO60294J>, <<http://dx.doi.org/10.1039/C3FO60294J>>, de 2013.
- Osorio, Fernando A. y James F. Steffe (1987), "BACK EXTRUSION OF POWER LAW FLUIDS", *Journal of Texture Studies*, pp. 43-63, <10.1111/j.1745-4603.1987.tb00569.x>, marzo de 1987.
- Ozkoc, Semin Ozge y Nadide Seyhun (2015), "Effect of Gum Type and Flaxseed Concentration on Quality of Gluten-Free Breads Made from Frozen Dough Baked in Infrared-Microwave Combination Oven", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 2500-2506, <10.1007/s11947-015-1615-8>, <<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1615-8>>, consultado el 1 de diciembre de 2015.
- Ozturk, Oguz Kaan y Pawan Singh Takhar (2017), "Stress relaxation behavior of oat flakes", *Journal of Cereal Science*, pp. 84-89, <10.1016/j.jcs.2017.08.005>, septiembre de 2017.
- Paciulli, Maria, Massimiliano Rinaldi, Antonella Cavazza, Tommaso Ganino, Margherita Rodolfi, Benedetta Chiancone y Emma Chiavaro (2018), "Effect of chestnut flour supplementation on physico-chemical properties and oxidative stability of gluten-free biscuits during storage", *LWT*, pp. 451-457, <10.1016/j.lwt.2018.09.002>, diciembre de 2018.
- Paciulli, Maria, Massimiliano Rinaldi, Martina Cirlini, Francesca Scazzina y Emma Chiavaro (2016), "Chestnut flour addition in commercial gluten-free bread: A shelf-life study", *LWT*, pp. 88-95, <10.1016/j.lwt.2016.02.034>, julio de 2016.
- Park, P. W. y R. E. Goins (1994), "In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods", de 1994.
- Parker, Roger y Stephen G. Ring (2000), "Macromolecular Aspects of Bread Staling", *Bread Staling*, eds. Pavinee Chinachoti y Yael Vodovotz, CRC Press, pp. 70-83.
- Parra, Patricia A. (2008), "Nuez de nogal en Argentina. Desempeño 2000-2007 y perspectivas.", Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos.

- Perez, C. M. y Bienvenido Juliano (1988), "Varietal differences in quality characteristics of rice layer cakes and fermented cakes", *Cereal Chemistry*, pp. 40-43, consultado el 1 de enero de 1988.
- Pérez, Oscar E., Victoria Wargon y Ana M.R. Pilosof (2006), "Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures", *Food Hydrocolloids*, pp. 966-974, <10.1016/j.foodhyd.2005.11.005>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X05002225>>, consultado el 1 de octubre de 2006.
- Pérez, Serge y Eric Bertoft (2010), "The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review", *Starch - Stärke*, pp. 389-420, <10.1002/star.201000013>, consultado el 5 de julio de 2010.
- Perez-Rea, Daysi y Raquel Antezana-Gomez (2018), "The Functionality of Pseudocereal Starches", *Starch in Food*, Elsevier, pp. 509-542.
- Pignitter, M. y V. Somoza (2012), "Critical evaluation of methods for the measurement of oxidative rancidity in vegetable oils", *Journal of Food and Drug Analysis*, <10.38212/2224-6614.2024>, <<https://www.jfda-online.com/journal/vol20/iss4/6>>, de 2012.
- Prakaywatchara, Petcharat, Chatchai Wattanapiroj y Doungjai Thirathumthavorn (2018), "Effects of Emulsifier Types and Levels in Combination With Glycerol on the Gelatinization and Retrogradation Properties of Gluten-Free Rice-Based Wonton Wraps", *Starch - Stärke*, pp. 1700227, <10.1002/star.201700227>, mayo de 2018.
- Proteintech (sin fecha), "IF imaging: Widefield versus confocal microscopy".
- Purhagen, Jeanette K., Malin E. Sjö y Ann-Charlotte Eliasson (2012), "The anti-staling effect of pre-gelatinized flour and emulsifier in gluten-free bread", *European Food Research and Technology*, pp. 265-276, <10.1007/s00217-012-1753-4>, agosto de 2012.
- Purlis, Emmanuel (2010), "Browning development in bakery products – A review", *Journal of Food Engineering*, pp. 239-249, <10.1016/j.jfoodeng.2010.03.008>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410001172>>, consultado el 1 de agosto de 2010.

- Putseys, J. A., L. Lamberts y J. A. Delcour (2010), "Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties", *Journal of Cereal Science*, pp. 238-247, <10.1016/j.jcs.2010.01.011>, mayo de 2010.
- Pycia, Ireneusz Kapusta, y Jaworska (2019), "Impact of the Degree of Maturity of Walnuts (*Juglans regia* L.) and Their Variety on the Antioxidant Potential and the Content of Tocopherols and Polyphenols", *Molecules*, pp. 2936-2936, <10.3390/molecules24162936>, agosto de 2019.
- Rabadán, Adrián, José E. Pardo, Arturo Pardo-Giménez y Manuel Álvarez-Ortí (2018), "Effect of genotype and crop year on the nutritional value of walnut virgin oil and defatted flour", *Science of The Total Environment*, pp. 1092-1099, <10.1016/j.scitotenv.2018.04.090>, consultado el 1 de septiembre de 2018.
- Rabadán, Adrián, José E. Pardo, Ricardo Gómez y Manuel Álvarez-Ortí (2018a), "Evaluation of physical parameters of walnut and walnut products obtained by cold pressing", *LWT*, pp. 308-314, <10.1016/j.lwt.2018.01.061>, consultado el 1 de mayo de 2018.
- Rabadán, Adrián, José E. Pardo, Ricardo Gómez y Manuel Álvarez-Ortí (2018b), "Evaluation of physical parameters of walnut and walnut products obtained by cold pressing", *LWT*, pp. 308-314, <10.1016/j.lwt.2018.01.061>, consultado el 1 de mayo de 2018.
- Ragaee, Sanaa, El-Sayed M. Abdel-Aal y Maher Noaman (2006), "Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use", *Food Chemistry*, pp. 32-38, <10.1016/j.foodchem.2005.04.039>, consultado el 1 de enero de 2006.
- Rajiv, Jyotsna, Dasappa Indrani, Pichan Prabhasankar y G. Venkateswara Rao (2012), "Rheology, fatty acid profile and storage characteristics of cookies as influenced by flax seed (*Linum usitatissimum*)", *Journal of Food Science and Technology*, pp. 587-593, <10.1007/s13197-011-0307-2>, octubre de 2012.
- Rathnayake, H. A., S. B. Navaratne y C. M. Navaratne (2018), "Porous Crumb Structure of Leavened Baked Products", *International Journal of Food Science*, pp. 1-15, <10.1155/2018/8187318>, consultado el 5 de agosto de 2018.
- Reilly, Norelle Rizkalla, Kathleen Aguilar, Benjamin G. Hassid, Jianfeng Cheng, Amy R. DeFelice, Philip Kazlow, Govind Bhagat y Peter H. Green (2011), "Celiac Disease in Normal-weight and Overweight Children: Clinical Features and Growth Outcomes Following a Gluten-free Diet", *Journal of Pediatric*

Gastroenterology & Nutrition, pp. 528-531, <10.1097/MPG.0b013e3182276d5e>, noviembre de 2011.

Reynhout, Greg (1991), "The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 983-984, <10.1007/BF02657549>, diciembre de 1991.

Rocha Parra, Andrés F., Pablo D. Ribotta y Cristina Ferrero (2015), "Apple pomace in gluten-free formulations: effect on rheology and product quality", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 682-690, <10.1111/ijfs.12662>, marzo de 2015.

Rodriguez, Nadia y Henrique Kajiyama (2020), «Tamaño de Partículas por Difracción Laser».

Rodríguez-García, Julia, Ana Puig, Ana Salvador y Isabel Hernando (2012), "Optimization of a Sponge Cake Formulation with Inulin as Fat Replacer: Structure, Physicochemical, and Sensory Properties", *Journal of Food Science*, pp. C189-C197, <10.1111/j.1750-3841.2011.02546.x>, febrero de 2012.

Rojano, Benjamin Alberto (1997), "Oxidación de lípidos y antioxidantes", Medellín, Universidad Nacional de Colombia.

Rolland-Sabaté, Agnès, Teresa Sanchez, Alain Buléon, Paul Colonna, Hernan Ceballos, Shan-Shan Zhao, Peng Zhang y Dominique Dufour (2013), "Molecular and supra-molecular structure of waxy starches developed from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *Carbohydrate Polymers*, pp. 1451-1462, <10.1016/j.carbpol.2012.10.048>, febrero de 2013.

Roman, Laura, Montserrat P. Reguilon, Mario M. Martinez y Manuel Gomez (2020), "The effects of starch cross-linking, stabilization and pre-gelatinization at reducing gluten-free bread staling", *LWT*, pp. 109908, <10.1016/j.lwt.2020.109908>, octubre de 2020.

Roman, Laura, Mayara Belorio y Manuel Gomez (2019), "Gluten-Free Breads: The Gap Between Research and Commercial Reality", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 690-702, <10.1111/1541-4337.12437>, mayo de 2019.

Roncero, J. M., M. Álvarez-Ortí, A. Pardo-Giménez, R. Gómez, A. Rabadán y J. E. Pardo (2016), "Virgin almond oil: Extraction methods and composition", *Grasas y Aceites*, pp. e143, <10.3989/gya.0993152>, consultado el 30 de septiembre de 2016.

- Ronda, Felicidad, Bonastre Oliete, Manuel Gómez, Pedro A. Caballero y Valentín Pando (2011), "Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources", *Journal of Food Engineering*, pp. 272-277, <10.1016/j.jfoodeng.2010.09.001>, febrero de 2011.
- Ronda, Felicidad y Yrjö H. Roos (2011), "Staling of fresh and frozen gluten-free bread", *Journal of Cereal Science*, pp. 340-346, <10.1016/j.jcs.2011.02.004>, mayo de 2011.
- Ronda, Felicidad y Yrjö H. Roos (2008), "Gelatinization and freeze-concentration effects on recrystallization in corn and potato starch gels", *Carbohydrate Research*, pp. 903-911, <10.1016/j.carres.2008.01.026>, consultado el 7 de abril de 2008.
- Roos, Y. H. (2012), "Molecular mobility in dough and bread quality", *Breadmaking*, Elsevier, pp. 430-446.
- Roos, Yrjö H. (1995), *Phase Transitions in Foods*, Elsevier.
- Roos, YRJÖ y MARCUS Karel (1991), "Water and Molecular Weight Effects on Glass Transitions in Amorphous Carbohydrates and Carbohydrate Solutions", *Journal of Food Science*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1676-1681, <10.1111/j.1365-2621.1991.tb08669.x>, consultado el 1 de noviembre de 1991.
- Rosell, Cristina M. y Allen Foegeding (2007), "Interaction of hydroxypropylmethylcellulose with gluten proteins: Small deformation properties during thermal treatment", *Food Hydrocolloids*, pp. 1092-1100, <10.1016/j.foodhyd.2006.08.003>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X0600169X>>, consultado el 1 de octubre de 2007.
- Roudaut, G., D. Simatos, D. Champion, E. Contreras-Lopez y M. Le Meste (2004), "Molecular mobility around the glass transition temperature: a mini review", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, pp. 127-134, <10.1016/j.ifset.2003.12.003>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856404000049>>, consultado el 1 de junio de 2004.
- Roussel, Philippe, Hubert Chiron y Gérard Paillard (2002), *Les pains français: evolution, qualité, production*, Science et technologie des métiers de bouche, Vesoul, Maé-Erti.
- Rybicka, Iga y Anna Gliszczyńska-Świągło (2017), "Minerals in grain gluten-free products. The content of calcium, potassium, magnesium, sodium, copper,

- iron, manganese, and zinc", *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 61-67, <10.1016/j.jfca.2017.02.006>, consultado el 1 de junio de 2017.
- Sabanis, D., D. Lebesi y C. Tzia (2009), "Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 1380-1389, <10.1016/j.lwt.2009.03.010>, octubre de 2009.
- Sabanis, Dimitrios, Constantina Tzia y Spyridon Papadakis (2008), "Effect of Different Raisin Juice Preparations on Selected Properties of Gluten-Free Bread", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 374-383, <10.1007/s11947-007-0027-9>, diciembre de 2008.
- Sacchi, Raffaele y Livio Paolillo (2007), "NMR for Food Quality and Traceability", *Advances in Food Diagnostics*, eds. Leo M. L. Nollet y Fidel Toldr, Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing, pp. 101-117.
- Sahi, Sarabjit S. y Juan M. Alava (2003), "Functionality of emulsifiers in sponge cake production", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 1419-1429, <10.1002/jsfa.1557>, noviembre de 2003.
- Salcedo, Cecilia L., Beatriz A. López de Mishima y Mónica A. Nazareno (2010), "Walnuts and almonds as model systems of foods constituted by oxidisable, pro-oxidant and antioxidant factors", *Food Research International*, pp. 1187-1197, <10.1016/j.foodres.2010.02.016>, consultado el 1 de mayo de 2010.
- Sandoval Aldana, Angélica, Eduardo Rodríguez-Sandoval y Alejandro Fernández Quintero (2005), "Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón", *Dyna*, pp. 45-53, consultado el 1 de enero de 2005.
- Sansano, M., A. Heredia, V. Glicerina, F. Balestra, S. Romani y A. Andrés (2018), "Influence of chitosan on thermal, microstructural and rheological properties of rice and wheat flours-based batters", *LWT*, pp. 529-536, <10.1016/j.lwt.2017.09.036>, enero de 2018.
- Santana-Porbén, S. (2008), "El huevo como aliado de la nutrición y la salud.", *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, <<http://www.revalnutricion.sld.cu/index.php/rcan/article/view/919>>, de 2008.
- Santos, Joana, Manuel Álvarez-Ortí, Estela Sena-Moreno, Adrián Rabadán, José E. Pardo y M. Beatriz PP Oliveira (2018), "Effect of roasting conditions on the composition and antioxidant properties of defatted walnut flour", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 1813-1820, <10.1002/jsfa.8657>, consultado el 1 de marzo de 2018.

- Sayar, R. (2014), "Huevo: miradas nuevas sobre un viejo conocido", *Alimentos Argentinos*, pp. 52, de 2014.
- Schaich, K. M. (2005), "Lipid Oxidation: Theoretical Aspects", *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, ed. Fereidoon Shahidi, Wiley.
- Schieber, A., F. C. Stintzing y R. Carle (2001), "By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 401-413, <[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)>, de 2001.
- Schober, Tilman J., Scott R. Bean y Daniel L. Boyle (2007), "Gluten-Free Sorghum Bread Improved by Sourdough Fermentation: Biochemical, Rheological, and Microstructural Background", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 5137-5146, <10.1021/jf0704155>, junio de 2007.
- Sciarini, L. S., Pablo D. Ribotta, Alberto E. León y Gabriela T. Pérez (2010), "Influence of Gluten-free Flours and their Mixtures on Batter Properties and Bread Quality", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 577-585, <10.1007/s11947-008-0098-2>, agosto de 2010.
- Sciarini, Lorena Susana, Gabriela Teresa Pérez, Marie de Lamballerie, Alberto Edel León y Pablo Daniel Ribotta (2012), "Partial-Baking Process on Gluten-Free Bread: Impact of Hydrocolloid Addition", *Food and Bioprocess Technology*, pp. 1724-1732, <10.1007/s11947-011-0529-3>, julio de 2012.
- Sciarini, Lorena Susana (2011), "Estudio del efecto de diferentes aditivos sobre la calidad y la conservación de panes libres de gluten", Universidad Nacional de La Plata.
- Serrano, Martina, Lorena Susana Sciarini y Gabriela T. Pérez (2016), "Estudio de la cinética de retrogradación del almidón y del endurecimiento de la miga de panes libres de gluten", Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.
- Shevkani, Khetan y Narpinder Singh (2014), "Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins", *International Journal of Food Science & Technology*, pp. 2237-2244, <10.1111/ijfs.12537>, octubre de 2014.
- Shewry, Peter R., Yves Popineau, Domenico Lafandra y Peter Belton (2000), "Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 433-441, <10.1016/S0924-2244(01)00035-8>, diciembre de 2000.

- Silano, Marco, Olimpia Vincentini y Massimo De Vincenzi (2009), "Toxic, Immunostimulatory and Antagonist Gluten Peptides in Celiac Disease", *Current Medicinal Chemistry*, pp. 1489-1498, <10.2174/092986709787909613>, consultado el 1 de abril de 2009.
- Singh, Narpinder, Jaspreet Singh, Lovedeep Kaur, Navdeep Singh Sodhi y Balmeet Singh Gill (2003), "Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources", *Food Chemistry*, pp. 219-231, <10.1016/S0308-8146(02)00416-8>, mayo de 2003.
- Singh, Prashant, Ananya Arora, Tor A. Strand, Daniel A. Leffler, Carlo Catassi, Peter H. Green, Ciaran P. Kelly, Vineet Ahuja y Govind K. Makharria (2018), "Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, pp. 823- 836.e2, <10.1016/j.cgh.2017.06.037>, junio de 2018.
- Slatnar, Ana, Maja Mikulic-Petkovsek, Franci Stampar, Robert Veberic y Anita Solar (2015), "Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.)", *Food Research International*, pp. 255-263, <10.1016/j.foodres.2014.11.016>, consultado el 1 de enero de 2015.
- Šmídová, Zuzana y Jana Rysová (2022), "Gluten-Free Bread and Bakery Products Technology", *Foods*, pp. 480, <10.3390/foods11030480>, consultado el 7 de febrero de 2022.
- Smith, Paul R. y Jenny Johansson (2005), "Influences of the proportion of solid fat in a shortening on loaf volume and staling of bread: solid fat in shortenings of bread", *Journal of Food Processing and Preservation*, pp. 359-367, <10.1111/j.1745-4549.2004.23079.x>, consultado el 21 de enero de 2005.
- Stanner, Sa, J. Hughes, Cnm Kelly y J. Buttriss (2004), "A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'", *Public Health Nutrition*, pp. 407-422, <10.1079/PHN2003543>, mayo de 2004.
- Steff (2016), "Diagrama de una columna de microscopio electrónico de barrido óptico", *Commons File:Schema MEB.svg*.
- Steffe, James Freeman (1996), *Rheological methods in food process engineering*, Freeman press.
- Stinco, Carla, Rocio Fernández-Vazquez, Antonio Meléndez-Martínez, Francisco Heredia, Emilia Bejines Mejías y Isabel Vicario (2012), "Influence of Different Backgrounds on the Instrumental Color Specification of Orange

- Juices", *Color in food: technological and psychophysical aspects*, Boca Raton (Fla.), CRC press, pp. 143-150.
- Stokes, Debbie y Royal Microscopical Society (2008), *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*, Chichester, U.K., Wiley.
- STTI. (2011), "Fundamentos de la microscopía confocal espectral", Servicio Técnico de Investigación-Universidad de Alicante.
- Sumnu, Servet Gulum y Serpil Sahin (2008), *Food Engineering Aspects of Baking Sweet Goods*, CRC Press, marzo.
- Tadros, T. F., S. Léonard, C. Verboom, V. Wortel, M. C. Taelman y F. Roschttardt (2010), "Personal Care Emulsions Based on Surfactant-Biopolymer Mixtures: Correlation of Rheological Parameters with Sensory Attributes", *Colloids and Interface Science Series*, pp. 107-126.
- Tapia, María Isabel, Juan Ramón Sánchez-Morgado, Jesús García-Parra, Rosario Ramírez, Teresa Hernández y David González-Gómez (2013), "Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars", *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 232-237, <10.1016/j.jfca.2013.06.004>, septiembre de 2013.
- Tebben, Lauren, Yanting Shen y Yonghui Li (2018), "Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 10-24, <10.1016/j.tifs.2018.08.015>, noviembre de 2018.
- Theiler, James (1990), "Estimating fractal dimension", *Journal of the Optical Society of America A*, pp. 1055, <10.1364/JOSAA.7.001055>, consultado el 1 de junio de 1990.
- Thompson, Tricia (2000), "Folate, Iron, and Dietary Fiber Contents of the Gluten-free Diet", *Journal of the American Dietetic Association*, pp. 1389-1396, <10.1016/S0002-8223(00)00386-2>, noviembre de 2000.
- Tiefenbacher, Karl F. (2017), "Technology of Main Ingredients—Sweeteners and Lipids", *Wafer and Waffle*, Elsevier, pp. 123-225.
- Toth, Marcell, Gyula Vatai y Andras Koris (2020), "Consumers Acceptance, Satisfaction in Consuming Gluten-free Bread: A Market Survey Approach", *International Journal of Celiac Disease*, Science and Education Publishing, pp. 44-49, <10.12691/ijcd-8-2-1>, consultado el 2 de julio de 2020.

- Turabi, Elif, Gulum Sumnu y Serpil Sahin (2010), "Quantitative analysis of macro and micro-structure of gluten-free rice cakes containing different types of gums baked in different ovens", *Food Hydrocolloids*, pp. 755-762, <10.1016/j.foodhyd.2010.04.001>, noviembre de 2010.
- Tye-Din, Jason A., Heather J. Galipeau y Daniel Agardh (2018), "Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies", *Frontiers in Pediatrics*, pp. 350, <10.3389/fped.2018.00350>, consultado el 21 de noviembre de 2018.
- U. S. EPA. (2014), "Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry", Washington, DC.
- Van Nieuwenhove, Carina P., Rubén Oliszewski y Silvia N. González (2009), "Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of cow and goat cheeses from northwest Argentina", *Journal of Food Quality*, pp. 303-314, <10.1111/j.1745-4557.2009.00258.x>, junio de 2009.
- Vanhanen, L. P. y G. P. Savage (2006), "The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging", *Food Chemistry*, pp. 64-69, <10.1016/j.foodchem.2005.07.020>, enero de 2006.
- Vázquez Ovando, Alfredo, Gabriel Rosado-Rubio, Luis Chel-Guerrero y David Betancur-Ancona (2009), "Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.)", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 168-173, consultado el 1 de enero de 2009.
- Vázquez-Ovando, Alfredo, Rosado-Rubio Gabriel, Chel-Guerrero Luis y Betancur-Ancona Davi (2009), "Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.)", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 168-173, <10.1016/j.lwt.2008.05.012>, consultado el 1 de enero de 2009.
- Verdu, Elena F., Heather J. Galipeau y Bana Jabri (2015), "Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, pp. 497-506, <10.1038/nrgastro.2015.90>, septiembre de 2015.
- Vilaplana, Montse (2007), "Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos", *Ambito Farmaceutico (Nutrición)*, pp. 79-86, de 2007.
- Vivas, Santiago, Jose M. Ruiz de Morales, Marisa Fernandez, Mercedes Hernando, Blanca Herrero, Javier Casqueiro y Santiago Gutierrez (2008), "Age-Related Clinical, Serological, and Histopathological Features of Celiac Disease", *The*

- American Journal of Gastroenterology*, pp. 2360-2365, <10.1111/j.1572-0241.2008.01977.x>, septiembre de 2008.
- Volta, Umberto, Giacomo Caio, Vincenzo Stanghellini y Roberto De Giorgio (2014), "The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center", *BMC Gastroenterology*, pp. 194, <10.1186/s12876-014-0194-x>, diciembre de 2014.
- Volta, Umberto, Lucia De Franceschi, Federico Lari, Nicolino Molinaro, Marco Zoli y Francesco B. Bianchi (1998), "Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasaemia", *The Lancet*, pp. 26-29, <10.1016/S0140-6736(97)11222-3>, julio de 1998.
- Wang, Shujun, Caili Li, Les Copeland, Qing Niu y Shuo Wang (2015), "Starch Retrogradation: A Comprehensive Review: Starch retrogradation...", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 568-585, <10.1111/1541-4337.12143>, septiembre de 2015.
- Wang, Shujun, Jinrong Wang, Jinglin Yu y Shuo Wang (2014), "A comparative study of annealing of waxy, normal and high-amylose maize starches: The role of amylose molecules", *Food Chemistry*, pp. 332-338, <10.1016/j.foodchem.2014.05.055>, diciembre de 2014.
- Wang, Shujun y Peng Guo (2020), "Botanical Sources of Starch", *Starch Structure, Functionality and Application in Foods*, ed. Shujun Wang, Singapore, Springer Singapore, pp. 9-27.
- Wang, Young y Weibiao Zhou (2017), "Chapter 3 - Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Bakery Products", *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, eds. Bhesh Bhandari y Yrjö H. Roos, Woodhead Publishing, pp. 63-87.
- Wee, May Sui Mei, Ai Ting Goh, Markus Stieger y Ciarán G. Forde (2018), "Correlation of instrumental texture properties from textural profile analysis (TPA) with eating behaviours and macronutrient composition for a wide range of solid foods", *Food & Function*, pp. 5301-5312, <10.1039/C8FO00791H>, de 2018.
- Whaley, Judith K., Catherine Templeton y Mohammad Anvari (2019), "Rheological Testing for Semisolid Foods: Traditional Rheometry", *Rheology of Semisolid Foods*, Food Engineering Series, ed. Helen S. Joyner, Cham, Springer International Publishing, pp. 63-96.
- WHO y FAO (2004), *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*.

- WHO/FAO (2007), *Protein and amino acid requirements in human nutrition*, World Health Organization.
- Willhoft, E. M. A. (1973), "Mechanism And Theory Of Staling Of Bread And Baked Goods, And Associated Changes In Textural Properties", *Journal of Texture Studies*, pp. 292-322, <10.1111/j.1745-4603.1973.tb00844.x>, octubre de 1973.
- Witczak, Mariusz, Rafał Ziobro, Lesław Juszczak y Jarosław Korus (2016), "Starch and starch derivatives in gluten-free systems – A review", *Journal of Cereal Science*, pp. 46-57, <10.1016/j.jcs.2015.07.007>, enero de 2016.
- Wolter, Anika, Anna-Sophie Hager, Emanuele Zannini, Michael Czerny y Elke K. Arendt (2014), "Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads", *International Journal of Food Microbiology*, pp. 83-91, <10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.015>, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513005369>>, consultado el 17 de febrero de 2014.
- Xu, Jingwen, Yiqin Zhang, Weiqun Wang y Yonghui Li (2020), "Advanced properties of gluten-free cookies, cakes, and crackers: A review", *Trends in Food Science & Technology*, pp. 200-213, <10.1016/j.tifs.2020.07.017>, septiembre de 2020.
- Yust, María, Justo Pedroche, Julio Girón-Calle, Javier Vioque, Francisco Millán y Manuel Alaiz (2004), "Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection", *Food Chemistry*, pp. 317-320, <10.1016/j.foodchem.2003.07.026>, consultado el 1 de abril de 2004.
- Zaanoun, I., S. Gharby, I. Bakass, E. Ait addi y I. Ait ichou (2014), "Kinetic parameter determination of roasted and unroasted argan oil oxidation under Rancimat test conditions", *Grasas y Aceites*, pp. e033, <10.3989/gya.122713>, consultado el 30 de septiembre de 2014.
- Zannini, Emanuele, Julie Miller Jones, Stefano Renzetti y Elke K. Arendt (2012), "Functional Replacements for Gluten", *Annual Review of Food Science and Technology*, pp. 227-245, <10.1146/annurev-food-022811-101203>, consultado el 10 de abril de 2012.
- Zeratsky, Katherine (2021), "¿Qué son los ácidos grasos monoinsaturados y debo incluirlos en mi dieta?", *Estilo de vida saludable Nutrición y comida saludable*.

Zhou, Meixue, Kevin Robards, Malcolm Glennie-Holmes y Stuart Helliwell (1998), "Structure and Pasting Properties of Oat Starch", *Cereal Chemistry Journal*, pp. 273-281, <10.1094/CCHEM.1998.75.3.273>, mayo de 1998.

Ziobro, Rafał, Teresa Witczak, Lesław Juszcak y Jarosław Korus (2013), "Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic", *Food Hydrocolloids*, pp. 213-220, <10.1016/j.foodhyd.2013.01.006>, agosto de 2013.