



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Diseño y desarrollo de productos cárnicos magros
adicionados con fuentes vegetales de elevado valor
nutricional***

Tesista: Natalia Soledad Argel

**Directora: Silvina Cecilia Andrés
Codirectora: Alicia Noemí Califano**

Año: 2022

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), UNLP- CIC-CONICET bajo la dirección de la Dra. Silvina Cecilia Andrés y la codirección de la Dra. Alicia Noemí Califano.



CIDCA

CONICET

LA PLATA

CIC Comisión de
Investigaciones
Científicas

PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se publicaron los siguientes artículos en Congresos:

- “Caracterización fisicoquímica y funcional de harinas vegetales”. Artículo completo en Libro del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CyTAL 2017. Mar del Plata, Argentina. **Argel N., Ranalli, N., Califano A., & Andrés S.**
- “Incorporación de harinas de legumbres en medallones de carne porcina”. Artículo completo en Libro del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CyTAL 2017. Mar del Plata, Argentina. **Argel N., Ranalli, N., Andrés S., & Califano, A.**
- “Caracterización fisicoquímica y funcional de harinas de legumbres”. Artículo breve en Libro de Resúmen VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICYTAC 2018. Córdoba, Argentina. **Argel N., Ranalli N., Califano A., & Andrés S.**
- “Propiedades fisicoquímicas y nutricionales de porotos del NOA”. Artículo completo en Libro del Congreso de Tecnología de Alimentos CyTAL-ALACCTA 2019. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **Argel N., Nagai, N. Fili, J., & Andrés S.**
- “Reemplazo parcial de carne de cerdo por harina de porotos Alubia en hamburguesas”. Artículo completo en Libro del Congreso de Tecnología de Alimentos CyTAL-ALACCTA 2019. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. **Argel N., Ranalli N., Califano A., & Andrés S.**

En revistas científicas internacionales:

- Influence of partial pork meat replacement by pulse flour on physicochemical and sensory characteristics of low-fat burgers. (2020). Journal of the Science of Food and Agriculture, 100 (10), 3932-3941. **Argel N., Ranalli N., Califano A., & Andrés S.**

- Physicochemical characterization and functional properties of flours from North-western Argentina bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. (2022). *Cereal Chemistry*, 1– 10. **Nagai, N. F., Argel, N. S., & Andrés, S. C.**

En otros medios de divulgación:

- Incorporación de harinas de legumbres en medallones de carne porcina. (2017). *La Industria Cárnica Latinoamericana*. ISSN: 0325-3414. 206; 36-40. **Argel N., Ranalli N., Andrés S., & Califano A.**

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la invaluable colaboración de muchas personas:

A mi Directora Silvina, que me dio la oportunidad de poder trabajar con ella. Gracias por el tiempo, la dedicación, por la paciencia. Por su cariño y por el apoyo brindado a lo largo de esta etapa.

A Alicia, por compartir su conocimiento y guía.

A la Universidad Nacional de La Plata por formarme. A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado y al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos por haberme brindado el espacio para la realización de este trabajo.

A mi gran grupo, por su aliento, solidaridad, compañerismo y generosidad. Por hacer las cosas más fáciles. A mis chicas, Noe, Lau y Nadia por tantas risas y por sobre todas las cosas, por su amistad. A Lucas por su predisposición y ayuda. A Gabi por su contribución en esta Tesis y por ser un gran referente para mí. Especialmente a Nati R, por las horas de mesada compartidas, por lo mates, por su amistad y cariño.

A mis compañeros de Box por las charlas y los mates durante todos estos años. Por las risas y el aliento.

A mis compañeros del CIDCA, por su amabilidad y buena disposición, que han hecho más ameno estos años de trabajo. Especialmente a Yuli, Flor, Matt, Clau, Eli y Andre.

Al personal técnico del Instituto, Fernanda Hamet y Yanina Musso, por su buena predisposición en todo momento.

A mis amigas de la vida, que son una fuente de aliento y cariño fundamental.

A mi familia, que fue cambiando y creciendo en el transcurso de esta etapa, por el amor y el apoyo de siempre.

Finalmente a mi amor, Carlos, mi compañero de vida, mi guía y sostén. Por no dejarme nunca bajar los brazos, por ser mi contención y mi consejero. Por su amor y paciencia.

Y para Allegra, la luz de mi vida.

Gracias a todos los que siempre confiaron en mí

RESUMEN

Diseño y desarrollo de productos cárnicos magros adicionados con fuentes vegetales de elevado valor nutricional

El rápido crecimiento de la población mundial asociado con el agotamiento de recursos hace necesario el incremento en la producción de alimentos fuente de proteínas para garantizar la seguridad alimentaria de manera que todos tengan acceso a una dieta equilibrada, pero además tomando medidas para mitigar el impacto ambiental ocasionado.

Asimismo, desde hace algunos años, la industria alimentaria se encuentra atravesando un cambio de paradigma con relación al desarrollo y producción de nuevos alimentos, debido al incremento de la conciencia social por el medio ambiente, el bienestar animal y la salud, principales motivaciones de una tendencia creciente hacia el cambio de dietas ricas en carne a otras con un mayor aporte de vegetales, con el consenso de los organismos mundiales sobre sus beneficios asociados.

Esto ha provocado la aparición de nuevos movimientos asociados al consumo de alimentos híbridos, aquellos que combinan carne e ingredientes vegetales. Este enfoque ofrece un producto final con los beneficios tanto de la carne como de la fuente vegetal adicionada. La sustitución parcial de carne a través de la mezcla con proteínas vegetales constituye en la actualidad una estrategia emergente utilizada para lograr productos con una menor proporción de carne pero respetando sus características. En este contexto las legumbres se presentan como una buena alternativa debido a sus atributos nutricionales, funcionales, los beneficios a la salud asociados a su consumo y a ser reconocidas como una opción sustentable.

Las legumbres son definidas como semillas comestibles, secas, limpias, sanas y separadas de las vainas de plantas leguminosas, siendo utilizadas en nutrición humana y animal. Algunas de las más consumidas incluyen a garbanzos (*Cicer arietinum*), lentejas (*Lens culinaris*), porotos (*Phaseolus vulgaris*) y arvejas (*Pisum sativum*). Son fuentes reconocidas de proteínas, almidón, fibra, vitaminas y minerales, y compuestos bioactivos. Todo esto está relacionado con numerosos estudios que evidencian la relación existente entre el consumo de legumbres y beneficios en la salud cardiovascular, control de peso, salud gastrointestinal y diabetes, entre otras.

En este contexto, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral fue desarrollar un alimento híbrido: hamburguesas de carne de cerdo magras con la incorporación de aceite de girasol alto oleico pre-emulsificado como fuente lipídica, y un reemplazo de entre un 10 y 44 % de carne de cerdo por harinas de legumbres y agua, destinados a brindar al consumidor un alimento con alto valor nutricional y adecuadas características de calidad.

Para eso, en el **Capítulo 1** se estudiaron las harinas de legumbres disponibles en el mercado. Se las caracterizó desde el punto de vista de la composición, sus propiedades físicas y funcionales. Para todas se encontraron buenas características nutricionales y funcionales, resultando potenciales ingredientes para el desarrollo del producto.

A partir de estos resultados y mediante pruebas preliminares de laboratorio e información bibliográfica, en el **Capítulo 2** se diseñaron formulaciones de hamburguesas de carne de cerdo incorporando harinas de legumbres en diferentes niveles y agua en diferentes proporciones. Partiendo de una formulación que incluía aceite de girasol alto oleico como fuente lipídica, de buen perfil de ácidos grasos, y sales en reducidas proporciones se elaboraron seis formulaciones en las que se variaron los niveles de harina (8 y 15 %) y las relaciones agua/harina adicionadas (1,25; 1,6 y 2 g/g). Se evaluaron sus principales atributos de calidad, incluyendo el sensorial, y se las comparó con diferentes tipos de controles. El reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas comerciales de legumbres, en dos niveles y en tres relaciones agua/harina permitió obtener productos con adecuadas características fisicoquímicas así como parámetros de textura y color que, en algunas combinaciones, resultaron similares a los controles utilizados, resultando en productos con propiedades tecnológicas satisfactorias. Debido a que los ensayos con todas las harinas presentaron resultados adecuados para las variables analizadas, se optó por seguir adelante con una de las harinas de manera de profundizar el estudio del sistema.

Dado que en Argentina el poroto representa cerca del 80 % del cultivo de legumbres, destacándose la región del NOA por el ser la principal zona de cultivo y por existir un continuo mejoramiento genético para mejorar sus características agronómicas, en el **Capítulo 3** se estudiaron las características fisicoquímicas y funcionales de dos variedades de poroto Alubia, denominadas Cerrillos y Paloma, provistas por INTA-Salta. Los resultados indicaron que las harinas provenientes de

ambas variedades de porotos resultaron similares en cuanto a su composición, caracterizándose por su alto contenido de fibra y proteínas, características fisicoquímicas, propiedades funcionales, térmicas, espectrales y microestructura. Por lo tanto, las harinas de porotos NOA agronómicamente mejorados presentaron un adecuado potencial como ingredientes funcionales en el desarrollo de hamburguesas híbridas.

Entonces, a fin de obtener una formulación óptima, en el **Capítulo 4** se utilizó la metodología de superficie de respuesta para hallar los niveles de cada variable (cantidad de harina y relación agua/harina) que optimizaran los principales parámetros de calidad (nivel de harina, rendimiento, parámetros de textura y color) a partir de los resultados obtenidos previamente para las hamburguesas elaboradas con harina de poroto comercial, empleando la función “deseabilidad”. Mediante elaboración de la formulación híbrida optimizada y la validación se comprobó que el procedimiento matemático elegido predijo adecuadamente los atributos de calidad estudiados. Se evaluó también el efecto de la incorporación de la harina de porotos sobre el comportamiento térmico y microestructura del sistema.

Por último, en el **Capítulo 5** se analizó el impacto de la incorporación de harina a la formulación cárnica a través de los cambios en la composición y valor calórico respecto a un producto sin agregado, así como sobre su estabilidad durante el almacenamiento congelado. Los productos cárnicos híbridos optimizados cocidos resultaron de similar aporte energético y de proteínas respecto al control, pero constituyendo una fuente de fibra dietética a la dieta. Asimismo, resultaron estables durante su almacenamiento congelado, presentando cambios menores en rendimiento, textura, color y oxidación lipídica.

Se pudo concluir que las harinas de legumbres comerciales y las de porotos NOA agronómicamente mejoradas demostraron gran potencial como ingredientes para el desarrollo de alimentos debido a sus propiedades funcionales y a su destacable composición en macro y micronutrientes. Asimismo, fue posible desarrollar hamburguesas híbridas con el agregado de las diferentes harinas de legumbres y niveles en reemplazo parcial de carne de cerdo, obteniendo una formulación que optimizó sus parámetros de calidad y permitió lograr adecuadas características tecnológicas, nutricionales y estabilidad en el producto cárnico.

Las nuevas tendencias plantean una oportunidad de posicionamiento para el mercado argentino de legumbres con innegable capacidad de responder a los nuevos escenarios. Mientras que los productos cárnicos híbridos se presentan como alternativas más sustentables y con una composición distintiva, que los posiciona como una de las principales tendencias en la industria alimentaria.

<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
<u>CAPÍTULO 1: Estudio de propiedades fisicoquímicas y funcionales de diferentes harinas de legumbres</u>	7
RESUMEN	8
1.1 INTRODUCCIÓN	9
1.1.1 Legumbres	9
1.1.2 Producción agrícola	11
1.1.3 Composición y propiedades	13
OBJETIVOS	20
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	20
1.3.1 Muestras analizadas	20
1.3.2 Caracterización física	20
1.3.2.1 Densidad aparente	20
1.3.2.2 Distribución de tamaños de partículas	20
1.3.2.3 Color	21
1.3.3 Caracterización química	22
1.3.3.1 Determinación del pH	22
1.3.3.2 Composición proximal	22
1.3.3.3 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante	24
1.3.3.3.1 Obtención de extractos	24
1.3.3.3.2 Determinación del contenido de polifenoles totales	24
1.3.3.3.3 Capacidad antioxidante	25
1.3.4 Propiedades funcionales	27
1.3.4.1 Capacidad de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite ...	27
1.3.4.2 Actividad emulsificante y estabilidad de emulsión	27
1.3.4.3 Concentración mínima de gelificación	28
1.3.4.4 Propiedades de pasting	28
1.3.5 Análisis estadístico	29
1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1.4.1 Caracterización física de harinas de legumbres comerciales	29
1.4.2 Caracterización química de harinas de legumbres comerciales	35
1.4.3 Propiedades funcionales de harinas de legumbres comerciales	38

1.4.4 Propiedades de <i>pasting</i> de harinas de legumbres comerciales.....	42
CONCLUSIONES.....	47
<u>CAPÍTULO 2: Desarrollo y caracterización de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harina de legumbres</u>	48
RESUMEN.....	49
2.1 INTRODUCCIÓN.....	50
2.1.1 Productos cárnicos y consumo.....	50
2.1.2 Productos cárnicos más saludables y sustentables	53
2.1.3 Hamburguesas.....	57
2.2 OBJETIVOS.....	59
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.3.1 Materiales	59
2.3.2 Diseño y formulación	60
2.3.3 Elaboración de hamburguesas	61
2.3.4 Cocción de los productos	63
2.3.5 Caracterización fisicoquímica de los productos.....	63
2.3.5.1 Actividad acuosa.....	63
2.3.5.2 Rendimiento	63
2.3.5.3 Líquido liberado por presión	64
2.3.5.4 Reducción del diámetro	64
2.3.5.5 Color	64
2.3.5.6 Análisis de perfil de textura.....	65
2.3.6 Análisis sensorial	66
2.3.7 Análisis estadístico	68
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
2.4.1 Tiempo de cocción	69
2.4.2 Caracterización física de los productos.....	69
2.4.3 Análisis sensorial	84
2.5 CONCLUSIONES.....	88
<u>CAPÍTULO 3: Variedades de porotos alubia del NOA. Caracterización fisicoquímica y funcional de sus harinas</u>	89
RESUMEN.....	90

3.1 INTRODUCCIÓN.....	92
3.2 OBJETIVOS.....	99
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	99
3.3.1 Material vegetal	99
3.3.2 Caracterización morfológica y de color de porotos	99
3.3.2.1 Morfología	100
3.3.2.2 Color	101
3.3.3 Obtención de harinas de porotos	101
3.3.4 Composición proximal, pH, color y propiedades funcionales de harinas de porotos	101
3.3.5 Cuantificación de compuestos bioactivos en las harinas de porotos	102
3.3.5.1 Pigmentos	102
3.3.5.2 Flavonoides y taninos	102
3.3.5.3 Compuestos polifenólicos totales y capacidad antioxidante	103
3.3.5.4 Fitoesteroles y tocoferoles	103
3.3.6 Compuestos antinutricionales en las harinas de porotos.....	104
3.3.6.1 Ácido fítico	104
3.3.6.2 Inhibidor de tripsina	105
3.3.7 Microestructura de harinas y análisis elemental por SEM-EDS.....	105
3.3.8 Análisis por Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR) sobre harinas de porotos.....	106
3.3.9 Espectroscopia de difracción de Rayos X de harinas de porotos.....	107
3.3.10 Propiedades térmicas de harinas de porotos	108
3.3.11 Análisis estadístico	108
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
3.4.1 Morfología y color de porotos	108
3.4.2 Composición, pH, color y propiedades funcionales de las harinas de porotos	110
3.4.3 Cuantificación de biocompuestos en harinas de porotos.....	112
3.4.4 Compuestos antinutricionales en harinas de porotos	115
3.4.5 Microestructura de harinas de porotos y análisis elemental por SEM-EDS.....	116
3.4.6 Análisis por FTIR-ATR de harinas de porotos	119

3.4.7 Estudio mediante Difracción de Rayos X.....	121
3.4.8 Estudio de transiciones térmicas mediante DSC.....	122
CONCLUSIONES.....	126
<u>CAPÍTULO 4: Optimización del contenido de harina de porotos y agua en la formulación de hamburguesas saludables</u>	127
RESUMEN.....	128
4.1 INTRODUCCIÓN.....	130
4.2 OBJETIVOS.....	132
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	133
4.3.1 Diseño experimental	133
4.3.2 Modelado de las variables respuesta.....	133
4.3.3 Optimización simultánea.....	134
4.3.4 Validación	136
4.3.5 Estudio de las transiciones térmicas	137
4.3.6 Análisis de la microestructura	137
4.3.7 Metodología y herramientas estadísticas empleadas	138
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
4.4.1 Modelado y optimización.....	139
4.4.1.1 Ajuste de modelos y selección de variables respuesta	139
4.4.1.2 Análisis de las superficies de respuesta obtenidas	140
4.4.1.3 Optimización de la formulación	148
4.4.1.4 Validación del modelo	150
4.4.2 Estudio de las transiciones térmicas	150
4.4.3 Análisis de la microestructura	154
4.5 CONCLUSIONES.....	158
<u>CAPÍTULO 5: Hamburguesas híbridas optimizadas. Evaluación nutricional y estabilidad durante el almacenamiento congelado</u>	159
RESUMEN.....	160
5.1 Introducción.....	161
5.1.1 Efecto de la incorporación de harina de porotos en la calidad nutricional de hamburguesas.....	161
5.1.2 Almacenamiento congelado de productos cárnicos.....	163
5.1.2.1 Cambios en textura	164

5.1.2.2 Oxidación lipídica como parámetro de calidad	164
5.2 Objetivos	166
5.3 Materiales y métodos	166
5.3.1 Elaboración de hamburguesas control y optimizadas	166
5.3.2 Caracterización nutricional	167
5.3.2.1 Composición y valor calórico.....	167
5.3.2.2 Contenido de inhibidor de tripsina	167
5.3.3 Estabilidad durante el almacenamiento congelado	168
5.3.3.1 Rendimiento	168
5.3.3.2 Color	168
5.3.3.3 Textura.....	168
5.3.3.4 Oxidación lipídica.....	168
5.3.3.5 Capacidad antioxidante	169
5.3.4 Análisis estadístico	171
5.4 Resultados y discusión	171
5.4.1 Composición y valor calórico	171
5.4.2 Inhibidor de tripsina	175
5.4.3 Estabilidad durante el almacenamiento congelado	176
5.4.3.1 Rendimiento	176
5.4.3.3 Textura.....	177
5.4.3.2 Color	180
5.4.3.4 Oxidación lipídica.....	183
5.4.3.5 Capacidad antioxidante	186
<u>CONCLUSIONES</u>	189
<u>REFERENCIAS</u>	192

INTRODUCCIÓN GENERAL

El planeta está sometido a un severo estrés por diversos factores interrelacionados y principalmente asociados con el aumento de la población mundial, la producción lineal de recursos y generación de desechos, e inequidad social con malnutrición proteica, que inevitablemente conducen a un siglo XXI con muchos desafíos en cuanto a la sustentabilidad. Una posible estrategia multidisciplinaria para revertirlo debería involucrar tres áreas de la ciencia de alimentos: una *dieta sustentable*, la *valorización de desechos* y la *circularidad de la cadena productiva*.

La *sustentabilidad o sostenibilidad* es una problemática de vanguardia en la sociedad actual, como lo remarcan las Naciones Unidas en su Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible que incluye el desarrollo de sistemas alimentarios más sustentables que reviertan a los actuales sistemas con exceso en uso de recursos e impacto ambiental, y que soporten el incremento esperado de dos mil millones de personas en la población mundial para el año 2050.

Existe una creciente conciencia en los sectores involucrados y los consumidores, sobre los principales problemas relacionados con los sistemas de producción de carne convencionales y altamente industrializados, que constituyen la mayor parte de la producción mundial de carne (Hartmann y Siegrist, 2020). No solo acerca del bienestar animal y las preocupaciones de salud pública (como enfermedades zoonóticas o enfermedades cardiovasculares), sino en particular, la seguridad alimentaria (como la alta necesidad de granos para la alimentación animal) y las preocupaciones ambientales (como el agotamiento de los recursos naturales y la contaminación ambiental) son el foco de atención (Faucitano *et al.*, 2017, Kumar *et al.*, 2017, Poore y Nemecek, 2018). Con el fin de proporcionar fuentes de proteínas a la creciente población mundial y, al mismo tiempo, limitar la carga causada por la producción masiva de proteínas animales, se buscan fuentes proteicas alternativas para la nutrición humana (He *et al.*, 2020; Jungbluth *et al.*, 2012, Poore y Nemecek, 2018).

En los últimos años, se ha reportado una reducción en el consumo de carne y una transición en aumento hacia dietas vegetarianas, veganas, o flexitarianas, siendo estas últimas las que promueven la ingesta mayoritaria de alimentos de origen vegetal sin abandonar el consumo de alimentos de origen animal. Una estrategia para esta

reducción lo representan los llamados productos cárnicos "*híbridos*", es decir, aquellos donde parte de la carne es sustituida por ingredientes de origen vegetal y diseñados por sus connotaciones positivas en salud y por su menor impacto ambiental asociados a un menor consumo de carne.

Los ingredientes potenciales utilizados en este tipo de productos son diversos. En este contexto, las **legumbres** se presentan como una excelente opción, debido a diferentes factores: en cuanto a la seguridad alimentaria, representan una fuente sumamente importante y económica de alto contenido de proteínas, fibras, vitaminas, minerales y componentes bioactivos; al mismo tiempo, contienen un bajo contenido lipídico (Chandler y McSweeney, 2022). Asimismo, presentan propiedades funcionales (absorción de agua y grasa, solubilidad, actividad emulsificante y capacidad espumante) permitiendo emplearlas en productos innovadores (Bessada *et al.*, 2019). Las proteínas de legumbres ofrecen además opciones para alternativas a productos libres de gluten, y libres de microorganismos genéticamente modificados al mercado (Vatansever *et al.*, 2020).

En cuanto a la salud, existen numerosos estudios que relacionan la inclusión de legumbres en la dieta con variados efectos fisiológicos, controlando y previniendo diversas enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon (Becerra-Tomás *et al.*, 2019; Martini *et al.*, 2021; Papandreou *et al.*, 2019).

Respecto a la agricultura sostenible, las legumbres son capaces de fijar biológicamente nitrógeno y liberar fósforo al suelo, lo que favorece una gestión más eficiente de los recursos y a la salud de los ecosistemas (Calles *et al.* 2019). Asimismo, su mayor eficiencia hídrica (en relación con las proteínas de origen animal) da como resultado una menor utilización de agua por kg producido (FAO, 2016). Y por último, debido a su gran diversidad genética, pueden seleccionarse o crearse variedades resilientes al clima, adaptándose el cambio climático acontecido.

Las legumbres han sido objeto de estudio respecto a su potencial uso en el desarrollo de alimentos funcionales, pero no son tan numerosos respecto a su inclusión en productos cárnicos. El reemplazo parcial de carne por legumbres en la

formulación de éstos, permitiría obtener un producto más bajo en colesterol (debido al menor contenido de carne), y con alto contenido de fibra, con propiedades beneficiosas para la salud de los consumidores (Ahmed *et al.*, 2011). Entre los efectos tecnológicos, la inclusión de harinas de legumbres reforzaría la capacidad de absorción de agua del producto, resultando en menores pérdidas durante la cocción y mejores rendimientos, asociado con efectos beneficiosos también en sus características sensoriales (Shariati-levari *et al.*, 2016).

Por lo tanto, los productos cárnicos híbridos formulados con el agregado de legumbres podrían actuar como un producto de transición a una dieta más sustentable, y ampliar la gama de productos disponibles para individuos flexitarianos que desean disminuir su consumo de carne sin comprometer el gusto, sabor y textura de los alimentos, y obtener productos con los beneficios nutricionales aportados tanto por la carne como por las legumbres utilizadas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se mencionó en la Introducción General, con el fin de proporcionar fuentes de proteínas a la creciente población mundial y, al mismo tiempo, limitar la carga causada por la producción masiva de proteínas animales, se requiere de una mayor utilización de proteínas de origen vegetal para mantener la producción de alimentos proteicos y reemplazar parte de las proteínas animales de la dieta humana. En este contexto, las legumbres son, en general, buenas fuentes de carbohidratos de liberación lenta y ricas en proteínas, fibra dietaria, minerales y vitaminas, y compuestos bioactivos. Por lo tanto, la inclusión de harinas de legumbres en reemplazo parcial de la carne empleada en productos cárnicos, no solo como extensor sino como ingrediente funcional, contribuiría en el cumplimiento de la meta propuesta.

En este contexto, en este Trabajo de Tesis se postularon las siguientes **hipótesis**:

- Las harinas de legumbres comerciales constituirán buenas fuentes de proteína, fibra y compuestos bioactivos, además de presentar adecuadas propiedades fisicoquímicas y funcionales.
- Es posible reemplazar parte de la carne empleada en formulaciones de hamburguesas por harina de legumbres comerciales y agua, de manera de obtener productos híbridos con adecuadas características físicas y sensoriales.
- Las harinas obtenidas de variedades de porotos NOA agronómicamente mejoradas conservarán las propiedades físicas y funcionales de las obtenidas de variedades tradicionales.
- Mediante la Metodología de Superficie de Respuesta es posible modelar matemáticamente las respuestas de las variables estudiadas sobre los productos híbridos y predecir el nivel de harina de porotos y la relación agua/harina que optimice sus parámetros de calidad.

- El producto híbrido optimizado será nutricionalmente equivalente o superior al control sin reemplazo de carne, y estable durante su almacenamiento, pero más sustentable.

Por lo tanto, el **objetivo general** es contribuir a la optimización de formulaciones de productos cárnicos procesados incrementando su calidad nutricional y reduciendo su impacto ambiental por aprovechamiento e incorporación de proteínas más amigables con el medio ambiente. Para ello se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar y analizar las características físicas, químicas, y propiedades funcionales de harinas de legumbres comerciales disponibles en la región.
- Reemplazar parcialmente carne de cerdo por harinas de legumbres comerciales y agua en hamburguesas formuladas con aceite de girasol alto oleico pre-emulsificada y evaluar las características físicas y sensoriales de los productos híbridos obtenidos.
- Estudiar y analizar las características fisicoquímicas, propiedades funcionales y térmicas de harinas obtenidas de variedades de porotos alubia agrónomicamente mejoradas del NOA.
- Modelar matemáticamente las respuestas de las variables en los productos obtenidos mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), y predecir y validar el nivel de harina de porotos y la relación agua/harina que optimice sus parámetros de calidad.
- Analizar la calidad nutricional del producto híbrido optimizado y evaluar los cambios en los parámetros de calidad durante el almacenamiento congelado, en relación con el producto sin reemplazo.

CAPÍTULO 1

Estudio de propiedades
fisicoquímicas y funcionales de
diferentes harinas de
legumbres

RESUMEN

Las legumbres constituyen una de las familias botánicas más importantes desde el punto de vista socioeconómico, con notables implicancias en nuestra agricultura, medio ambiente y alimentación. Las legumbres son fuentes reconocidas de proteínas, almidón, fibra, vitaminas y minerales. Además contienen un grupo diverso de compuestos bioactivos. Existe creciente evidencia científica que relaciona el consumo de legumbres con efectos benéficos sobre la salud, asociadas a su particular composición.

Motivados por la conciencia ambiental, el bienestar animal y la salud, cada vez más consumidores prefieren alimentos de origen vegetal. En este contexto, las legumbres ocupan un lugar preferencial y se presentan como una oportunidad única para la Argentina, que cuenta con potencial para abastecer un mercado en auge. En contrapartida, el volumen demandado por el mercado interno es bajo, ya que el consumo estimado es de 800 g por habitante/año, debido principalmente a una cuestión de índole cultural.

En este Capítulo, se trabajó con distintas harinas comerciales de legumbres características de Argentina: arveja, garbanzo, lenteja y poroto. Se analizaron sus propiedades físicas evaluando densidad aparente, pH, color y distribución y el tamaño de partícula. Además se determinó la composición proximal, el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, y se estudiaron algunas de sus propiedades funcionales y de *pasting*.

Los resultados en cuanto a su composición, si bien fueron diversos para cada legumbre, se caracterizaron por un alto contenido de fibra y proteínas y bajo contenido de lípidos, siendo este último mayor para el garbanzo.

La harina de lentejas se caracterizó por presentar el mayor contenido de compuestos polifenólicos totales y los mayores valores para la capacidad antioxidante.

Las legumbres exhibieron propiedades funcionales algo diversas según su especie, pero mostraron similares tendencias.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Legumbres

Según el Codex Alimentarius (2007) se entiende por legumbres a las semillas secas de plantas leguminosas las cuales se distinguen de las semillas oleaginosas por su bajo contenido de grasa. Otra definición de este grupo de alimentos se encuentra en el Capítulo XI “Alimentos Vegetales” del Código Alimentario Argentino (CAA, 2021) en la cual se reserva la denominación de legumbres a las frutas y semillas de las leguminosas.

Si bien existe una gran variedad de legumbres, arvejas (*Pisum sativum L.*), lentejas (*Lens culinaris*), porotos (*Phaseolus vulgaris L.*) y garbanzos (*Cicer arietinum L.*) son las más conocidas y consumidas en todo el mundo (FAO, 2016a). En conjunto, estos cuatro cultivos representan aproximadamente el 70 % de la producción global total de legumbres (77,3 millones de toneladas), en donde los porotos representan aproximadamente el 30 %, seguido de los garbanzos (17 %), arvejas (15 %) y lentejas (7 %) (Conde, 2016). Particularmente en Argentina, la cadena de legumbres comprende principalmente la producción de porotos, y en menor medida de garbanzos, lentejas y arvejas, entre otras variedades. Estas leguminosas se cosechan para obtener principalmente semillas secas. La valoración de este tipo de productos está dada en función al calibre, aspecto y tamaño, características apreciadas por el mercado que determina su cotización.

Una de las características más relevantes del sector legumbrero es el escaso volumen demandado por el mercado interno. En Argentina, el consumo es de 800 g por habitante/año, apenas la décima parte del consumo *per cápita* a nivel mundial (8 kg por habitante/año) (MAGYP, 2021). Esto se debe principalmente a una cuestión de índole cultural, siendo la mayor parte de las legumbres consumidas sin grandes procesos de transformación. Según datos de la Cámara Argentina de Legumbres de la República Argentina (MAGYP, 2021) las lentejas son las legumbres más aceptadas por el consumidor argentino, seguidas por las arvejas y finalmente los porotos y garbanzos.

El consumo mundial de legumbres tuvo una fuerte caída en la década del 60. El lento crecimiento de los rendimientos con el consecuente aumento de los precios debilitó la demanda. Por otra parte, el aumento de los ingresos y la urbanización desplazaron la preferencia de las legumbres hacia dietas ricas en proteínas animales,

azúcar y grasa. Sin embargo, las legumbres siguieron siendo una fuente importante de proteínas en los países en desarrollo y el consumo mundial promedio *per cápita* pudo recuperarse con los años, principalmente a mediados del 2000, según los índices actuales de consumo (OCDE, 2020). Según la misma fuente, se espera que las legumbres recuperen importancia en las dietas y en los sistemas agrícolas de África, Asia, América Latina y la Unión Europea, alcanzando un consumo mundial promedio *per cápita* de 8,3 kg/año hacia el 2029. El aumento de los ingresos en regiones donde las legumbres son una fuente importante de proteína y la necesidad de los consumidores de incorporar a sus dietas alimentos con marcadas características nutricionales benéficas impulsan estas proyecciones.

En Argentina, el cultivo que se destaca dentro de la cadena de legumbres es el poroto, representando aproximadamente el 92 % de la superficie total cultivada con legumbres y el 87 % del volumen de producción. Las principales zonas de cultivo se encuentran en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero y norte de Santa Fe. El grano se siembra en enero y se cosecha a fines de marzo/abril siendo un cultivo de verano que compite en la utilización del suelo con la soja. Su destino principal es la exportación (MAGyP, 2021).

Respecto a la arveja, según el Instituto Nacional de Semillas (INASE) existen más de 80 variedades registradas en nuestro país. Cada una de ellas se caracteriza por el color y textura de la semilla, y atributos de la planta. Se cultiva en forma extensiva para abastecer al sector industrial y en forma intensiva para su consumo fresco (como grano seco, remojado, o forraje), predominando los cultivos extensivos (arveja seca). Se trata de un cultivo de invierno; la siembra se extiende de julio hacia fines de agosto en las zonas de centro de Buenos Aires, centro-sur de Santa Fe y Córdoba. La cosecha, de noviembre a principios de diciembre, posibilita el desarrollo de cultivos de segunda ocupación como la soja, el girasol o maíz.

Dentro de las legumbres con destino alimenticio, en nuestro país la lenteja ocupa el tercer lugar en importancia luego de los porotos y la arveja seca (IDEP, 2021). Es un cultivo de invierno, que se siembra entre mayo y agosto, y se cosecha en noviembre y diciembre. Sus zonas de producción comprenden Buenos Aires, centro sur de Santa Fe y Córdoba.

Respecto al garbanzo, la siembra se lleva a cabo entre mayo y junio, principalmente en la zona centro de nuestro país (Córdoba y Buenos Aires) y en el NOA (Tucumán, Salta). Existen tres tipos de garbanzo, Kabuli, Desi y Gulabi, siendo la primera la variedad con mayor producción en nuestro país (Vizgarra *et al.*, 2019). Se caracteriza por presentar un grano de tamaño medio a grande, redondeado y arrugado, color claro, y flores no pigmentadas. Cabe destacar que el garbanzo en los últimos años se ha convertido en un producto de importancia y pasó a constituir uno de los alimentos que mejor cotiza en el mercado internacional.

1.1.2 Producción agrícola

Las legumbres son consideradas alimentos ecológicamente sustentables debido a su habilidad de fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo. Ayudan a mitigar el cambio climático al reducir indirectamente las emisiones de dióxido de carbono, y al mismo tiempo, disminuyen la dependencia hacia los fertilizantes nitrogenados sintéticos (Calles *et al.*, 2019). Muchas leguminosas son capaces de formar una asociación simbiótica con algunas especies de bacterias que se denominan "rizobios" (Sprent y Sprent, 1990). Los rizobios fijan nitrógeno atmosférico en formas biológicamente útiles dentro de los nódulos de las raíces de leguminosas en un proceso llamado "Fijación Biológica del Nitrógeno" (BFN, por sus siglas en inglés) (Sprent, 2009). Esta asociación simbiótica es la mayor fuente natural de nitrógeno para sustentar los sistemas naturales (Vitousek *et al.*, 2002). A su vez, algunas legumbres son capaces de movilizar el fósforo del suelo, mejorando así la renovación biológica del mismo (Nuruzzaman *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2010). El fósforo es también un nutriente importante para las plantas, el cual es proporcionado principalmente por fertilizantes inorgánicos.

La presencia de legumbres en los ecosistemas agrarios ayuda a mantener o aumentar la biomasa y actividad microbianas vitales en el suelo y, por ende, nutre a los organismos responsables de consolidar la estructura del suelo e impulsa la disponibilidad de nutrientes (Blanchart *et al.*, 2005). Un nivel elevado de biodiversidad en el suelo no solo hace que el ecosistema sea más resistente y resiliente frente a las alteraciones y las tensiones, sino que también mejora la capacidad de los ecosistemas para suprimir enfermedades (Brussaard *et al.*, 2007). Estas características son

especialmente importantes para los sistemas de producción agrícola que utilizan pocos insumos.

Las legumbres son un componente fundamental de sistemas de cultivos múltiples tales como el cultivo intercalado, la rotación de cultivos y los sistemas agroforestales; estos sistemas cuentan con una mayor diversidad de especies que los de monocultivo (FAO, 2013a). La mayor diversidad de especies de los sistemas de cultivo no solo da lugar a un uso más eficiente de los recursos, en concreto luz, agua y nutrientes (Giller y Wilson, 1991), sino que también puede aumentar el rendimiento combinado de las especies de cultivos intercalados en una determina zona y disminuir el riesgo global de malas cosechas (Norgaard *et al.*, 1999).

Por lo tanto, la incorporación de legumbres a los cultivos a través de sistemas de rotación o intercalado de los mismos, aumenta la biodiversidad del suelo y mejora el ciclo de nutrientes, aportando a la sostenibilidad y la resiliencia de los sistemas agrícolas (Sieveking *et al.*, 2017).

Por otro lado, su mayor eficiencia hídrica (en relación con las proteínas de origen animal) da como resultado una menor utilización de agua por kg producido (FAO, 2016). La huella hídrica (HH), concepto introducido por Hoekstra (2003) y retomado por Hoekstra y Chapagain (2008), es un indicador multidimensional que permite expresar el volumen de agua utilizado en una producción. Puede ser considerado como un indicador global de apropiación de los recursos de agua dulce, por encima de la medida tradicional y restringida de la extracción de agua. Relacionado a este concepto se definen la “HH azul” como el agua extraída de ríos, lagos y acuíferos aplicada al riego, la “HH verde” como el volumen de agua de lluvia consumida durante el proceso de producción, y la “HH gris” como la la cantidad de agua dulce contaminada en el proceso. La evaluación de la HH engloba a estos tres tipos de huella, refiriéndose entonces al volumen de agua incorporada o contaminada en toda la cadena de obtención de un producto.

Es importante resaltar que las legumbres tienen una menor HH en comparación con otras fuentes de proteínas. Gerbens-Leenes *et al.* (2011) afirmaron que la obtención de productos de origen animal requiere un volumen significativamente mayor en comparación con los alimentos de origen vegetal. Por citar un ejemplo, la HH de la carne de cerdo es dos veces mayor que la de las legumbres y cuatro veces mayor que

la de los granos. A su vez, cualquier HH de un producto animal es mayor que la HH de los productos de cultivo con un valor nutricional equivalente, siendo 20 veces mayor en promedio por caloría respecto a los cereales y las raíces con almidón. Actualmente, la HH mundial vinculada a la producción animal constituye casi un tercio de la HH de la producción agrícola total. Por ejemplo, la HH por gramo de proteína para la leche, huevos y carne de pollo es 1,5 veces mayor que para las legumbres. Estos valores difieren si los productos animales provienen de sistemas industriales o de sistemas de pastoreo o mixtos, ya que los primeros generalmente consumen y contaminan más recursos de aguas subterráneas y superficiales, lo que contribuye a aumentar la HH gris (Gonzalez *et al.*, 2020).

En reconocimiento a la importancia agrícola, económica y nutricional de las legumbres, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) decidió declarar el 2016 como “Año Internacional de Legumbres” (FAO, 2016b) con el fin de crear conciencia pública sobre sus beneficios nutricionales y medioambientales.

1.1.3 Composición y propiedades

Las legumbres se caracterizan por tener un elevado contenido proteico, superior a la mayoría de los alimentos vegetales, con aproximadamente el doble del contenido de proteínas que en los cereales. Esto podría atribuirse a su asociación con la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno en sus raíces, que convierten el gas nitrógeno inutilizable en amonio que la planta luego incorpora en la síntesis de proteínas (Maphosa y Jideani, 2017).

Arvejas, garbanzos, porotos y lentejas presentan un contenido proteico entre 17 y 30 % con un contenido variado de aminoácidos (Boye *et al.*, 2010a). Las proteínas más abundantes encontradas en legumbres son globulinas y albúminas. Las globulinas son la fracción mayoritaria (entre el 45 y 70 % del total de las proteínas) mientras que las albúminas corresponden aproximadamente al 8 - 30 % (Barac *et al.*, 2015; Lam *et al.*, 2018; Liang y Tang, 2013). Las albúminas son solubles en agua y comprenden enzimas, inhibidores de proteasa, inhibidores de amilasa y lectinas, y poseen una masa molar (MM) entre 5000 y 80.000 Da. Las globulinas, por otro lado, son solubles en soluciones salinas. De acuerdo a los coeficientes de sedimentación, las globulinas se clasifican en

diferentes fracciones. Las principales globulinas encontradas en legumbres son legumina (11S) y vicilina (7S), proteínas de almacenamiento que incluyen subunidades polimórficas codificadas por familias de multigenes. La legumina 11S posee estructura cuaternaria hexamérica con subunidades ácida (MM \approx 40.000 Da) y básica (MM \approx 20.000 Da). La vicilina 7S posee una estructura trimérica con MM de 175.000–180.000 (Boye *et al.*, 2010b).

Una tercera proteína de almacenamiento, convicilina, diferente de legumina y vicilina, fue purificada de semillas de arvejas. Posee un perfil aminoacídico típicamente diferente y a diferencia de vicilina, contiene muy poco carbohidrato y posee una subunidad de 71.000 Da de MM y en su forma nativa una MM de 290.000 Da incluyendo una extensión N-terminal. Se han encontrado variaciones cualitativas y cuantitativas en subunidades de convicilina dentro y entre diferentes variedades de arvejas. Presenta aminoácidos azufrados que están ausentes en vicilina. Sin embargo, algunos autores discrepan con la nomenclatura de la convicilina argumentando que la definición de la heterogeneidad de vicilina debe extenderse para admitir la posible inclusión oligomérica del polipéptido de 70.000 Da (Bessada *et al.*, 2019; Shevkani *et al.*, 2019).

Otras proteínas menores encontradas en legumbres son las prolaminas y glutelinas. Las prolaminas son solubles en alcohol y se caracterizan por una elevada proporción de prolina y glutamina. Las glutelinas, solubles en ácido diluido o detergentes alcalinos, y en presencia de agentes caotrópicos o reductores, presentan mayores contenidos de metionina y cisteína que las globulinas y por ello son también de interés nutricional.

La composición proximal de diferentes legumbres, así como su contenido proteico, puede presentar algunas variaciones entre diferentes especies o como consecuencias de factores ambientales (como origen geográfico o ciclo fenológico). La fracción proteica de arvejas (19,5 – 22,4 %) está principalmente constituida por globulinas (legumina, vicilina y convicilina, 50 – 85 %) y albúminas (15 – 25 % del total de proteínas), la de garbanzo (15 - 30 %) por globulinas (53 – 60 %), glutelinas (19 – 25 %), albúminas (8 – 12 %) y prolaminas (3 – 7 %), en el caso de lenteja (24 – 30 %) de leguminas (\approx 45 %), albúminas (\approx 17 %), glutelinas (\approx 11%), vicilinas (\approx 4 %), y prolaminas (\approx 3 %), y en porotos (17 – 27 %), globulinas (45 - 70 %) y albúminas (10 – 30 %) (Boye

et al., 2010b; Bessada *et al.*, 2019; Los *et al.*, 2018; Millar *et al.*, 2019a; Wang y Daun, 2006).

La calidad nutricional de las proteínas está determinada por los requerimientos de aminoácidos de nuestro organismo y su disponibilidad al ser digeridos (FAO, 2013b). De manera general, las legumbres presentan una calidad proteica inferior a las de origen animal tales como las de la leche o huevo. Esto se debe a diversos factores entre los que podemos destacar su menor contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), la resistencia a la digestión de ciertas proteínas (relación estructura/digestibilidad) y a la presencia de compuestos antinutricionales que dificultan la digestibilidad de las proteínas (Lynch *et al.*, 2018). Sin embargo, por su elevado contenido de lisina, las proteínas de legumbres se complementan con las proteínas de cereales, ya que estos presentan un bajo contenido en este aminoácido.

Almidón, fibra y oligosacáridos constituyen los principales carbohidratos presentes en las legumbres. Su contenido es elevado, siendo el almidón el polisacárido mayoritario (35 - 45 % del peso seco de las semillas). El contenido de almidón en legumbres suele ser inferior al de los cereales, esto está relacionado a las diferencias entre especies y variedades, asociaciones de gránulos de almidón con otros constituyentes, estado fisiológico de la semilla, y métodos de estimación. Otra diferencia con el almidón de cereales, es que el de las legumbres se caracteriza por el mayor contenido de amilosa (Wani *et al.*, 2016).

El almidón está compuesto fundamentalmente por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, además de una fracción minoritaria (de 1 % a 2 %) de compuestos como lípidos endógenos, proteínas, y monoésteres de fosfato (Ren *et al.* 2021). En los gránulos de almidón las moléculas de amilosa y de amilopectina se disponen en forma radial, formando una serie de anillos concéntricos, resultando en una estructura semi-cristalina, en donde las cadenas lineales de la amilopectina forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional mientras que la región amorfa estaría formada por las zonas de los puntos de ramificación de la amilopectina y la amilosa (Ren *et al.*, 2021). En presencia de agua, bajo calentamiento continuo y agitación, los gránulos de almidón se hinchan, proceso conocido como "gelatinización". La absorción de agua a través de la región amorfa, la hidratación y el hinchamiento de los gránulos, la pérdida de la birrefringencia y de la cristalinidad, y la

lixiviación de la amilosa, están asociados a la gelatinización (Hoover *et al.*, 2010; Waigh *et al.*, 2000). Los almidones de legumbres exhiben un hinchamiento restringido en una sola etapa, indicativo de fuertes interacciones entre cadenas de almidón que se debilitan a una única temperatura, y bajo grado de lixiviación de amilosa (Hoover y Sosulski, 1985). Asimismo, las moléculas de amilosa lixiviadas al medio podrían formar un gel, atrapando gran cantidad de agua.

En cuanto a la digestión del almidón, está principalmente mediada por amilasas, dextrinasas y disacaridasas que actúan hidrolizándolo a monómeros de glucosa, fácilmente absorbibles a través de la mucosa intestinal. La digestibilidad del almidón depende de factores tales como el tamaño del gránulo, su estructura molecular y la relación amilosa/amilopectina (Villarroel *et al.*, 2018). Estas características guardan relación con su origen botánico ya que éste determina la organización y estructura cristalina (Tester *et al.*, 2004).

De acuerdo con el índice y grado de digestión *in vitro*, los almidones se clasifican en tres fracciones principales: a) almidón rápidamente digerible (fracción de almidón digerido en los primeros 20 minutos de incubación), b) almidón lentamente digerible (fracción de almidón digerido entre los 20 y 120 minutos de incubación), y c) almidón resistente (AR) (fracción restante que no es digerida) (Magallanes-Cruz *et al.*, 2017). El AR se encuentra naturalmente en granos de cereal, semillas, tubérculos y legumbres, caracterizándose esta última por su elevado contenido (Bede y Zaixiang, 2021). Estudios en humanos resaltan los potenciales efectos positivos del AR en el mejoramiento de la salud de la microbiota intestinal, la reducción de la acumulación de grasa, el aumento de la sensibilidad a la insulina, la regulación de la glucemia y el control del metabolismo lipídico (Halajzadeh *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Meenu y Xu, 2019; Snelson *et al.*, 2019). Gran parte de estos beneficios se explican a través de los atributos del AR como fibra soluble, su capacidad para generar ácidos grasos de cadena corta y su habilidad para formar soluciones viscosas en el lumen intestinal. Además, estos hidratos de carbono de absorción lenta presentarían un gran potencial para aumentar la saciedad, pudiendo ser un buen complemento en dietas restrictivas en calorías (Clark y Duncan, 2017).

Las legumbres presentan un alto contenido en fibra dietaria (14 - 33 %) (Vaz Patto *et al.*, 2015). La composición de la fibra dietaria depende principalmente de la

localización de la misma. La mayor diferencia entre la fibra en las cubiertas externas del grano y el cotiledón es el contenido relativo de celulosa y compuestos polisacáridos no celulósicos. Las paredes celulares del cotiledón presentan diversos polisacáridos como pectinas (aproximadamente 55 %), celulosa (≈ 9 %) y glucanos (6 – 12 %), mientras que las cubiertas contienen grandes cantidades de celulosa (35 a 57 %) y baja cantidad de hemicelulosas y pectinas (Guillon y Champ, 2002).

La fibra se puede clasificar en soluble e insoluble de acuerdo a su solubilidad en agua. Químicamente, la fibra insoluble está constituida por un conjunto de moléculas heterogéneas, tales como hemicelulosa, pectinas y lignina derivadas de carbohidratos estructurales presentes en la pared celular. La fibra soluble está constituida fundamentalmente por pectinas, gomas, mucílagos, algunas hemicelulosas y polisacáridos. Los niveles de fibra soluble de las legumbres son superiores a los encontrados en cereales y tubérculos (Delgado-Andrade *et al.*, 2016). La fibra soluble es resistente al proceso digestivo y escapa a la absorción intestinal; es parcial o totalmente fermentada en el intestino grueso principalmente a diversos ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato (Silva *et al.*, 2020), donde pueden ejercer efectos fisiológicos importantes tanto a nivel local (reducción del pH que implica un incremento de la biodisponibilidad de minerales, e inhibición del crecimiento de bacterias patógenas) como sistémico (modulación de respuesta inmune e inflamatoria, entre otros efectos) (Dahl y Stewart, 2015; Guillon y Champ, 2002). A diferencia de la fibra soluble, la fibra insoluble sufre menor fermentación intestinal siendo excretada mayoritariamente en heces, regulando así el tránsito intestinal (Soliman, 2019). A su vez, es importante destacar que las legumbres presentan elevado contenido de oligosacáridos derivados de la rafinosa, los cuales, junto a otros componentes indigeribles, son responsables de producir flatulencias. No obstante, estudios sugieren un papel importante como compuestos prebióticos emergentes con capacidad para modular la microbiota intestinal (Moussou *et al.*, 2017).

Entre los compuestos bioactivos de naturaleza polifenólica presentes normalmente en las semillas de leguminosas podemos citar a los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos condensados. Las sustancias fenólicas son compuestos polihidroxilados presentes en todas las plantas superiores que se sintetizan principalmente por las vías

del ácido shikímico, pentosa fosfato y fenilpropanoides (Balasundram *et al.*, 2006). Dada su importante acción en diversos procesos fisiológicos y metabólicos, su inclusión en la dieta ha sido relacionada con el control y prevención de diferentes enfermedades metabólicas, tales como osteoporosis, hipertensión, desórdenes gastrointestinales, diabetes mellitus, afecciones cardiovasculares y cáncer de colon (Bernardi *et al.*, 2019; Fraga *et al.*, 2019; Mattioli *et al.*, 2019). Entre los beneficios se destaca el efecto cardioprotector asociado con la habilidad de disminuir el contenido de lipoproteínas de baja densidad y colesterol total (Padhi y Ramdath, 2017). Adicionalmente, estos compuestos tienen una fuerte relación con ciertos atributos de los alimentos como el color, sabor y *flavor*. Por ello, en los últimos años, las legumbres han sido estudiadas por su potencial uso en el desarrollo de alimentos funcionales.

Por otra parte, la porción lipídica insaponificable es una fuente potencial de componentes bioactivos como fitoesteroles y tocoferoles. Los fitoesteroles se encuentran en pequeñas cantidades en las legumbres; el β -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol son los más comunes (Benveniste, 1986). Diversos estudios han demostrado la eficiencia de los esteroides y estanoles en la reducción del colesterol sanguíneo (Chen *et al.*, 2019; Trautwein *et al.*, 2018).

Otro aspecto a destacar de las legumbres es su bajo índice glucémico (IG), concepto propuesto por Jenkins *et al.* (1981) como un método para evaluar y clasificar a los alimentos ricos en carbohidratos en base a los efectos que producen sobre la glucemia posprandial. Dietas con altos IG se han asociado con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades coronarias (Chiavaroli *et al.*, 2021; Dwivedi *et al.*, 2022; Gołębek y Regulska-Illow, 2019; Jenkins *et al.*, 2021). En legumbres, el contenido de AR, compuestos fenólicos, proteínas y fibra muestra una relación inversa con el IG, dado que el AR, resulta menos susceptible a hidrólisis enzimática, los compuestos fenólicos (incluidos los flavonoides) inhiben a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, altos niveles de proteína estimulan la secreción de insulina, modulando mejor la cantidad de glucosa, y la fibra funciona como inhibidor físico de la digestión en el intestino, lo que ralentiza las interacciones entre las enzimas y los sustratos (Afandi *et al.*, 2021).

El éxito del uso de fuentes proteicas de origen vegetal en el desarrollo de alimentos depende de sus propiedades funcionales. Las propiedades funcionales proporcionan información sobre cómo se comportaría un ingrediente en particular en la matriz de un alimento, desempeñan un papel destacado durante la preparación, elaboración y almacenamiento de los alimentos y, a su vez, se correlacionan con las propiedades sensoriales. Componentes como la fibra, el almidón y las proteínas contribuyen significativamente a la funcionalidad del producto (Kaur *et al.*, 2009; Kaur y Singh, 2005); como resultado, su presencia, composición y concentración en un producto alimenticio podría modificar positiva o negativamente la funcionalidad de éste.

En ese sentido, las harinas de legumbres han sido utilizadas como ingredientes alimenticios debido tanto a sus propiedades funcionales como a su alto contenido proteico (Bayomy y Alamri, 2022; Kotsiou *et al.*, 2022; Marchini *et al.*, 2021; Millar *et al.*, 2019b; Turfani *et al.*, 2017; Wiesinger *et al.*, 2020). Desde el punto de vista de su aplicación en alimentos, la hidratación, emulsificación, propiedades espumantes, gelificación, retención de agua y aceite, solubilidad, dispersabilidad, propiedades de adhesión, capacidad *buffer*, viscosidad, comportamiento de flujo (propiedades de *pasting*), color, sabor, *flavor*, y la capacidad de formación de película, junto a sus propiedades nutricionales, son los principales factores a tener en cuenta (Sathe *et al.*, 1984). Estas propiedades influyen en la calidad general y en la percepción sensorial de los alimentos. A su vez, son variables importantes en la fabricación de productos de panadería o confitería, postres, bebidas, aderezos para ensaladas y productos cárnicos. El entendimiento de los factores que influyen en estas propiedades funcionales, así como de los mecanismos subyacentes a las interacciones que inducen estas propiedades, es de vital importancia para la incorporación exitosa de legumbres enteras en forma de harina, concentrados o aislados, hidrolizados o mezclas en alimentos. A su vez, este conocimiento permite identificar las condiciones óptimas de procesamiento (pH, temperatura, concentración) y predecir interacciones eficientes entre los ingredientes optimizando la obtención del producto final.

Las legumbres pueden presentar una gran diversidad en cuanto a su composición y exhibir propiedades funcionales muy diversas según su especie, variedad, condiciones del cultivo y ambientales. Identificar las propiedades funcionales específicas de harinas

obtenidas a partir de legumbres es esencial para determinar sus posibles usos como ingredientes alimentarios.

1.2 OBJETIVOS

Sobre harinas de legumbres comerciales disponibles en el mercado local se propuso:

- analizar sus características físicas (evaluando densidad aparente, color y distribución y tamaño de partículas) y químicas (pH, composición proximal, contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante).
- estudiar sus propiedades funcionales (absorción de agua y de aceite, actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión, concentración mínima de gelificación y propiedades de *pasting*).

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Muestras analizadas

Se trabajó con harinas de legumbres comerciales de arvejas (*Pisum sativum* L.) (Yin Yang, Dietética Científica, Buenos Aires, Argentina), garbanzos (*Cicer arietinum* L., variedad Kabuli) (Yin Yang, Dietética Científica, Buenos Aires, Argentina), lentejas (*Lens culinaris* Medik) (Condiment S.A., Buenos Aires, Argentina) y porotos blancos (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fincas Andinas S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Las mismas fueron adquiridas en comercios locales y conservadas al abrigo de la luz y humedad.

1.3.2 Caracterización física

1.3.2.1 Densidad aparente

La densidad aparente se determinó mediante el método descrito por Wani y Kumar, (2014) evaluando el peso de harina requerido para enrasar a 10 ml en probeta graduada. La densidad aparente se definió como el peso de la muestra por unidad de volumen (g/ml). Las medidas se realizaron por triplicado.

1.3.2.2 Distribución de tamaños de partículas

Se determinaron las distribuciones de tamaños de partículas de las harinas de legumbres comerciales y de las mismas harinas tras 30 s de sonicado (TestLAB TB04n)

para evitar la posible aglomeración en la mismas, mediante un equipo de dispersión láser (Mastersizer 2000E, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) con sistema de dispersión Hydro 2000MU provisto de un láser He-Ne (633 nm), y rango de medición entre 0,1 a 1000 μm . Se adoptó un índice de refracción de 1,14 para las partículas y de 1,33 para el medio acuoso (Márquez *et al.*, 2015). El coeficiente de absorción considerado para las partículas fue de 0,01.

Para cada determinación, se agregaron aproximadamente 2 g de harina dentro de la unidad de dispersión conteniendo agua destilada con agitación rotacional Hydro SM (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) a 2000 rpm hasta alcanzar una obscuración de alrededor del 10 %.

Los resultados se expresaron como diferentes percentiles de la curva de distribución de partículas (D). A D10, el 10 % del volumen de la muestra presentó partículas del diámetro indicado (μm) o menor; a D50, el 50 % del volumen de la muestra presentó partículas del diámetro indicado (μm) o menor; y a D90, el 90 % del volumen de la muestra presentó partículas del diámetro indicado (μm) o menor. Las medidas se realizaron por cuadruplicado.

1.3.2.3 Color

El color se evaluó con un colorímetro triestímulo (Minolta CR-400, Minolta Corp., Ramsey; New Jersey, Estados Unidos) sobre una capa uniforme de harina colocada en placa de Petri empleando el espacio de color CIE-Lab (Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), 1931) calibrado con un standard ($Y=93,80$, $x= 0,3133$, $y= 0,3193$).

En este espacio de color el parámetro a^* representa la variación rojo-verde, tomando valores positivos para el primero y negativos para el segundo; el parámetro b^* representa la variación amarillo-azul, siendo positivo para el primero y negativo para el segundo, y el parámetro luminosidad L^* varía entre 0 para el negro y 100 para el blanco. Los resultados informados corresponden al promedio de al menos diez determinaciones.

1.3.3 Caracterización química

1.3.3.1 Determinación del pH

Se prepararon dispersiones de harina en agua destilada al 10 % p/v y el pH de las mismas se determinó mediante electrodo de vidrio (Phoenix, Garbsen, Alemania) empleando un pHmetro Hach Sension+pH3 (Hach, Loveland, CO, EE.UU).

1.3.3.2 Composición proximal

Sobre las harinas de legumbres comerciales se determinó por duplicado el contenido de humedad, lípidos, cenizas y proteínas, empleando métodos AOAC (1984), el contenido de fibra dietaria total mediante kit enzimático y calculando el contenido de hidratos de carbono disponibles por diferencia (Zou *et al.*, 2007). Los resultados para el contenido de lípidos, cenizas, proteínas, fibras e hidratos de carbono disponibles fueron expresados en base seca (g/100 gbs).

Determinación de humedad: Se determinó el contenido de humedad mediante método indirecto (método 24.003, AOAC, 1984). Se pesaron aproximadamente 2 g de muestra en cristizador y se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido de humedad (g/100 g) se calculó a partir de las diferencias de peso obtenidas.

Determinación de proteínas: Se determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Kjeldahl (método 24.027, AOAC, 1984) que consiste en determinar el nitrógeno total (N) presente en la muestra y relacionarlo directamente con la cantidad de proteínas, tras eliminar la materia orgánica con H₂SO₄. La muestra se sometió a un tratamiento oxidativo en caliente en un digestor (K-435 Büchi Labortechnik AG) con 20 ml de H₂SO₄ concentrado en presencia de una mezcla catalizadora (1:10 - CuSO₄:K₂SO₄). Del (NH₄)₂SO₄ formado se liberó el NH₃ por tratamiento alcalino con NaOH 32% en una unidad de destilación, empleando una corriente de vapor y colectando el NH₃ en un recipiente con H₃BO₃ 4 g/100g. Finalmente se realizó una titulación con una solución valorada de H₂SO₄.

Se realizó por duplicado una determinación del blanco de reactivos de manera análoga a lo detallado anteriormente pero sin la adición de muestra. El contenido de proteína de las harinas (g/100 gbs) se calculó teniendo en cuenta el factor de

conversión de nitrógeno a proteína comúnmente utilizado para legumbres de 6,25 (Rizvi et al. 2022).

Determinación de lípidos: Se determinó el contenido de lípidos mediante el método de Soxhlet (método 24.005, AOAC, 1984). Se colocaron aproximadamente 5 g de muestra en un cartucho de papel de filtro que posteriormente fue colocado en el tubo de extracción del equipo. Se agregó éter de petróleo (Punto de ebullición: 35-60 °C) y se conectó con una línea refrigerante. La extracción se realizó a reflujo sobre manta calefactora durante 8 ciclos. Una vez finalizada, se eliminó el solvente por evaporación obteniéndose la fracción lipídica de las muestras a partir de las cuales se calculó el contenido de lípidos solubles en éter en las harinas (g/100 gbs).

Determinación de cenizas totales: Se determinaron los residuos de incineración o cenizas, refiriéndose al residuo que queda tras la calcinación completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones determinadas. Este residuo, se corresponde con el contenido de minerales del alimento (método 24.003, AOAC, 1984). En primer lugar, se calcinaron las cápsulas de porcelana vacías a 900 °C en mufla, se enfriaron en desecador y pesaron al tomar temperatura ambiente con el fin de efectuar una limpieza de las mismas.

Empleando las cápsulas así preparadas se realizó la carbonización de aproximadamente 1,5 g de muestra sobre triángulo de pipas y mechero, hasta lograr un residuo carbonoso. Luego se procedió a calcinar en mufla a 525 °C hasta obtener cenizas blancas o de color gris claro y de peso constante a partir de las cuales se calculó el contenido de cenizas totales de las harinas (g/100 gbs).

Determinación de fibra dietaria total: se determinó según AACC 32-05 (Grami, 2000) utilizando el método enzimático-gravimétrico (kit K-TDFR Megazyme®, Irlanda). Las muestras se trataron a 100 °C con α -amilasa (3000 Unidades Ceralpha/ml) para gelatinizar, hidrolizar y despolimerizar el almidón presente; luego se incubaron a 60 °C con enzima proteasa (E-BSPRT, 350 Unidades tirosina/ml) para solubilizar y despolimerizar proteínas, y amiloglucosidasa (E-AMGDF, 200 p-NP- β maltósido Unidades/ml) para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa. Posteriormente las muestras fueron tratadas con etanol 96 % para precipitar la fibra soluble y eliminar la proteína despolimerizada y la glucosa (proveniente del almidón). Cada residuo se filtró; se lavó con etanol 78 %, etanol 95 % y acetona, se secó, y finalmente se pesó.

Para cada muestra, a uno de los residuos de fibra se le determinó el contenido de cenizas incinerando la muestra a 550 °C, y al otro se le determinó contenido de proteínas por el método de Kjeldahl descrito previamente. La fibra dietaria total se calculó como el peso de la fibra dietaria filtrada y seca al que se le descontaron los contenidos de proteínas y cenizas. Se expresó en g/100 gbs.

1.3.3.3 Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante

1.3.3.3.1 Obtención de extractos

Para obtener los extractos se colocaron 0,5 g de cada harina en contacto con 5 ml de mezcla acetona/agua (80:20, v/v) como solvente (Xu y Chang, 2007), se agitaron 3 h a temperatura ambiente, se dejaron en reposo 18 h al resguardo de la luz y centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min (Centrífuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Se removieron y reservaron los sobrenadantes, y los residuos obtenidos fueron nuevamente puestos en contacto con otros 5 ml de solvente, repitiendo todo el proceso descrito. Ambos sobrenadantes fueron combinados y almacenados a -20 °C en oscuridad hasta realizar las determinaciones. De cada harina se obtuvieron los extractos por duplicado.

1.3.3.3.2 Determinación del contenido de polifenoles totales

El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Munteanu y Apetrei, 2021). El reactivo de FC utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción que no es específico para fenoles. El ensayo de FC mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo (IV) y el reductor (Huang *et al.*, 2005). El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstosfosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstosfosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco *et al.*, 2009).

Los compuestos polifenólicos totales (CPT) presentes en las harinas de legumbres fueron determinados por el método de FC utilizando ácido gálico (AG) como patrón. Se mezclaron 300 µl de cada extracto con 3 ml de Na₂CO₃ 2% p/v en NaOH 0,1 N y se dejaron 2 min en oscuridad. Luego, se agregaron 300 µl de solución de reactivo FC en agua (1:1) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente también en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 725 nm utilizando un espectrofotómetro (T60 Vis Spectrophotometer, PG Instruments, Reino Unido) y agua destilada como blanco. Los CPT se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de harina (mg EAG/g harina) utilizando la curva de calibración correspondiente.

1.3.3.3 Capacidad antioxidante

No existen métodos mundialmente unificados para medir capacidad antioxidante, en parte, debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas. Por lo tanto, ningún método refleja por sí solo la “capacidad antioxidante total” de una muestra, puesto que este parámetro deberá expresar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas. Es por eso que se suelen combinar diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante en matrices complejas como los alimentos.

En los métodos clasificados como indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre metaestable, como por ejemplo en los métodos de DPPH y ABTS ampliamente utilizados, que se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio de color que puede ser detectado instrumentalmente.

Ambos métodos miden en forma diferente los compuestos antioxidantes. El ABTS^{•+} presenta baja selectividad, contrariamente a la reacción del DPPH[•] el cual no reacciona con todos los compuestos flavonoides (Brand-Williams *et al.*, 1995; Roginsky y Lissi, 2005), ni con moléculas de alto peso molecular, debido a un impedimento estérico a causa de su conformación estructural (Almeida *et al.*, 2011). Por lo tanto, se debe ser considerado en los resultados, que el DPPH[•] es más selectivo que el ABTS^{•+}.

El 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox) es un análogo del α -tocoferol soluble en agua. Es conocido por su alta capacidad antioxidante y por lo tanto es utilizado como compuesto de referencia (Oehlke *et al.*, 2011), principalmente para los métodos de DPPH y ABTS, comparando su capacidad de decoloración contra la que producen los compuestos antioxidantes presentes en el extracto, calculando así la capacidad antioxidante en términos del Trolox (Arts *et al.*, 2004).

Método de DPPH

La técnica se basa en la reacción de compuestos con supuesta actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH[•]) en una solución metanólica. La forma estable del DPPH[•] (violeta) absorbe a una longitud de onda de 515 nm; al ser reducido por un compuesto antioxidante u otra especie radicalaria su absorción disminuye (cambiando al amarillo), representando la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado. En este estudio se usó el protocolo de Brand-Williams *et al.* (1995) con modificaciones. Se empleó como solvente y medio de reacción etanol (96 %) en lugar de metanol ya que diversos autores (Górnaś, 2015; Chaieb *et al.*, 2011) demostraron que no existían mayores diferencias entre ambos solventes y el uso de etanol sería ecológicamente más favorable que el metanol.

Una alícuota de 0,1 ml de los extractos de harinas o sus diluciones se mezcló con 3,9 ml de DPPH[•] disuelto en etanol (25 mg DPPH[•]/ l). La absorbancia se determinó a 515 nm después de 5 h (tiempo definido previamente a partir del estudio de la cinética de la reacción) en oscuridad.

Se realizó una curva de calibración con Trolox y la capacidad antioxidante se expresó como μ moles equivalentes de Trolox (ET)/g de harina.

Método de ABTS

La capacidad antioxidante se determinó también mediante un ensayo de decoloración del radical catiónico cromóforo 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) según la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999). Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+} debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical ABTS^{•+} fue producido tras incubar en la oscuridad una disolución acuosa de ABTS^{•+} (7 mM) con

persulfato potásico (2,45 mM) durante 16 h a 25 °C. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción), utilizando un espectrofotómetro (T-60 Vis Spectrophotometer, PG Instrument, Reino Unido).

Una alícuota de 0,1 ml de los extractos de harinas o sus diluciones se mezcló con 3,9 ml de la solución de trabajo de ABTS^{•+}. La absorbancia se determinó a 734 nm después de 180 min (tiempo definido previamente a partir del estudio de la cinética de la reacción) en oscuridad. Se realizó una curva de calibración con Trolox y se expresaron los resultados como μ moles equivalentes de Trolox (ET)/g de harina.

1.3.4 Propiedades funcionales

1.3.4.1 Capacidad de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite

La determinación de la capacidad de absorción de agua (CAA) y la capacidad de absorción de aceite (CAAc) fueron realizadas según el método de Ferreira *et al.*, (2018). En tubos tipo Falcon de 50 ml se colocaron aproximadamente 2 g de harina y 20 g de agua destilada o aceite de girasol según corresponda. Se mezclaron con vórtex por 2 min, se dejaron en reposo por media hora y se centrifugaron por 20 min a 3000 g (Hermle Z 326 k, Wehingen, Alemania). Posteriormente se realizó el drenaje del líquido no absorbido dejando los tubos inclinados por 15 min y retirando el excedente con papel absorbente. Se pesaron los tubos y se determinaron los pesos de los sedimentos. Los resultados de CAA o CAAc se expresaron como g agua/g harina o g aceite/g harina, respectivamente.

1.3.4.2 Actividad emulsificante y estabilidad de emulsión

Las propiedades emulsificantes se pueden evaluar generalmente a través de dos índices, la actividad y la estabilidad emulsificantes. La actividad emulsificante (AE) mide la cantidad de aceite que la harina puede emulsificar, mientras que la estabilidad de emulsión (EE) mide la habilidad de la emulsión para resistir cambios en su estructura en un periodo de tiempo determinado (Boye *et al.*, 2010a). Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

Se utilizó la metodología de Yasumatsu *et al.* (1972) con modificaciones. En tubo para centrífuga de 50 ml se suspendió 1 g de harina en 15 ml de agua destilada con

homogenizador (20000 rpm, 20 s, Ultra-Turrax T25, IKA-Werke, Alemania), se adicionaron 15 ml de aceite de girasol y se emulsificaron a 20000 rpm durante 90, y finalmente se centrifugó a temperatura ambiente a 750 g por 5 min en centrífuga refrigerada (Hermle modelo Z326 K, Wehingen, Alemania).

La actividad emulsificante se calculó empleando la siguiente expresión:

$$\text{Actividad emulsificante (\%)} = \frac{\text{altura de la capa emulsificada}}{\text{altura del contenido total del tubo}} \times 100 \quad \text{Ec. 1.1}$$

Para la medida de la estabilidad, la emulsión preparada siguiendo los pasos anteriores, se colocó en un baño termostático de agua a 80 °C calentándose por 30 min, luego se enfrió con agua fría bajo canilla (15 min) y se centrifugó a 750 g por 5 min.

La estabilidad de emulsión se calculó empleando la siguiente expresión:

$$\text{Estabilidad de emulsión (\%)} = \frac{\text{altura de la capa emulsificada remanente}}{\text{altura del contenido total del tubo}} \times 100 \quad \text{Ec. 1.2}$$

1.3.4.3 Concentración mínima de gelificación

La Concentración Mínima de Gelificación (CMG, %) se definió como la menor concentración de harina necesaria producir la gelificación. Se determinó según Sathe *et al.* (1982) realizando suspensiones de harina en 5 ml de agua destilada de manera de obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 % (p/v). Los tubos conteniendo las suspensiones se calentaron 1 h en baño de agua hirviendo, y luego se enfriaron en agua fría bajo canilla (10 min) para luego llevar a heladera por 2 h. Transcurrido este tiempo, la CMG se determinó como la mínima concentración a la que los tubos ensayados se invirtieron y la muestra no se deslizó.

1.3.4.4 Propiedades de *pasting*

Las propiedades de *pasting* (o de empaste) de las harinas comerciales fueron estudiadas a través de los ensayos descritos por Felker *et al.* (2018) con modificaciones, utilizando un reómetro (Haake RS600, ThermoGap, Alemania) con una

unidad de control de temperatura (K-15 Haake, 23 Thermoelectron, Alemania). Se realizaron dispersiones de cada una de las harinas en agua (10 g/100 ml), se dejaron hidratar por 30 min y se obtuvieron sus perfiles de viscosidad utilizando un sensor de platos paralelos rugosos (diámetro 35 mm con abertura de 1 mm). Las muestras fueron constantemente agitadas a 2800 rpm durante el transcurso de todo el ensayo. Luego de equilibrar a 50 °C por 1 min, las muestras fueron calentadas de a 6 °C/min hasta 95 °C, mantenidas a esa temperatura por 5 min, y luego enfriadas de a 6 °C/min hasta 50 °C. Para minimizar la posible deshidratación de las muestras, éstas fueron recubiertas con una fina capa de silicona. Cada muestra fue ensayada por triplicado.

1.3.5 Análisis estadístico

Procedimientos estadísticos tales como análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones pareadas de medias se llevaron a cabo mediante el software Infostat v2009 (Infostat 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó el ensayo de Tukey para estudiar las comparaciones pareadas de medias. Las diferencias entre medias y ensayos F se consideraron significativas cuando las probabilidades estimadas fueron inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Los resultados experimentales se informaron como valor medio y error estándar de la media entre paréntesis.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Caracterización física de harinas de legumbres comerciales

En la **Tabla 1.1** se presentan los resultados obtenidos para la densidad aparente de las harinas de legumbres comerciales.

Tabla 1.1. Densidad aparente de harinas de legumbres comerciales.

	Harinas de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
Densidad aparente (g/ml)	0,86 ^a (0,02)	0,59 ^c (0,02)	0,75 ^b (0,02)	0,70 ^b (0,02)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados para la **densidad aparente** estuvieron dentro del rango de 0,59 a 0,86 g/ml. Los valores más bajos correspondieron a la harina de garbanzos, mientras que los más altos fueron para la de arvejas, no encontrándose diferencias significativas entre las densidades aparentes de harinas de lentejas y de porotos ($P > 0,05$). Un menor valor de densidad aparente, estaría relacionado con la morfología de las partículas y con el mayor grado de empaquetamiento que experimentan (Triñanes, 2010).

La evaluación de la densidad aparente aportaría información útil para el análisis de la transferencia de calor, control de calidad, y evaluación, cálculo y diseño de sistemas de transporte, limpieza y clasificación, ya que el volumen ocupado tiene un alto impacto en el manejo de estos procesos y en sus costos (Vilchis Velazquez, 2019). También, la densidad aparente podría ser usada para determinar los requerimientos de envasado y está relacionada con la carga que la muestra puede soportar si se colocan directamente una sobre otra (Wani y Kumar, 2014).

Estos resultados indicarían que la harina de arvejas fue más pesada que el resto, por lo que tendría menos costos de embalaje dado que ocuparía menos espacio por unidad de peso. Además, una elevada densidad aparente indicaría que podría funcionar como buen espesante en alimentos y sería adecuada a productos procesados (Ratnawaki *et al.*, 2019), además se ha encontrado que harinas con valores mayores de densidad aparente se dispersan más fácilmente (Appiah *et al.*, 2011). Por el contrario, la baja densidad aparente encontrada en la harina de garbanzos indicaría que fue más liviana que las otras, siendo entonces apropiada para productos destinados a ser introducidos durante la alimentación complementaria de infantes (menores a 12 meses), de densidad energética alta pero de consistencia adecuada para la edad (McCarthy *et al.*, 2016; Ojinnaka *et al.*, 2013).

El **tamaño de las partículas** es un parámetro que influye tanto en las propiedades de las harinas como así también en el producto final donde son incorporadas (Ahmed *et al.*, 2016). Las partículas sólidas pueden sufrir aglomeración y agregación como consecuencia de fenómenos físicos y químicos que provocan la adhesión y unión entre sus superficies, influyendo en la determinación de manera significativa debido a que los aglomerados son medidos como una sola partícula. El ultrasonido es una herramienta fiable para destruir los aglomerados, ya que la colisión de partículas entre sí con la gran fuerza impartida por el ultrasonido, puede provocar la fragmentación de los aglomerados presentes (Kumar *et al.*, 2013).

En la **Figura 1.2** se muestran las distribuciones de tamaños de partículas obtenidas para las harinas comerciales y para las mismas harinas después del sonicado (**Figura 1.2 a y b**, respectivamente) y en la **Tabla 1.2** se presentan los parámetros obtenidos del análisis de las mismas.

Según Pelgron *et al.* (2013) en harinas de legumbres las poblaciones de partículas a tamaño pequeños (entre 2 y 5 μm) corresponderían a agregados proteicos, las poblaciones de tamaños mayores (alrededor de 30 μm) a gránulos de almidón, mientras que restos de fragmentos de paredes celulares tendría una amplia variedad de tamaños (desde pocas micras a tamaños por encima de los 40 μm).

Según los resultados obtenidos para las harinas sin sonicar (**Figura 1.2a**), tanto la de porotos como la de garbanzos presentaron distribuciones de tamaños de partículas concentradas en una población principal, con máximos en 36 y 27 μm , respectivamente, y poblaciones más pequeñas a tamaños mayores, que podrían estar asociadas a restos de paredes celular. Mientras que las harinas de arvejas y lentejas presentaron dos poblaciones bien definidas con máximos en 31 y 457 μm , y en 26 y 276 μm , respectivamente. Mientras que las poblaciones principales ubicadas en máximos aproximados a 30 μm corresponderían a los gránulos de almidón. Todas las harinas evaluadas también presentaron poblaciones más pequeñas a diámetros pequeños, entre 1 y 3 μm , relacionados posiblemente a agregados proteicos.

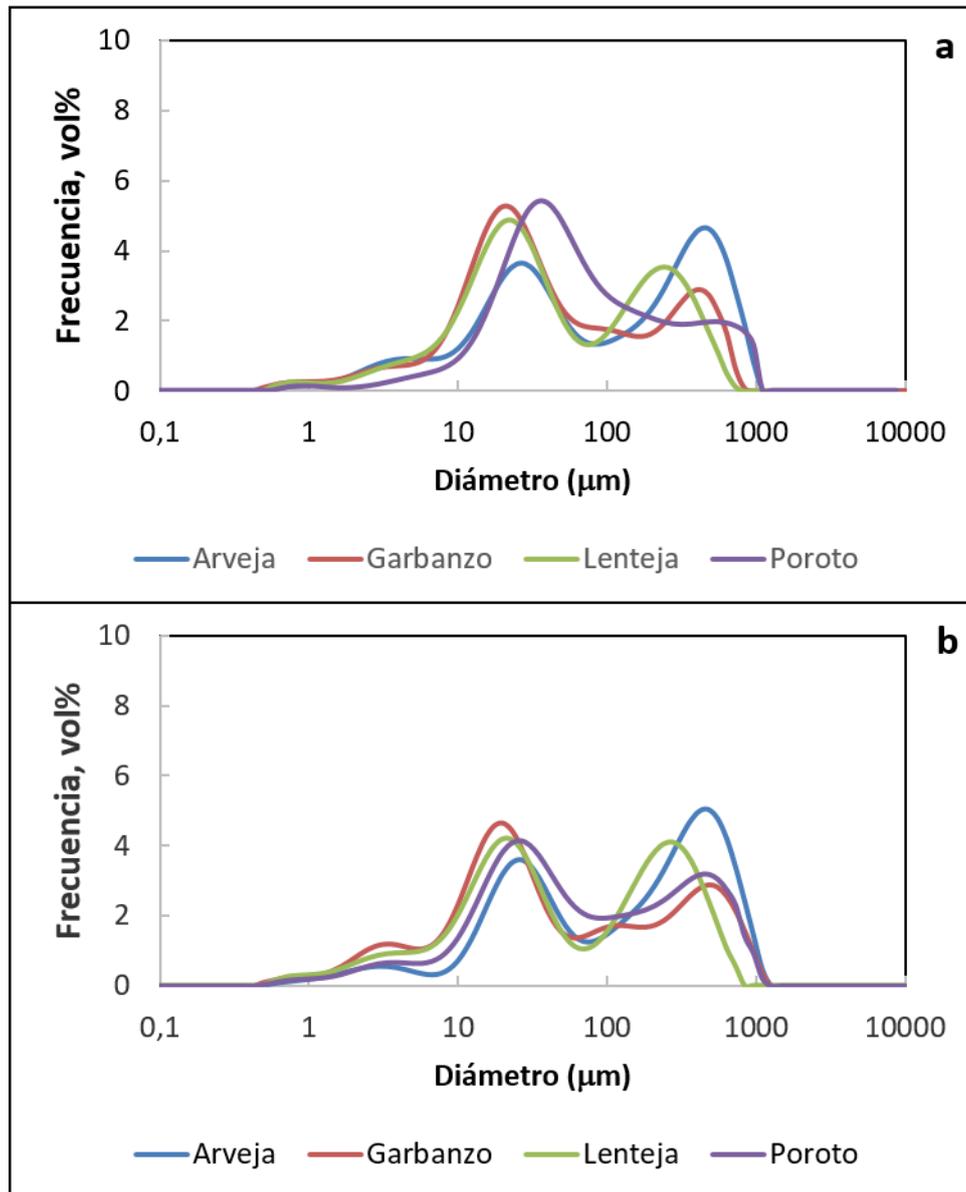


Figura 1.2. Distribución de tamaños de partículas para: **(a)** harinas de legumbres comerciales, **(b)** harinas de legumbres comerciales sonicadas.

Tabla 1.2. Percentiles D10, D50 y D90 para las distribuciones de tamaños de partículas de harinas de legumbres comerciales antes y después del sonicado.

Harinas de legumbres	Diámetro de partícula (μm)					
	Antes del sonicado			Después del sonicado		
	D10	D50	D90	D10	D50	D90
Arvejas	15,7 ^a (0,3)	182 ^a (2)	613 ^a (3)	9,4 ^b (0,2)	165 ^a (7)	642 ^a (3)
Garbanzos	9,7 ^c (0,7)	31,9 ^c (0,7)	321 ^c (9)	6,6 ^c (0,4)	31 ^c (1)	467 ^b (9)
Lentejas	7,9 ^d (0,3)	36 ^c (1)	339 ^{bc} (5)	5,21 ^c (0,2)	103 ^b (6)	465 ^b (8)
Porotos	14,7 ^b (0,1)	49,6 ^b (0,7)	407 ^b (6)	16,3 ^a (0,4)	98 ^b (3)	574 ^{ab} (8)

Medias con distinto superíndice en una misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0,05$). Todos los resultados se expresaron en función del volumen acumulado. D10: diámetro tal que el 10 % de la muestra está compuesta de partículas con un diámetro menor que este valor. D50: diámetro tal que el 50 % de la muestra está compuesta de partículas con un diámetro menor que este valor. D90: diámetro tal que el 90 % de la muestra está compuesta de partículas con un diámetro menor que este valor.

Cuando los percentiles de las distribuciones de tamaños de las partículas fueron calculados (**Tabla 1.2**) se observó que la harina de arvejas presentó valores de D50 y D90 mayores (3-5 y 1-1,5 veces, respectivamente) que para las demás harinas.

Luego del sonicado (**Figura 1.2 b**), para la harina de arvejas no se observaron modificaciones significativas en la distribución de tamaños. Se continuaron observando dos poblaciones principales, con máximos levemente corridos, la primera a 23 μm y la segunda a 478 μm . Respecto a la harina de porotos, se observó un gran aumento en la población a diámetros mayores, dando como resultados dos poblaciones principales centradas en 25 μm y 470 μm , máximos similares a la distribución de la harina de arvejas. Para la harina de lentejas, la primer población no se modificó sustancialmente respecto al diámetro máximo, pero si se produjo una disminución en su frecuencia. Mientras que la segunda población principal, se corrió a valores mayores (275 μm) y aumentó su frecuencia. Por último, para la harina de garbanzos se observaron poblaciones con gran variación de tamaño, con dos poblaciones principales centradas en 20 μm y 480 μm y otras dos minoritarias a 3 μm y 105 μm .

A pesar que, en general el sonicado provoca la fragmentación de aglomerados presentes en una muestra, por los resultados obtenidos para algunas de las harinas sonicadas (de lentejas y porotos) donde se observó un aumento del tamaño de las partículas presentes, en estos sistemas causaría una posible agregación. Wang *et al.* (2020) lo han adjudicado al fenómeno de cavitación ocurrido y su impacto sobre la estructura de los gránulos de almidón, que en algunos casos provocaría la agregación

de los mismos. Este efecto sería dependiente de la potencia y frecuencia de sonicación, temperatura y tiempo de tratamiento, propiedades de la dispersión de almidón, concentración, así como su origen botánico (Romero *et al.*, 2016). Por ello, los resultados encontrados en harinas sonicadas resultan diferentes para distintas legumbres.

Los **parámetros de color** determinados sobre las distintas harinas de legumbres pueden observarse en la **Tabla 1.3**. Esta característica es una de las más importantes al momento de seleccionar un ingrediente destinado a ser incorporado en un alimento ya que tiene una relación directa con la aceptabilidad del producto final (Shariati-Ievari *et al.*, 2016).

Tabla 1.3. Parámetros de color de harinas de legumbres comerciales.

	Harina de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
L	82,6 ^c (0,2)	92,6 ^a (0,2)	85,3 ^b (0,6)	95,9 ^a (0,6)
a*	-5,51 ^c (0,04)	-0,63 ^b (0,04)	-0,7 ^b (0,1)	-0,01 ^a (0,01)
b*	22,9 ^a (0,1)	15,1 ^b (0,2)	13,8 ^c (0,3)	7,7 ^d (0,3)
Colores representados por los parámetros colorimétricos				

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores de luminosidad, L^* , fueron mayores para las harinas de garbanzos y porotos, mientras que los parámetros a^* y b^* variaron de manera opuesta entre sí: el menor valor de a^* se observó para la harina de arvejas (color verdoso) y el más alto para la de porotos, mientras que b^* varió del más amarillento (mayor valor de b^*) en harina de arvejas al menor en la de poroto. Estas diferencias en los parámetros de color entre las harinas estarían determinadas por los diferentes tipos y proporción de carotenoides (pigmentos liposolubles, que presentan colores amarillos, naranja y rojos) y flavonoides (pigmentos hidrosolubles, con colores naranjas, rojos o azules) presentes en cada tipo de legumbre que hacen que sus harinas presenten diferencias en color, como puede observarse en los colores representados en la **Tabla 1.3**.

1.4.2 Caracterización química de harinas de legumbres comerciales

En la **Tabla 1.4** se presentan los resultados obtenidos para el pH y la composición proximal de las harinas de legumbres comerciales.

Tabla 1.4. Composición proximal (expresada en base seca, bs) y pH de harinas de legumbres comerciales.

	Harina de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
Proteínas (g/100 gbs)	23,3 ^a (0,1)	16,8 ^c (0,3)	23,6 ^a (0,3)	19,5 ^b (0,1)
Fibra Dietaria Total (g/100 gbs)	17,41 ^b (0,1)	13,1 ^c (0,1)	17,8 ^b (0,5)	20,40 ^a (0,3)
Cenizas (g/100 gbs)	3,38 ^b (0,01)	2,53 ^c (0,01)	3,35 ^b (0,05)	4,1 ^a (0,1)
Lípidos (g/100 gbs)	2,43 ^b (0,07)	5,22 ^a (0,01)	1,6 ^c (0,3)	1,21 ^c (0,02)
Carbohidratos disponibles (g/100 gbs)	53,50	62,27	53,66	54,73
pH	6,75 ^a (0,02)	6,21 ^c (0,01)	6,02 ^d (0,04)	6,42 ^b (0,01)

Humedad (%): 13,28^a±0,01 para harina de arvejas, 11,90^b±0,03 para harina de garbanzos, 11,75^b±0,01 para harina de lentejas y 8,78^c±0,01 para harina de porotos. Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas (P < 0,05).

Las dispersiones de harina presentaron valores de **pH** entre 6,02 - 6,75 (**Tabla 1.4**), concordando con resultados encontrados por otros autores para harinas de legumbres (Aguilera Gutierrez, 2010).

El contenido de **humedad** varió entre 8,78 % para la harina de porotos y 13,28 % para la de arvejas, presentando las demás harinas valores intermedios. El mayor contenido de humedad en la harina de arvejas podría estar relacionado con el mayor tamaño de partícula (**Tabla 1.2**) dado que se ha descrito para harinas de legumbres que partículas más grandes serían capaces de retener mayor contenido de agua que las más pequeñas (Borsuk *et al.*, 2012)

Todas las harinas ensayadas presentaron altos contenidos de **fibra dietaria total** (> 13,1 %), siendo mayor para la harina de porotos (20,40 %).

Los contenidos de **cenizas** fueron muy similares en todas las harinas de leguminosas estudiadas presentando diferencias significativas entre ellas, variando entre 2,53 – 4,1 g/100 gbs. Estos valores resultaron muy próximos a los obtenidos por El Tinay *et al.* (1989) en garbanzos, lentejas y porotos blancos, y por Iqbal *et al.* (2006) en garbanzos, lentejas y arvejas.

Se encontró una correlación positiva entre el contenido de cenizas y el de fibra dietaria total ($R= 0,941$, $P < 0,001$), lo que estaría relacionado a la presencia de tegumentos en las harinas ya que ambos componentes se encuentran principalmente en ellos.

El **contenido proteico** de las harinas de legumbres reflejaron valores medios en torno al 20 g/100 gbs, siendo mayores en las de arvejas y lentejas (> 23 gbs), seguidos por la de porotos (19,5 g/100 gbs) y por último la de garbanzos (16,8 g/100 gbs). Estos niveles estuvieron en concordancia a los encontrados en legumbres por otros autores (Boye *et al.*, 2010a; Du *et al.*, 2014; Erbersdobler *et al.*, 2017), confirmando sus potencialidades como fuentes proteica alimentarias.

El contenido de **lípidos** en todas las harinas fue bajo y varió significativamente entre la mayoría de ellas, siendo el contenido mayor para la harina de garbanzos.

En lo que se refiere al contenido de **carbohidratos totales disponibles** (suma de mono y disacáridos y almidón, el cual sería el principal componente (Zou *et al.*, 2007; Aguilera Gutiérrez, 2010), variando entre 53,50 – 62,27 g/100 gbs, siendo mayor para la harina de garbanzos.

Los contenidos de compuestos polifenólicos totales (CPT) y capacidad antioxidante de las harinas de legumbres se presentan en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5. Compuestos polifenólicos totales (CPT) y capacidad antioxidante evaluada mediante métodos DPPH y ABTS sobre harinas de legumbres comerciales.

	Harinas de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
CPT (mg EAG/g)	2,7 ^b (0,1)	2,1 ^b (0,4)	9,8 ^a (0,5)	2,10 ^b (0,03)
DPPH (μmol ET/g)	2,1 ^b (0,1)	1,3 ^b (0,1)	61,6 ^a (0,9)	2,5 ^b (0,2)
ABTS (μmol ET/g)	13,2 ^b (0,1)	12,1 ^b (0,3)	149,3 ^a (0,9)	11,5 ^b (0,8)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$). Todos los resultados se expresan por gramo de harina.

La harina de lentejas presentó el mayor **contenido de CPT**, tres veces mayor que para el resto de las harinas, no encontrándose diferencias significativas entre éstas ($P > 0,05$). Similares resultados fueron encontrados para lentejas por Xu *et al.* (2007) y por

Campos-Vega *et al.* (2010), quienes lo relacionaron con la alta pigmentación de las semillas.

Los compuestos polifenólicos pueden ser clasificados en ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y estilbenos en base al número de grupos hidroxilos unidos al anillo fenólico y elementos estructurales que unen los anillos de benceno (Singh *et al.*, 2016). La distribución de estos compuestos no es homogénea en las semillas, ya que las capas externas suelen contener grandes concentraciones, mientras que su concentración es considerablemente menor en el endosperma (Dueñas *et al.*, 2003; Dueñas *et al.*, 2004; Shahidi *et al.*, 2001). Sin embargo, esta distribución es incluso diferente entre las diversas legumbres. En las lentejas existen compuestos fenólicos no flavonoides (como ácido hidroxibenzoico o hidroxicinámico), tanto libres como como combinados, en los cotiledones (Dueña *et al.*, 2002), mientras que flavonoides (como glicósidos de flavonoles y flavones) han sido identificados en las cubiertas externas, junto a trans-resveratrol-3-O-glucosídico, y altas concentraciones de procianidinas (Dueñas *et al.*, 2002 y 2003). Una distribución similar fue reportada para arvejas (Troszynska y Ciska, 2002; Dueñas *et al.*, 2004). En garbanzos, las principales diferencias entre endosperma y capas externas se observó para el contenido de polifenoles y taninos, mientras que la diferencia en el contenido de flavonoides fue menor, pero estadísticamente diferente (Sreerama *et al.*, 2010). Respecto a los compuestos polifenólicos, en las capas externas se encuentran los mayores niveles de flavonoles, como quercetina, kaempferol y miricetina. Mientras que el cotiledón resultaría con mayor contenido de derivados del ácido benzoico y del cinámico. Respecto a porotos, en variedades blancas el contenido de polifenoles fue bajo en comparación con las variedades coloreadas (Ombra *et al.*, 2016). Incluso, en algunas variedades no se han identificado compuestos de tipo flavonoides (Lin *et al.*, 2008).

Por ello, el contenido de CPT de las harinas depende, además del tipo de legumbre considerado, de si se emplea grano con cubiertas o no para su procesamiento.

Se ha demostrado que los antioxidantes presentes en la naturaleza presentan efectos benéficos para la salud relacionado con enfermedades degenerativas y disminuyendo el efecto nocivo de agentes tóxicos (Mishra *et al.*, 2012). Los compuestos fenólicos, por sus características estructurales, tienen la facilidad de captar radicales libres, propiedad que les otorga capacidad antioxidante. En general,

esta capacidad es proporcional al contenido de compuestos fenólicos presentes en extractos obtenidos a partir de distintas muestras (Amarowicz *et al.*, 2005; Shahidi y Naczk, 2003). Conforme a los resultados presentados en la **Tabla 1.5**, la harina de lentejas, que presentó el mayor contenido de CPT, también presentó los mayores valores para la **capacidad antioxidante** evaluada por ambos métodos, mientras que para el resto de las harinas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas; por lo tanto, la harina de lentejas sería una mejor fuente de compuestos bioactivos respecto a las demás harinas. Resultados similares fueron informados por Xu y Chang (2007) y por Ladjal y Mohamed (2015), en donde las variedades de lentejas analizadas presentaron mayores valores de CPT, resultando en mayores valores para la capacidad antioxidante.

1.4.3 Propiedades funcionales de harinas de legumbres comerciales

El conocimiento de las propiedades funcionales, tales como capacidad de absorción de agua así como aquellas ligadas a la afinidad por componentes lipídicos, es de gran utilidad para la industria de los alimentos debido a que durante su elaboración y/o procesamiento se pueden producir modificaciones que deben tenerse en cuenta en función del destino final del producto y de las condiciones de comercialización. Las propiedades de hidratación, entre las que se destaca la capacidad de absorción de agua (CAA), tienen un rol importante en el proceso de elaboración de los alimentos debido a sus efectos sobre otras propiedades funcionales y sensoriales. Además, las posibilidades de la aplicación de harinas como ingredientes alimentarios dependen, en gran medida, de su interacción con el agua.

Los resultados obtenidos para las diferentes propiedades funcionales estudiadas se presentan en la **Tabla 1.6**.

Tabla 1.6. Propiedades funcionales (capacidad de absorción de agua (CAA), actividad emulsificante (AE), estabilidad de emulsión (EE), y concentración mínima de gelificación (CMG)) de harinas de legumbres comerciales.

	Harina de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
CAA (g agua/g)	0,99 ^d (0,03)	1,24 ^c (0,02)	1,87 ^a (0,01)	1,59 ^b (0,02)
CAAc (g aceite/g)	0,84 ^a (0,05)	0,79 ^a (0,01)	0,82 ^a (0,05)	0,79 ^a (0,05)
AE (%)	67 ^a (0,01)	49 ^b (0,05)	71 ^a (0,02)	66 ^a (0,04)
EE (%)	68 ^a (0,03)	51 ^b (0,04)	73 ^a (0,03)	62 ^{ab} (0,01)
CMG (% p/v)	18	8	16	14

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos para la **CAA** de las harinas (**Tabla 1.6**) variaron entre 0,99 y 1,87 g agua/g harina, siendo el mayor para la harina de lentejas y casi duplicando al menor valor que correspondió a la harina de arvejas.

La CAA es la mayor cantidad de agua que la harina puede absorber y retener (Ijartimi y Keshinro, 2012), según Farooq y Boye (2011) depende de las concentraciones de proteína, fibra y almidón presentes. Sin embargo, debido a la diversidad en el tipo de macrocomponente entre legumbres, otros factores además de la concentración, deben ser considerados. Por ejemplo, el tipo y tamaño de las partículas de fibra podrían influir en las propiedades de hidratación de las harinas. La composición aminoacídica de las proteínas es también igualmente importante en la absorción de agua (Sreerama *et al.*, 2012). Se han encontrado valores de CAA similares para concentrados de proteína de legumbres y los encontrados para las correspondientes harinas (Boye *et al.* 2010a) indicando que los residuos aminoacídicos tendrían mayor influencia en los resultados en comparación con la cantidad de proteína, coincidiendo con Kaur y Singh (2005). Respecto al almidón, éste tiene la capacidad de unir agua, y se han encontrados valores significativos de CAA en muestras de almidón, aún a temperatura ambiente (Abu *et al.*, 2006; Sirivongpaisal, 2008; Wani *et al.*, 2010).

Asimismo, según Wang y Flores (2000), la distribución de tamaños de partículas de una harina tendría cierta influencia en sus propiedades funcionales. En general, cuanto menor es el tamaño de una partícula, mayor es su área superficial y mayor su CAA (Farooq y Boye, 2011). Considerando los D50 de las harinas estudiadas (**sección 1.4.1**), el cual podría considerarse como el tamaño medio de las partículas, se observó que

aquellas harinas que presentaron menores tamaños (de garbanzos, lentejas, porotos) resultaron con mayores valores de CAA, con algunas diferencias entre ellas, mientras que para la harina de arvejas con un D50 significativamente mayor, su CAA resultó en el valor más bajo.

Por lo tanto, las variaciones de CAA encontradas entre las distintas harinas podrían explicarse no sólo por la diferente proporción de componentes entre ellas sino también por el tipo de macrocomponente presente y por los diferentes tamaños de las partículas resultado de la molienda.

En la evaluación de la **capacidad de absorción de aceite** (CAAc), el mecanismo involucra el atrapamiento físico de este. Por lo tanto, el tamaño de las partículas, la composición de las harinas, el contenido de humedad y la microestructura son algunos de los factores que pueden afectar los resultados.

El componente principal relacionado con esta propiedad son las proteínas, compuestas tanto de residuos hidrofílicos como hidrofóbicos, donde cadenas laterales no polares de aminoácidos pueden interactuar con las cadenas hidrocarbonada de los lípidos. Por lo tanto, en la CAAc influirán tanto el perfil aminoacídico de las proteínas como la disposición de los aminoácidos (Wani *et al.*, 2013).

Además, esta propiedad podría estar influenciada por el tipo de lípido y la presencia de almidón (Kinsella, 1979; Lazou y Krokida, 2010), afectando los resultados.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la CAAc entre las harinas de legumbres estudiadas ($P < 0,05$) (**Tabla 1.6**) obteniéndose un valor medio de 0,81 g aceite/g harina. Resultados similares fueron descriptos para harinas de lentejas roja y verde (0,7 – 0,8 g/g) (Der, 2010); para harinas de garbanzos tipo Desi y Kabuli (0,78 – 0,88 g/g) (Sanjeewa *et al.*, 2010) y para harinas de porotos (0,97 g/g) (Du *et al.*, 2014).

Esta habilidad para absorber y retener agua y/o aceite de las harinas podría ayudar a mejorar la capacidad de unión, favorecer la retención de *flavor*, mejorar el *mouthfeel* y reducir las pérdidas de humedad y/o grasa de en el desarrollo de productos híbridos (Fiorentini *et al.*, 2020).

Las propiedades de emulsificación de las harinas de legumbres fueron evaluadas a partir de la determinación de la **actividad emulsificante** (AE) y la **estabilidad de**

emulsión (EE). La AE mide la capacidad de las proteínas y otras moléculas con actividad interfacial presentes en la harina de absorberse en la interface aceite/agua y contribuir con la formación de la emulsión (Lin y Fernández-Fraguas, 2020), mientras que otros componentes de naturaleza no proteica como almidón y fibra podrían mejorar la EE aumentando la viscosidad de la fase continua y actuando como barrera entre las gotas evitando su coalescencia (Ma *et al.*, 2011). Asimismo, se han descrito mayores AE para harinas de legumbres en comparación con sus respectivos aislados proteicos atribuyéndolo a que la fibra presente formaría un film interfacial mixto más fuerte, en conjunto con las proteínas (Boye *et al.*, 2010a; Lam y Nickerson, 2013).

Los resultados obtenidos tanto para la AE como para la EE de las harinas pueden observarse en la **Tabla 1.6**. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para la AE entre las harinas, a excepción de la AE para la harina de garbanzos, que presentó un valor menor al resto, probablemente asociado a su contenido lipídico mayor. Mientras que la EE que resultó menor para las harinas de garbanzos y porotos.

En este tipo de sistemas complejos, la diferencia en el contenido total de proteínas (tanto solubles como insolubles) y sus características fisicoquímicas, como la hidrofobicidad y la carga, como así también otros componentes presentes, como el almidón y fibra, (Sikorski, 2001), pueden afectar los resultados obtenidos.

La capacidad de las harinas para **formar geles** es una propiedad funcional muy importante tanto en el procesamiento como en la formulación de alimentos. La gelificación ocurre cuando las proteínas y el almidón presentes forman una matriz o red tridimensional que se resiste a fluir bajo presión. La CMG depende de varios factores como el tipo y composición de la legumbre estudiada (Boye *et al.*, 2010a), la presencia/ausencia de grasa, la competencia entre proteínas y almidón por el agua (Singh, 2001), y de factores extrínsecos entre los que se pueden incluir fuerza iónica, pH, y temperatura (Gupta *et al.*, 2018). A menor CMG, mejores serían la habilidad de las proteínas para gelificar y la capacidad de hinchamiento de la harina (Kaushal *et al.*, 2012). De acuerdo al uso final previsto de la harina resultaría conveniente evaluar la CMG para lograr la calidad deseada del producto.

Los resultados para la CMG de las diferentes harinas se pueden observar en la **Tabla 1.6**. Las variaciones en los resultados, entre 8 % para obtener la gelificación con harina

de garbanzos y 18 % con harina de arvejas, pueden asociarse a las diferentes proporciones relativas de sus diferentes componentes como proteínas, hidratos de carbono y lípidos, y las interacciones entre los mismos (Aremu *et al.*, 2007). Particularmente, la harina de garbanzos es la que presentó mayor contenido de hidratos de carbono disponibles (**Tabla 1.4**), entre los que se encuentra el almidón, lo que estaría asociado al bajo valor de CMG, respecto a las demás harinas.

1.4.4 Propiedades de *pasting* de harinas de legumbres comerciales

En la **Figura 1.3** se muestran, a modo de ejemplo, perfiles de viscosidad aparente obtenidos para las harinas de arvejas, garbanzos, lentejas y porotos comerciales, mientras que en la **Tabla 1.7** se presentan los valores medios obtenidos para las temperaturas de *pasting* (T_p), viscosidad de pico o máxima a 95 °C (V_p) y viscosidad final o de pastas enfriadas (V_f).

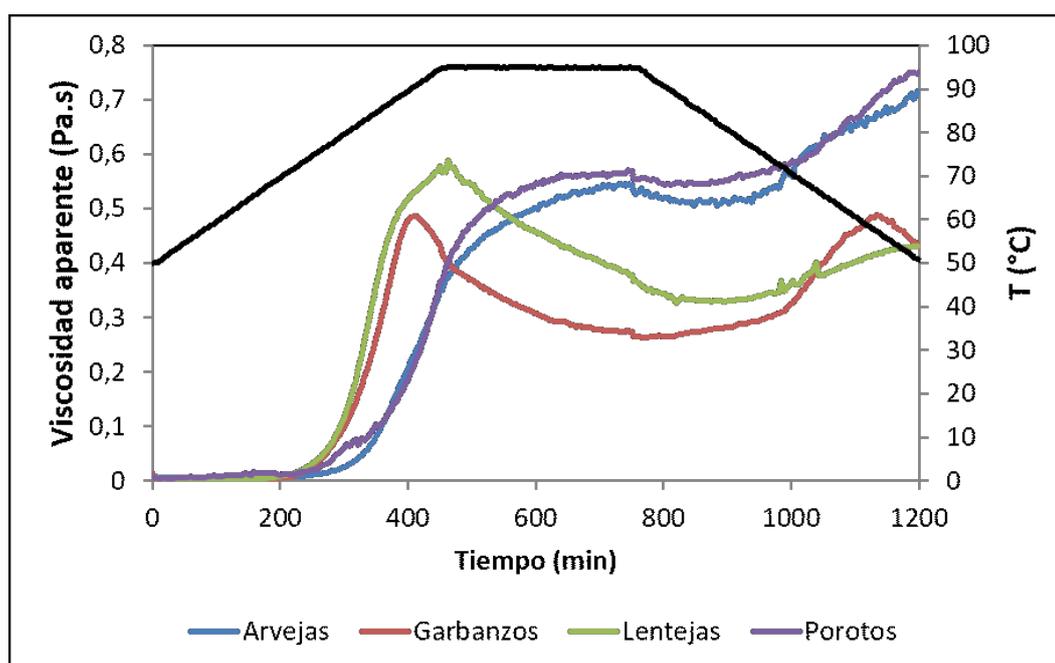


Figura 1.3. Curvas representativas de viscosidad aparente en función del tiempo de ensayo para harinas de legumbres comerciales.

Tabla 1.7. Propiedades de pasting de harinas de legumbres comerciales.

	Harinas de legumbres			
	Arvejas	Garbanzos	Lentejas	Porotos
Temperatura de <i>pasting</i>, T_p (°C)	78,8 ^a (1,1)	70,0 ^c (0,8)	68,7 ^c (0,1)	74,2 ^b (0,2)
Viscosidad de pico, V_p (Pa.s)	0,54 ^a (0,05)	0,55 ^a (0,05)	0,50 ^a (0,08)	0,57 ^a (0,01)
Viscosidad final, V_f (Pa.s)	0,66 ^a (0,04)	0,43 ^b (0,04)	0,38 ^b (0,04)	0,76 ^a (0,02)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Las harinas de legumbres comerciales mostraron **viscosidades aparentes iniciales** bajas asociadas a la dispersión de sus gránulos de almidón intactos en combinación con componentes de la fibra no hinchada y proteínas solubles, entre otras sustancias. Con el aumento de la temperatura y el tiempo de ensayo se observaron aumentos de las viscosidades aparentes relacionados con el hinchamiento de los gránulos de almidón y lixiviación de amilosa, así como con la absorción de agua de otros componentes de las harinas como proteínas y fibra, hasta alcanzar los valores de viscosidad máximos (V_p).

La **temperatura de *pasting*** (T_p) es la temperatura requerida por los gránulos de almidón para comenzar a hincharse (Ratnawati *et al.*, 2019). Las T_p de las harinas estuvieron comprendidas entre 68,7 y 78,8 °C (**Tabla 1.7**). Estas temperaturas resultaron superiores a T_p de harinas de cereales (de aproximadamente 65 °C), lo que podría atribuirse al mayor contenido de amilosa en los almidones de legumbres (Rebello *et al.*, 2014; Sharma y Gujral, 2010). Como ya se mencionó, los cereales, tubérculos y raíces generalmente tienen un contenido de amilosa de entre 15 % a 30 % (Hoover, 2001; Jane *et al.*, 1999), mientras que los almidones de legumbres pueden llegar a contener en promedio entre 30 y 40 %. Esta diferencia en contenido de amilosa le concede a las legumbres propiedades funcionales destacadas. Por otro lado, proteínas y almidón en legumbres forman una matriz citoplasmática muy organizada que dificulta el acceso del agua, el hinchamiento de los gránulos y la gelatinización, modulando incluso también su digestibilidad (Edwards *et al.*, 2015; Rovalino-Córdova *et al.*, 2019) por lo que, como se dijo, exhiben un hinchamiento restringido y bajo grado de lixiviación de amilosa. Las temperaturas de *pasting* observadas para las harinas estudiadas se corresponden a las temperaturas normalmente encontradas para las legumbres (Hoover *et al.*, 2010).

Al comparar la T_p entre las harinas se observó para la de arvejas una temperatura mayor (**Tabla 1.7**) lo que indicaría que su almidón fue más resistente al hinchamiento y rotura respecto al de las demás. Una mayor temperatura en almidones nativos reflejaría una mayor estabilidad interna del gránulo, normalmente asociada con una mayor presencia de zonas cristalinas y un mayor contenido de amilosa. Similares resultados fueron reportados por Tayade *et al.* (2019) quienes encontraron un mayor contenido de amilosa en almidón de arvejas respecto a otras legumbres. Diversos trabajos postulan que en los gránulos de almidón con alto contenido de amilosa, las cadenas pueden estar estrechamente empaquetadas dentro de los dominios amorfos. Esto podría resultar en fuertes interacciones, a través de puente hidrógeno, entre cadenas adyacentes de amilosa. Por lo tanto, se necesitaría un alto aporte energético para romper estas interacciones (Hoover *et al.*, 2010). Esta limitación en el hinchamiento y absorción de agua podría estar relacionada con los valores hallados para la CAA y CMG de la harina de arveja (**Tabla 1.6**), la cual presentó menor CAA y mayor CMG respecto a las demás harinas. Por otro lado, las menores T_p encontradas para las harinas de garbanzos y lentejas, podrían ser consecuencia de una más rápida absorción de agua por sus gránulos de almidón respecto a las otras harinas. La hidratación del gránulo de almidón, como se mencionó, comienza en las regiones amorfas por lo que almidones con mayor cantidad de estas zonas absorben agua más rápidamente (Martínez *et al.*, 2014). Por lo tanto, las harinas de garbanzo y lentejas podrían tener almidones con mayor proporción de estas regiones amorfas respecto a las otras evaluadas. Para la harina de porotos, los resultados encontrados fueron intermedios entre ambas situaciones.

Por lo tanto, la relación amilosa/amilopectina y la proporción de zonas cristalinas y amorfas de los gránulos de almidón de las distintas legumbres influirían en las temperaturas de pasting observadas y sus diferencias. Asimismo, diferencias entre variedades, procesamiento de las harinas, equipamiento y también método de análisis podrían influir en los resultados obtenidos (Ratnawati *et al.*, 2019). Temperaturas de *pasting* bajas indicarían que se requerirían menores temperaturas para cocinar el ingrediente por lo que se reduciría el costo energético de la preparación de un producto donde es incluido.

Cuando se evaluaron las **viscosidades de pico** (viscosidades a 95 °C) (**Tabla 1.7**), no se encontraron diferencias significativas entre las harinas, presentando un valor promedio de 0,54 Pa.s. Si bien las harinas presentaron diferencias en su composición proximal y probablemente en sus almidones, estas diferencias no se manifestaron en este parámetro. En harinas de legumbres, la interacción almidón-proteínas de la matriz podría inhibir el hinchamiento del gránulo de almidón y reducir la viscosidad, así como un elevado contenido de lípidos, ya que podría inhibir las interacciones entre moléculas de almidón limitando también el hinchamiento (Hamid *et al.*, 2015; Ratnawati *et al.*, 2019). Probablemente esto explicaría que no se observaran diferencias en la V_p entre harina de garbanzos (de menor contenido proteico pero mayor en lípidos) respecto a las demás (de menor contenido lipídico pero mayor contenido proteico).

Durante el período de mantenimiento a 95 °C con cizallamiento se observó un descenso en las viscosidades aparentes de las harinas de garbanzos y lentejas respecto a la viscosidad máxima, de entre 0,18 y 0,22 Pa.s, lo que demostraría una menor aptitud del almidón para el calentamiento y cizalla durante la cocción (Ratnawati *et al.*, 2019), respecto a las harinas de arvejas y porotos, para las cuales la caída fue significativamente menor y hacia el final de este período (**Figura 1.4**). Se han asociado bajos descensos de la viscosidad aparente durante este periodo del ensayo a un mayor contenido de amilosa, debido a que ésta ayudaría a mantener la integridad del gránulo y a prevenir el colapso de los gránulos hinchados (Blazek y Copeland, 2008).

Luego del período de mantenimiento a 95 °C, las zonas de enfriamiento de las curvas correspondientes a las harinas de arvejas y poroto mostraron nuevos incrementos de viscosidad, alcanzando las mayores **viscosidades finales** (V_f) o de pastas enfriadas respecto a las otras harinas, en acuerdo a lo mencionado anteriormente. Esto estaría relacionado con un mayor contenido de amilosa, ya que habría mayor reasociación de estas cadenas para dar una mayor viscosidad final (Li *et al.*, 2019), con remoción de agua de la amilosa lixiviada de los gránulos tras su hinchamiento, en concordancia con observaciones en harinas de garbanzos realizadas por Kaur y Singh (2005) y además con una posible formación de redes en presencia de proteínas y fibra (Felker *et al.*, 2018).

Para el caso de la harina de arvejas y lentejas los valores de sus respectivas V_f resultaron iguales a los de sus V_p ($P > 0,05$), mientras que para la de garbanzos $V_f < V_p$ y para la de porotos $V_f > V_p$ ($P < 0,05$).

Según estos resultados, las harinas de garbanzos y lentejas presentaron bajas temperaturas de *pasting*, marcadas caídas de viscosidad durante el calentamiento y bajas viscosidades de pastas enfriadas de garbanzos. En el caso del garbanzo, podría atribuirse a su mayor contenido de lípidos (**Tabla 1.4**), asociados a cierto grado de restricción al hinchamiento de los gránulos de almidón (afectando la viscosidad) y a una mayor dificultad para retrogradar (Wani y Kumar, 2014). Sin embargo, la harina de lentejas presentó similares propiedades de *pasting* con un contenido lipídico bajo pero mejores propiedades funcionales (**Tabla 1.6**), por lo cual, el contenido lipídico no puede considerarse como único responsable de las propiedades funcionales de la harina.

Estas diferencias en las propiedades de *pasting* de las harinas de las diferentes legumbres reflejarían las variaciones características en sus principales componentes, almidón, proteínas y fibra, y en consecuencia, de sus interacciones (Felker *et al.*, 2018).

Es reconocido que el almidón de legumbres es almidón tipo C, forma cristalina relacionada con el tipo de empaquetamiento que presenta la amilopectina en el gránulo. Específicamente para este tipo de almidón se ha descrito que el valor de viscosidad de pico no es tan bien detectado. Almidones tipo C han presentado limitado hinchamiento granular y han sido relativamente constantes durante la cocción. Por ello, son adecuados para ser aplicados como ingrediente en elaboración de productos de panadería.

Las propiedades de *pasting* de harinas o almidones son influenciadas por el tipo de almidón, tamaño de gránulo, cantidad de almidón, relación amilosa/amilopectina y sus características moleculares (longitud de cadenas, número y longitud de ramificaciones), otros componentes (particularmente lípidos y fósforo), ingredientes (sales, azúcar, reguladores de pH) e historia física después del *pasting* (tiempo, temperatura y relación esfuerzo de cizalla/velocidad). Por ello, servirían como información complementaria a otras propiedades funcionales, debiendo ser evaluado su desempeño final como ingrediente en cada sistema alimentario donde pretenden ser incorporadas.

1.5 CONCLUSIONES

Se caracterizaron física y químicamente distintas harinas de legumbres comerciales.

Si bien los resultados obtenidos para los diferentes ensayos fueron diversos, todas las harinas evaluadas mostraron buen potencial como ingredientes, al constituir productos de alto valor nutricional, ricas en fibra y proteínas, debido a su composición en macro y microcompuestos destacada y sus adecuadas propiedades funcionales. Por todo esto, a partir de los resultados presentados en este Capítulo, resulta interesante evaluar la incorporación de las harinas de legumbres como ingredientes funcionales en una matriz alimentaria específica.

CAPÍTULO 2

Desarrollo y caracterización de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harina de legumbres

RESUMEN

Actualmente, una parte de los consumidores prefieren disminuir la ingesta de carne, aumentando los productos de origen vegetal. De esta necesidad surgen los productos híbridos: una opción emergente pensada para los consumidores flexitarianos que desean disminuir el consumo de carne sin comprometer el gusto, el sabor y textura. Los productos híbridos son alimentos donde se realiza una sustitución parcial de carne a través de ingredientes de origen vegetal, generando productos más sanos y reduciendo el impacto ambiental asociado al consumo de carne.

En este contexto, las legumbres se presentan como una excelente opción para la incorporación en alimentos híbridos, debido a sus atributos nutricionales, funcionales y los beneficios a la salud asociados a su consumo.

En este Capítulo se estudió la incorporación de harinas de legumbres, previamente caracterizadas y evaluadas en el **Capítulo 1**, en hamburguesas de cerdo magras con la incorporación de aceite de girasol alto oleico pre-emulsificado como fuente lipídica, en reemplazo de entre un 10 y 44 % de carne de cerdo. Se estudiaron diferentes propiedades tecnológicas como el rendimiento en la cocción, líquido liberado por presión, reducción del diámetro, color y perfil de textura de los productos obtenidos.

En todos los casos, el agregado de harinas de legumbres permitió obtener productos con elevados rendimientos, bajos valores de reducción del diámetro y del líquido liberado por presión, respecto a controles sin harinas, indicando buena capacidad de retención líquidos por parte de la matriz formada.

Los productos con mayor proporción de agua agregada resultaron en hamburguesas con menor dureza. Las hamburguesas evaluadas por el panel sensorial presentaron buenos puntajes en todos los atributos.

Por lo tanto, fue posible aplicar un reemplazo parcial en las hamburguesas de cerdo por distintos tipos de harina (arveja, garbanzo, lenteja y poroto), en diferentes niveles, obteniendo productos con adecuadas características tecnológicas y buena aceptabilidad sensorial.

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Productos cárnicos y consumo

La carne es un componente de gran importancia en la dieta humana debido a que constituye una buena fuente de proteínas de alta calidad, vitaminas del grupo B y minerales (Cocking *et al.*, 2020). Se considera esencial para el óptimo desarrollo del organismo y también indispensable para la vida de la sociedad moderna, desde el punto de vista nutricional (Jiang y Xiong, 2016).

El consumo de carne está fuertemente arraigado en la cultura alimenticia argentina, principalmente el de carne vacuna. En los últimos años, sin embargo, éste se ha reducido, incrementándose el consumo de otros tipos de carne, principalmente aviar y porcina, asemejándose a la tendencia del resto de mundo. En el año 2020, un año de fuerte crisis económica por la pandemia COVID-19, con caída de ingresos y pérdida de empleos, se estima que el consumo de carne de vacuna se habría ubicado en 50,2 kilos promedio por habitante por año, un 2,2 % por debajo de los niveles del año previo, y probablemente el más bajo de la historia del país (al menos de los últimos 70 años de los que se tienen registro). Esto es un 25 % menos de lo que se consumía a principios del siglo, y un 40 % por debajo del consumo medio por habitante hace 50 años.

En lo que respecta a la situación mundial, la carne de cerdo está consolidada como una de la más consumida junto a la aviar, y presenta un aumento sostenido en los últimos años, como se comentó anteriormente. Según el informe del *Foreign Agricultural Service* del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (FAS-USDA), en el año 2021 se consumieron alrededor de 100 millones de toneladas de carne de cerdo, cifra que representa el 33 % del consumo mundial de carnes, mientras que la vacuna y la aviar representaron el 22 % y 40 %, respectivamente. En Argentina, el consumo promedio actual es de 11,6 kg/per cápita/año (OECD, 2022), similar al promedio mundial (11,76 kg/per cápita/año), de los cuales aproximadamente el 80 % es consumida como fresca y el resto como productos elaborados (chacinados) (CAICHA, 2017).

Diferentes presiones, como el rápido crecimiento demográfico, la urbanización, el aumento de la riqueza y los consiguientes cambios en los hábitos de consumo, están poniendo a prueba la capacidad de los sistemas alimentarios para proporcionar alimentos nutritivos y ayudar a ofrecer mejores oportunidades de subsistencia de

forma ambientalmente sostenible. Los sistemas alimentarios muchas veces están asociados al cambio climático, a la degradación de la tierra y la pérdida de la biodiversidad. Para hacer frente a estos desafíos es necesario un enfoque sistémico.

Si se tiene en cuenta el concepto de “dieta saludable y sostenible” de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como *“aquellos patrones alimentarios que promueven todas las dimensiones de la salud y el bienestar de las personas, tienen una baja presión e impacto ambiental, son accesibles, asequibles, seguras y equitativas y sean culturalmente aceptables”* (FAO-OMS, 2020), es fácil reconocer que las tendencias históricas de elecciones alimentarias y el continuo crecimiento demográfico tienen y tendrán un gran impacto en los sistemas de salud y en el medio ambiente.

El camino hacia una dieta más saludable y sostenible incluye la modificación de muchos hábitos alimentarios representando un reto importante por razones culturales, políticas y económicas (Campbell *et al.*, 2016). La evidencia sugiere que los cambios a gran escala en los patrones dietéticos de los consumidores pueden ayudar a brindar salud, bienestar y beneficios ambientales a una escala y un alcance que no se pueden lograr solo con mejoras basadas en la producción (Clark y Tilman, 2017; Poore y Nemecek, 2018). Además, existe un consenso cada vez mayor en que los esfuerzos para mejorar la sostenibilidad de los sistemas alimentarios pueden verse beneficiados con una transición de los consumidores hacia una mayor dependencia de alimentos de origen vegetal y una disminución del consumo de carne y otros productos de origen animal (Aiking y de Boer, 2018; Rööös *et al.*, 2017; Tilman y Clark, 2014; Willet, 2019).

Además de estas consideraciones, la evidencia disponible sobre los patrones alimentarios y la salud indican la necesidad de centrarse en los alimentos de origen vegetal. La Organización Mundial de la Salud promueve activamente el incremento del consumo de frutas y vegetales, legumbres, granos enteros, y nueces, entre otras recomendaciones dietarias para la ingesta de nutrientes, a fin de prevenir enfermedades crónicas (OMS, 2020). El consumo elevado de productos cárnicos procesados se ha relacionado con una mayor mortalidad (Pan *et al.*, 2012; Larsson y Orsini, 2014; Etemadi *et al.*, 2017), enfermedades cardiometabólicas (Abete *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Kim y Je, 2018; Al-Shaar *et al.*, 2020; Key *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2020), diversos tipos de cáncer (Bouvard *et al.*, 2015; Johnson, 2017;

Huang *et al.*, 2013; Farvid *et al.*, 2015; Carr *et al.*, 2016), y desórdenes intestinales (Cao *et al.*, 2018), relacionado con dietas altas en grasas y colesterol, perfiles lipídicos poco saludables y la eventual presencia de nitritos como aditivos (Grasso *et al.*, 2014).

Por lo tanto, una reducción en el consumo de alimentos cárnicos procesados constituiría formas eficientes de reducir el impacto negativo de la actividad humana no solo sobre el ambiente y la seguridad alimentaria, sino también sobre la salud (Neacsu *et al.*, 2017; Harguess *et al.*, 2020).

En este sentido, la sustitución parcial de carne a través de ingredientes de origen vegetal en productos cárnicos populares es una estrategia emergente para reducir la proporción de carne consumida (Spencer *et al.*, 2018). Este tipo de alimentos es conocido como “*blended foods*” o “**híbridos**”.

El atractivo de los alimentos híbridos es que su premisa no se basa en eliminar la carne de la dieta, sino en hacer simples ajustes a productos cárnicos populares (Lang, 2020). Muchos de los alimentos cárnicos procesados que actualmente se encuentran en el mercado son considerados híbridos (Raphaely, 2015). Una gran variedad de ingredientes funcionales son tradicionalmente adicionados a los productos cárnicos procesados, incluyendo los rellenos o “*fillers*” (derivados de origen vegetal caracterizados por un alto contenido de carbohidratos), extensores (compuestos no cárnicos, con una cantidad importante de proteínas) y aglutinantes o “*binders*” (sustancias con alto contenido de proteínas que pueden ser capaces de unir agua y grasa) (Petracci *et al.*, 2013). Entre los ingredientes más comúnmente utilizados en la industria cárnica encontramos al trigo y la soja, no solo para lograr ahorros de costos sino también por sus interesantes propiedades funcionales: emulsificación de grasas, capacidad de gelificación y unión de agua.

Si bien el concepto de productos cárnicos híbridos está asociado en la población con la inclusión de extensores, rellenos y aglutinantes sólo por razones tecnológicas y económicas, el objetivo de los alimentos cárnicos híbridos es principalmente centrarse en generar productos más sanos, reducir el impacto ambiental y estimular la progresiva disminución del consumo de carne (Grasso y Jaworska, 2020). Otra diferencia, es que para que la reducción en la cantidad de carne sea significativa, la cantidad adicionada del ingrediente de origen vegetal debe ser mayor a las cantidad comúnmente utilizadas como simples extensores (Chandler y McSweeney, 2022). Los

productos híbridos podrían ser particularmente adecuados para consumidores no involucrados con el cuidado del medio ambiente o pasivos (Verain *et al.*, 2015). Es difícil modificar completamente el patrón de una dieta centrada en la carne a un vegetarianismo o veganismo estricto debido a creencias positivas y apegos a la carne y construcciones sociales centradas en la misma, sin embargo, el cambio a una dieta flexitariana o semivegetariana (principalmente basada en plantas, con un consumo limitado de carne) es menos estricta y todavía podría tener un impacto positivo tanto en la salud pública como para el medio ambiente (Spencer *et al.*, 2018). Así los productos híbridos podrían funcionar como un producto de transición y ampliar la gama de productos disponibles para los flexitarianos que quieren bajar su consumo de carne sin comprometer el gusto, el sabor y textura.

2.1.2 Productos cárnicos más saludables y sustentables

La investigación sobre el desarrollo de productos cárnicos más saludables comenzó en la década de 1990 pero aún constituye un gran motor de la investigación actual en este campo. Existen dos estrategias principales: i) la reducción de componentes nocivos a cantidades apropiadas y, ii) la incorporación de ingredientes potencialmente beneficiosos para la salud (Texeira y Rodrigues, 2021). La primera está enfocada en la reducción de ácidos grasos saturados (Özer y Çelegen, 2020), sal (Delgado-Pando *et al.*, 2019), colesterol (Do Amaral *et al.*, 2015) y aditivos como nitritos (Zhu *et al.*, 2020) o fosfatos (Câmara *et al.*, 2020). La segunda estudia la incorporación de los denominados “ingredientes funcionales”, principalmente de origen vegetal, que aportan características más saludables al producto (Pintado *et al.*, 2016; Alirezalu *et al.*, 2020; Barrón-Ayala *et al.*, 2020).

En lo que se refiere a la sustitución de carne y grasa por ingredientes vegetales en productos cárnicos procesados, el principal desafío es evitar cambios de calidad no deseados, particularmente de textura. La textura de estos productos depende de la estructura de la matriz formada por el gel proteico, los solutos, las partículas atrapadas en el gel y el agua libre que resulta unida por la red proteica tras el mezclado y posterior calentamiento (Tahmasebi *et al.*, 2016).

En lo que respecta a la reducción del contenido graso, generalmente es llevada a cabo mediante la incorporación simultánea de agua y algún otro ingrediente no

cárnico como hidrocoloides, almidones y fibra, que han sido ampliamente estudiados para mejorar las características de textura e incrementar la habilidad de ligar agua en productos cárnicos bajos en grasa (Andrés *et al.*, 2006; Baugreet *et al.*, 2016; Fernández-López *et al.*, 2019; Marchetti *et al.*, 2014 y 2017; Marchetti y Andrés, 2021; Shoaib *et al.*, 2018; Tahmasebi *et al.*, 2016; Tamsen *et al.*, 2018).

Entre las estrategias para mejorar el perfil lipídico de estos productos cárnicos aquellas que reemplazan la grasa animal agregada con lípidos de origen vegetal y/o marino son más consistentes con las recomendaciones para la salud (menores cantidades de ácidos grasos saturados, mayores contenidos de monoinsaturados y especialmente de poli-insaturados (de Souza Paglarini *et al.*, 2019; Marchetti *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado resultados exitosos empleando diferentes aceites vegetales (oliva, algodón, maíz, soja, maní, etc.), marinos (pescados y algas), o sus combinaciones, para reemplazar parcialmente la grasa animal en varios tipos de productos cárnicos (frescos, cocidos y fermentados) (Herrero y Ruiz-Capillas, 2021).

Sin embargo, reducir o reemplazar grasa animal con aceites vegetales y/o marinos en una reformulación del producto cárnico no es una tarea simple debido a que el uso de aceite líquido podría tener efectos adversos en diversas características tecnológicas y sensoriales (palatabilidad, jugosidad, textura, propiedades de unión de grasa, etc.) (Franco *et al.*, 2020). Uno de los problemas tecnológicos asociados al reemplazo de grasa saturadas por aceites es el cambio en las propiedades texturales, ya que la grasa saturada suele tener mayor contenido de sólidos, asociados a un rango de fusión más elevado. Este cambio impacta además en la estabilidad, reología y características sensoriales del alimento. La tecnología de pre-emulsificación del aceite con una proteína no-cárnica mejora la habilidad del sistema debido a que el aceite puede ser estabilizado o inmovilizado en una matriz proteica. Las emulsiones aceite en agua (o/w) resultan más fáciles de dispersar en alimentos de base acuosa (como los cárnicos) respecto al aceite solo, y además reducen su posibilidad de separarse físicamente de la estructura del producto resultando estable durante su procesamiento, almacenamiento, y consumo (Salcedo-Sandoval *et al.*, 2013).

Las proteínas de la carne (proteínas miofibrilares, principalmente miosina y colágeno) presentan diferentes propiedades funcionales que son cruciales para la calidad de consumo de los productos cárnicos procesados, por ejemplo, las

características de textura responsables de su masticabilidad y sensación en boca. En general, durante el proceso de elaboración, gracias a la fuerza iónica provista por el NaCl y los fosfatos agregados, y la energía mecánica del picado, una gran cantidad de proteínas miofibrilares se solubilizan, inmovilizan agua, interactúan entre ellas y con hidrocoloides en caso que se incorporen, y pueden emulsificar las partículas pequeñas de grasa formadas. Posteriormente, cuando el producto es cocido, las proteínas y otros agentes gelantes en caso de agregarse, forman finalmente un producto cárnico gelificado (Mateo *et al.*, 2021).

Existen numerosos vegetales fuente de proteínas que pueden constituir adecuadas alternativas a las proteínas cárnicas. Como se mencionó en la Introducción General y en el **Capítulo 1** de esta Tesis, las legumbres se encuentran entre los recursos de proteínas vegetales más convencionales, nutritivas y accesibles. Esto se relaciona con la seguridad alimentaria, en tanto son una fuente sumamente importante y económica de proteínas de origen vegetal, vitaminas y minerales para la población mundial; con la salud, dado que su consumo se ha relacionado con el control de ciertas enfermedades como la diabetes o enfermedades cardiovasculares; con la agricultura sostenible, dado que son capaces de fijar el nitrógeno biológicamente y liberar el fósforo del suelo, lo que es muy importante para la gestión eficiente de los recursos y la salud de los ecosistemas; y con la adaptación al cambio climático, dada su gran diversidad genética a partir de la cual pueden seleccionarse o crearse variedades resilientes al clima. Debido a estos factores, en los últimos años las legumbres han sido investigadas respecto a su potencial uso en el desarrollo de alimentos funcionales.

De acuerdo a la bibliografía, existe una gran variedad de resultados en la incorporación de legumbres en cárnicos, que depende no solo del producto donde se adiciona, sino del tipo de legumbre, la fracción de legumbre a incorporar (harina entera, harina de semilla sin tegumentos, fracciones proteicas), proporción de carne reemplazada, entre otros varios factores (Mateo *et al.*, 2021).

Cuando las legumbres se mezclan con otros ingredientes para elaborar diferentes productos como panes, pastas, emulsiones o productos cárnicos, tanto proteínas como almidón establecen enlaces químicos y forman estructuras de distinto grado de firmeza dependiendo de diversos factores como pH de la matriz, fuerza iónica, concentración del agente gelante, contenido graso o condiciones del calentamiento.

Como se describió en el **Capítulo 1**, las legumbres contienen elevadas proporciones de almidón, fibra, y proteína. El almidón contribuye con la formación de estructuras más fuertes inducidas por calor mediante el hinchamiento de los gránulos embebidos en la matriz proteica gelificada, aumentando su capacidad de retener agua (Carballo *et al.*, 1995). La fibra es capaz de absorber tanto agua como aceite, presentando propiedades de hinchamiento que pueden cambiar la reología de la harina y el comportamiento del producto. En cuanto a las proteínas, estas contribuyen a la solubilidad, la emulsificación, la capacidad de formación de espuma, las características de gelificación y la absorción de aceite, lo que influye en las propiedades funcionales (Boye *et al.*, 2010).

Las investigaciones en el uso de las harinas de legumbres en productos cárnicos no son nuevas, dado que por ejemplo, Verna *et al.* (1984) estudiaron el efecto del reemplazo parcial de carne con harina de garbanzo en salchichas. El interés tecnológico y científico en el uso de legumbres en la industria cárnica permanece activo. En los últimos años, variados estudios de investigación han empleado satisfactoriamente diversas harinas de legumbres o sus fracciones como ingredientes en productos cárnicos.

Dzudie *et al.* (2002) encontraron que el agregado de harina de porotos blancos incrementó la capacidad de retención de agua en salchichas de carne vacuna. Modi *et al.* (2003) emplearon harinas de garbanzo, poroto mungo negro, mungo verde o soja en formulaciones de hamburguesas de búfalo (8 g de harina cada 100 g de carne cruda) concluyendo que las hamburguesas con harina de poroto mungo negro mostraron el mayor rendimiento, el menor encogimiento y menor absorción de grasa, y presentaron los mayores puntajes en todos los atributos de calidad analizados. Serdaroglu *et al.* (2005) obtuvieron albóndigas de carne con mayor rendimiento, retención de grasa y agua al adicionar 10 % de harina de poroto negro (*Black-eyed bean*), garbanzo o lenteja. Por otro lado, Sironi *et al.* (2005) encontraron que el uso de harina de lupines en un nivel de sustitución mayor al 5 % ocasionaba efectos adversos sobre la calidad de productos cárnicos emulsificados. Baugreet *et al.* (2016) utilizaron aislado proteico de arvejas, harina de lenteja y proteínas de arroz en hamburguesas obteniendo productos con mayor contenido de proteínas y de textura blanda de fácil consumo por personas mayores. Purohit *et al.* (2016) estudiaron el agregado de harina

de arveja (15 - 25 g/kg) en salchichas obteniendo buenos resultados para rendimiento y retención de agua. Aslinah *et al.* (2018) evaluaron la incorporación de harina de poroto adzuki (*Vigna angularis*) en productos tipo albóndigas como reemplazo de la fase grasa obteniendo alto rendimiento y buenas características sensoriales. Ghribi *et al.* (2018) formularon salchichas con el agregado de distintos concentrados proteicos de garbanzo, obteniendo un producto con mayor contenido de proteínas y mejoras en el rendimiento en la cocción. Mientras que en el análisis sensorial se encontró que esta adición no presentó diferencias respecto al producto control en el sabor, pero si mejoras en la textura.

Momchilova *et al.* (2019) sustituyeron la mitad de la materia grasa de paté de carne por mezclas de harina de lenteja e inulina, obteniendo mejoras en la textura y emulsificación, y aumentando el valor nutricional del producto.

Por todo lo anterior es evidente que el efecto de las harinas de legumbres como reemplazantes de carne en la calidad del producto obtenido no sólo depende del tipo de producto cárnico, de la cantidad de harina incorporada (y cantidad de carne reemplazada), sino del tipo de legumbre elegido (Holliday *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2021).

2.1.3 Hamburguesas

Las hamburguesas son productos ampliamente consumidos por ciertos grupos poblacionales y generan significantes beneficios económicos para la industria. Como la mayoría de los productos incluidos en "comidas rápidas", contienen altas concentraciones de grasa, ácidos grasos saturados, sal, colesterol, y azúcares, y son deficientes en carbohidratos complejos (López-López *et al.*, 2010).

Estos productos son la principal fuente de sodio de las dietas occidentales, contribuyendo con aproximadamente un 30% del total de la ingesta diaria de sal. El consumo excesivo de sodio está asociado al desarrollo de ciertas comorbilidades como la hipertensión, enfermedad crónica del riñón, accidente cerebrovasculares y enfermedad cardiovascular (Patel y Joseph, 2020). Para reducir la incidencia de estas enfermedades, la OMS ha emitido recomendaciones para limitar la ingesta de sal (cloruro de sodio) a menos de 5 g/día (equivalente a 2 g/día de sodio) en adultos. En nuestro país, la Ley 26905 (2013) promulgada bajo el lema "Menos Sal Más Vida" tiene

como objetivo disminuir el consumo de sal de la población en su conjunto para reducir la carga sanitaria que representan las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales mediante la concientización de la población sobre la necesidad de disminuir el consumo de sal en las comidas, la reducción progresiva del contenido de sodio de los alimentos procesados mediante acuerdos con la Industria (incluidos los productos cárnicos) y su regulación con actualizaciones del nivel máximo de sodio permitido en cada producto en el Código Alimentario Argentino. Todo esto ha impulsado a la industria alimentaria a diseñar productos bajos en sal más en línea con los estándares nutricionales propuestos.

La sal es un ingrediente multi-funcional ampliamente usado en el procesamiento de carnes debido a su bajo costo y propiedades tecnológicas diversas. En los productos cárnicos, juega un papel esencial en prevenir el deterioro, brindar aroma característico y crear la textura deseada por solubilizar las proteínas miofibrilares y potenciar la adhesión y cohesión. Dado que estas funciones del NaCl son esenciales en cárnicos procesados, la reformulación de estos productos para reducir el contenido de sodio deber ser cuidadosamente considerada para evitar un impacto negativo en su vida útil y calidad sensorial. Si además se plantea en forma simultánea la reducción del contenido de grasa para lograr un producto de menor impacto calórico, el desafío tecnológico es mucho mayor.

Por todo lo expuesto y como resultado de numerosos trabajos previos donde se han abordado estas temáticas, se ha reemplazado satisfactoriamente la grasa agregada en hamburguesas de carne vacuna magra por inclusión de 10 % de aceites de mejor perfil lipídico pre-emulsificados, como aceite de girasol alto oleico y aceite refinado deodorizado de pescado (Andrés *et al.*, 2012; Nagai 2018; Pennisi Forell, 2007; Pennisi Forell *et al.*, 2010, Ranalli 2009). Este sistema previamente estudiado por el Grupo de Investigación se empleó en esta Tesis como punto de partida en la búsqueda de una hamburguesa híbrida.

2.2 OBJETIVOS

- Reemplazar parcialmente carne de cerdo por harinas de legumbres comerciales en hamburguesas formuladas con aceite de girasol alto oleico pre-emulsificada utilizando un diseño trifactorial, evaluando como factores el tipo de harina, el nivel de harina y la relación agua/harina para lograr hamburguesas híbridas.
- Evaluar el efecto del reemplazo realizado sobre las características físicas y sensoriales de los productos híbridos obtenidos.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Tomando como referencia una formulación de hamburguesas de carne vacuna magra (Pennissi Forell *et al.*, 2010) en este trabajo de Tesis se optó por desarrollar hamburguesas empleando carne porcina magra con agregado de 10 % de aceite de girasol alto oleico pre-emulsificada como reemplazo de grasa animal, y sales (NaCl 1 % y tripolifosfato de sodio, TPP 0,5 %) (Aslinah *et al.*, 2018; Haron, 2005).

2.3.1 Materiales

Se utilizó carne magra de cerdo, específicamente el corte denominado “nalga” (contenido lipídico 2 g/100 gramos; García, 2015) que comprende los músculos *adductor femoris* y *semimembranosus*, obtenida del comercio local. A fin de elaborar dos partidas completas independientes de todas las formulaciones de hamburguesas, en dos diferentes semanas se obtuvieron dos lotes independientes de carne (aproximadamente, 6 kg cada lote, comprendiendo 3 cortes de diferentes animales en cada uno, pH: $5,61 \pm 0,01$) sin grasa ni tejido conectivo visible.

La carne fue pasada por una picadora manual (disco de 80 mm de diámetro y 8 mm de espesor, con 21 orificios de 95 mm de diámetro; Meifa 32, Cimbra; Buenos Aires, Argentina). La carne picada obtenida fue mezclada para asegurar la homogeneidad y evitar las variaciones bioquímicas intrínsecas entre diferentes animales. La carne picada de cada lote se separó en fracciones de 500 g (cantidad de carne a partir de la cual se utilizó la fracción correspondiente para elaborar cada unidad de producción), que fueron envasadas al vacío en bolsas de polietileno (PO_2 : $0,2 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ a 23

°C, Maraflex, Bemis, Buenos Aires, Argentina), congeladas y almacenadas a -20 °C hasta ser utilizadas, dentro de un plazo máximo de 21 días (Marchetti *et al.*, 2017).

Como fuente de lípidos se utilizó aceite comercial refinado de girasol alto oleico (AO) (Granix S.A.; Buenos Aires, Argentina).

Se emplearon, además, sal (NaCl) y tripolifosfato de sodio (TPP), ambos de grado alimentario o superior (Anedra, Research GA; Argentina). Como reemplazo de la carne se utilizaron las harinas de legumbres comerciales previamente caracterizadas en el **Capítulo 1** (descriptas en sección **1.3.1**), de arvejas, lentejas, garbanzos y porotos.

2.3.2 Diseño y formulación

En base a pruebas preliminares realizadas a fin de evaluar diversos aspectos, principalmente los relacionados con las características sensoriales de los productos obtenidos, como el sabor y textura, así también como posibles niveles de remplazo de carne por harinas de legumbres mencionados por otros autores (Baugreet *et al.*, 2017; Dzudie *et al.*, 2002; Modi *et al.*, 2003), el diseño experimental elegido consistió en evaluar 3 factores: i) el **tipo de harina de legumbre** (cuatro tipos, arvejas, garbanzos, lentejas y porotos), ii) el **nivel de harina** en reemplazo de carne de cerdo (dos niveles, 8 y 15 %), y iii) la **relación agua/harina** (tres relaciones, 1,25; 1,6 y 2 g agua/g harina) en formulaciones de hamburguesas de cerdo con aceite pre-emulsificado. Como condición, todas las formulaciones incluyeron igual cantidad de carne+harina+agua (88,5 g/kg). El resto de los ingredientes (aceite de girasol AO, NaCl, TPP) se mantuvieron constantes.

En la **Tabla 2.1** se pueden observar las formulaciones ensayadas. La nomenclatura empleada para identificar las formulaciones consistió en asignar la primera letra según la inicial correspondiente a la legumbre incorporada (A: arveja, G: garbanzo, L: lenteja, P: poroto), y para cada tipo de harina, asignar un número entre 1 y 6 para indicar el nivel de harina y proporción agua/harina, según se indica en la **Tabla 2.1**.

Además, se incluyó una formulación identificada como “control” (C), sin reemplazo de carne de cerdo por harina de legumbres, que fue utilizada como referencia en varios de los ensayos. Por otro lado, se analizó un producto comercial (ingredientes según rótulo: carne de cerdo, sal, saborizante, emulsionante: polifosfato de sodio,

antioxidante: ácido ascórbico, estabilizante del color: ácido nicotínico; COTO C.I.C.S.A, CABA, Argentina) con el mismo fin.

Tabla 2.1 Ingredientes para preparar 100 g de pasta cruda para hamburguesas con carne de cerdo (C), y con carne de cerdo y harina de legumbres (1-6). Reemplazo de carne obtenido (%) en las hamburguesas de carne de cerdo y harina de legumbres.

Formulación	Ingredientes variables (g)			Ingredientes comunes (g)			Reemplazo de carne (%)
	Carne	Harina*	Agua	Aceite	NaCl	TPP	
1	70,50	8	10	10	1	0,5	10,2
2	67,70	8	12,8	10	1	0,5	13,7
3	64,50	8	16	10	1	0,5	17,8
4	54,75	15	18,75	10	1	0,5	30,2
5	49,50	15	24	10	1	0,5	36,9
6	43,50	15	30	10	1	0,5	44,6
C	78,5	-	10	10	1	0,5	0

* Harina de arvejas, garbanzos, lentejas, o porotos.

TPP: tripolifosfato de sodio.

2.3.3 Elaboración de hamburguesas

La carne picada necesaria para la elaboración de cada unidad de producción de hamburguesas (previamente congelada en fracciones de 500 g) fue descongelada por 24 horas en heladera.

Para determinar el procedimiento adecuado para lograr una correcta incorporación del aceite, harina y agua a la mezcla de carne y sales, se realizaron diferentes pruebas preliminares ajustando volúmenes, cantidades y tiempos de mezclado. De acuerdo con lo observado se optó por obtener una emulsión equivalente en todas las formulaciones manteniendo la relación agua/aceite/harina de 10 ml/10 g/5 g, y agregar el resto de los ingredientes necesarios según la **Tabla 2.1** sobre el resto de ingredientes (mezcla de carnes y sales). El procedimiento elegido entonces para obtener la emulsión consistió en colocar la harina a utilizar en un recipiente junto con el agua, homogeneizar por 30 s y dejar hidratar por un minuto más. Luego se agregó el aceite y se homogeneizó por 1,5 min de modo de obtener la emulsión.

Para cada unidad de producción, se colocaron en procesadora (Universo, Rowenta, Alemania) la carne, la mezcla de sales, la emulsión obtenida, y se agregó el resto de harina y/o agua necesaria para completar la formulación según el diseño experimental

(Tabla 2.1). Se mezcló con accesorio mezclador durante 4 min a velocidad baja y la pasta resultante se llevó a heladera por 1 h antes de formar las hamburguesas.

Cada producto (hamburguesa) fue obtenido a partir de 40 ± 1 g de pasta cruda empleando un aro metálico de 5 cm de diámetro y 1,2 cm de altura y ejerciendo una presión constante durante 1 min para su formación entre láminas de polietileno. En cada unidad de producción se obtuvieron 9 hamburguesas a partir de la correspondiente fracción de 500 g de carne, para ambos lotes independientes.

Las hamburguesas fueron dispuestas en monocapa en bolsas Zip-Lock (C. S. Johnson & Sons de Argentina S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) y congeladas a -20 °C en freezer.

El proceso de elaboración de los productos híbridos se esquematiza en la **Figura 2.1**.

Para la elaboración del control se procedió de la manera descrita previamente sin agregado de emulsión, agregando el agua directamente a la carne, junto con el aceite y mezcla de sales.

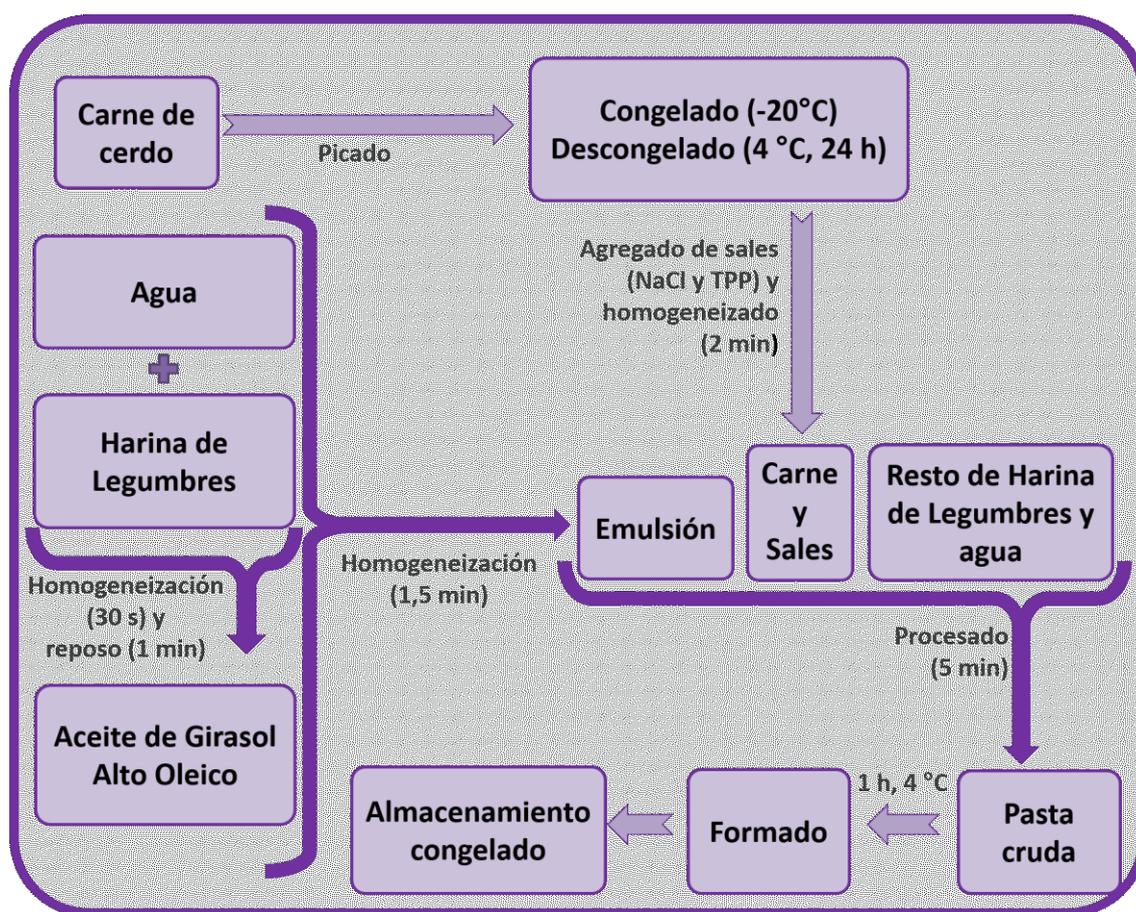


Figura 2.1. Esquema de elaboración de hamburguesas con harina de legumbres.

2.3.4 Cocción de los productos

Para determinar el tiempo de cocción necesario para lograr una temperatura interna segura de 71 °C de acuerdo a las recomendaciones USDA (2013) se registró la evolución térmica durante la cocción del producto congelado en plancha calefactora de doble contacto (3882, Oster, Newell Brands; Atlanta, Estados Unidos), utilizando una termocupla conectada a un equipo de adquisición de datos (Testo175, Testo175, Testo AG; Lenzkirch, Alemania). Este procedimiento se realizó por triplicado.

Una vez establecido el tiempo, éste fue empleado en la cocción de todos los productos obtenidos, en las condiciones y con los equipamientos mencionados.

El producto comercial analizado se sometió al proceso de cocción indicado por el fabricante.

2.3.5 Caracterización fisicoquímica de los productos

2.3.5.1 Actividad acuosa

La actividad acuosa (a_w) de los productos obtenidos se analizó a 25 °C. Para su determinación se utilizó el equipo Meter AquaLab series 3 (Decagon Devices, Inc.; Washington, Estados Unidos), que mide la actividad acuosa basándose en la técnica del punto de rocío. Se cortaron cilindros de aproximadamente 5 mm de espesor y de 1 cm de diámetro con un sacabocado, y se utilizaron para medir la actividad acuosa en el equipo. Este ensayo se realizó por cuatuplicado.

2.3.5.2 Rendimiento

El rendimiento fue evaluado como el porcentaje del peso retenido luego del proceso de cocción. Para ello, se pesaron las hamburguesas crudas (P_{crudo}) e inmediatamente después de cocidas y enfriadas (P_{cocido}), realizando ocho replicados por formulación. El rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{P_{cocido}}{P_{crudo}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

2.3.5.3 Líquido liberado por presión

El líquido liberado por presión (LLP) se determinó (por quintuplicado) como el porcentaje de líquido extraído por presión de los productos cocidos. Para ello, hamburguesas enteras cocidas, previamente enfriadas y pesadas (P_{cocido}) colocadas entre dos láminas de papel de filtro (Whatman Nro. 5, 10 cm de diámetro, Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido) y cubiertas por 2 láminas de papel aluminio de las mismas dimensiones, fueron sometidas a compresión en un texturómetro TA-xT2i (Texture Analyzer, Stable Micro Systems; Godalming, Reino Unido) a temperatura ambiente. Se programó el texturómetro para realizar una presión de 100 N durante 2 minutos (Marchetti *et al.*, 2013). Las láminas de papel de filtro y de aluminio se pesaron antes (PP_{antes}) y después ($PP_{\text{después}}$) del ensayo. El porcentaje de líquido liberado fue determinado de la siguiente manera:

$$\text{Líquido liberado por presión (\%)} = \frac{PP_{\text{después}} - PP_{\text{antes}}}{P_{\text{cocido}}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

2.3.5.4 Reducción del diámetro

Se determinaron los diámetros de las hamburguesas crudas (D_{crudo}) y cocidas (D_{cocido}) mediante calibre digital (SC111201, Schwyz SA, Suiza) (9 medidas por formulación) y la reducción del diámetro se calculó, empleando la siguiente ecuación (do Prado *et al.*, 2019):

$$\text{Reducción de diámetro (\%)} = \frac{D_{\text{crudo}} - D_{\text{cocido}}}{D_{\text{crudo}}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

2.3.5.5 Color

Las mediciones colorimétricas se llevaron a cabo con un colorímetro triestímulo (Minolta CR-400, Minolta Corp., Ramsey; New Jersey, Estados Unidos), sobre la superficie de los productos cocidos empleando el espacio de color CIE-Lab.

Se evaluaron los parámetros L^* , a^* y b^* , y a fin de comparar diferencias de color entre las distintas muestras respecto a una muestra considerada control, se calculó la diferencia total de color (ΔE^*) como el modulo del vector distancia entre el producto

comercial (L_0 , a_0 , b_0) y las formulaciones de hamburguesa de carne híbridas (L^* , a^* , b^*) (Drlange, 1994) mediante la siguiente expresión:

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2 + (L^* - L_0)^2} \quad \text{Ec. 2.4}$$

2.3.5.6 Análisis de perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA, por su sigla en inglés, propuesto originalmente por Friedman *et al.* (1963) y Szczesniak *et al.* (1963)) se realizó sobre cilindros de 1,7 cm de diámetro y 1,2 cm de altura inmediatamente después de su corte a partir de hamburguesas previamente cocidas y enfriadas a temperatura ambiente en un cuarto de temperatura controlada (20 °C). Se realizaron quince replicados por formulación.

Para realizar este ensayo se empleó un texturómetro TA-xT2i (Texture Analyzer, Stable Micro Systems; Godalming, Reino Unido). El ensayo constó de dos ciclos de compresión axial a un 30 % de la altura original de la muestra entre los platos planos del equipo separado por un tiempo de espera. Se utilizó una sonda de aluminio SMSP/75. La celda de carga utilizada fue de 25 kg y la velocidad del ensayo de 0,5 mm/s. Los resultados fueron obtenidos mediante el software provisto por el equipo.

Se determinaron los parámetros asociados a un perfil de textura típico (Marchetti *et al.*, 2013) dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y resiliencia. La dureza (N) se definió como el valor de fuerza correspondiente al máximo del primer ciclo de compresión. Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o entre la lengua y el paladar. El parámetro elasticidad (mm/mm) indica la habilidad que tiene la muestra para recuperar su altura original, y se calcula como la altura que el material recupera entre el final de la primera compresión (equivalente a una mordida) y el comienzo de la segunda. Con respecto al parámetro cohesividad (J/J), este parámetro refleja lo bien que el producto resiste una segunda deformación respecto a cómo se comporta en una primera. Indica la fuerza de los enlaces internos que forman la matriz de los alimentos y el grado en que un alimento puede deformarse antes de romperse. Se calculó como la relación entre el área de fuerza positiva obtenida durante la segunda compresión y el área de fuerza positiva obtenida durante la primera compresión, por lo que es también adimensional. La masticabilidad (N) se definió como el producto de la dureza x cohesividad x elasticidad. Por último, la

resiliencia (J/J), que representa cuanto un producto logra recuperar su posición original. Resulta del cociente entre el valor de la compresión en la zona de decaimiento del primer pico, dividido el valor de la compresión del primer pico.

2.3.6 Análisis sensorial

Se realizó un ensayo de aceptabilidad y preferencia por consumidores con el fin de determinar si el reemplazo parcial de carne por harina de distintas legumbres afectaba los atributos sensoriales del producto. Para ello se seleccionaron 4 formulaciones (A5, G5, P5 y L5). Las hamburguesas fueron cocidas según lo indicado en la **Sección 2.3.4**, mantenidas a temperatura templada y presentadas a los panelistas en platos plásticos blancos, de a 4 muestras, de 10 g cada una, con códigos de tres dígitos y en orden al azar, junto con agua fresca para enjuagar la boca entre muestras. Cabe mencionar que solo se informó a los consumidores que los productos eran hamburguesas de carne de cerdo, sin más detalles. En la **Figura 2.2** se presenta la planilla presentada a cada evaluador.

Se realizó el análisis sensorial mediante un panel no entrenado de 60 personas utilizando una escala hedónica de 9 puntos para evaluar el grado de aceptación de los productos (9 = me gusta extremadamente; 5 = me es indiferente, 1 = me disgusta extremadamente) de acuerdo con su apariencia, color, sabor, textura y aceptabilidad general.

Por otro lado, para obtener información adicional, la "dureza" y "jugosidad" de los productos fue evaluada además utilizando la escala de JAR (por su sigla en inglés, "*Just About Right*") (Rothman y Parker, 2009). Estas escalas permiten evaluar la adecuación de la intensidad de los atributos sensoriales de un producto. Son escalas de naturaleza bidireccional, cuyo punto medio es el ideal (o JAR) y los extremos van desde insuficiente hasta excesivo. Permiten al consumidor indicar de forma fácil lo que le parece el nivel de cada atributo en el producto con respecto a su ideal (Popper, 2014). En este caso se utilizó una escala de 5 puntos tanto para la dureza (-2= muy blando, -1=blando, 0= adecuado, 1= duro y 2= muy duro) como para la jugosidad (-2= muy jugosa, -1=jugosa, 0= jugosidad adecuada, 1= poco jugosa y 2= muy poco jugosa).

Además, se realizó un análisis de penalizaciones que consiste básicamente en calcular el descenso en la aceptabilidad media cuando la intensidad del atributo se

considera insuficiente o excesiva. En primer lugar, se agruparon los casos según la puntuación otorgada al atributo en la escala JAR: “insuficiente” (puntuaciones -2 y -1), “adecuado” (puntuación 0) y “demasiado” (puntuaciones +1 y +2). En segundo lugar, se computó el porcentaje de casos y se calculó la media de aceptabilidad en cada grupo. Finalmente, la penalización o el descenso en la aceptabilidad porque el atributo es insuficiente se calcularon como la diferencia entre la aceptabilidad media del grupo “adecuado” y la aceptabilidad media del grupo “insuficiente”. Asimismo, la penalización por ser el atributo excesivo se calculó como la diferencia entre la aceptabilidad media del grupo “adecuado” y la aceptabilidad media del grupo “demasiado”. De forma práctica, el valor de la penalización obtenido indica cuántos puntos de aceptabilidad pierde el producto cuando el nivel del atributo no es el adecuado por ser excesivo o por ser insuficiente, debiéndose considerar el porcentaje de casos que representa, ya que puede darse un valor de penalización muy alto pero que sea resultado de la evaluación de muy pocos consumidores y por lo tanto no resulte relevante. En general, se puede considerar que el efecto del atributo en la aceptabilidad global del producto es poco importante cuando el porcentaje de consumidores con puntuaciones diferentes de JAR es inferior a 20. Por ejemplo, podría darse el caso de que los consumidores hayan dicho que el producto les parece un “poco duro”, pero en la aceptación global hayan asignado un 8 (“me gusta mucho”), lo que indicaría que el parámetro evaluado no es un atributo clave en la aceptación del producto. El análisis de penalizaciones es una herramienta muy útil para evaluar estos aspectos.

PANEL SENSORIAL DE HAMBURGUESAS DE CARNE									
Evaluador Nro.:	Nombre:	Fecha:							
1-Usted ha recibido 4 muestras de <i>hamburguesas de carne de cerdo</i> . Utilizando la escala indicada, por favor evalúe cada atributo marcando con una cruz (x) en el casillero adecuado.									
Muestra Nro:									
	<i>Me disgusta</i>					<i>Me gusta</i>			
Apariencia	<input type="checkbox"/>								
Color	<input type="checkbox"/>								
Sabor	<input type="checkbox"/>								
Textura	<input type="checkbox"/>								
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>								
*En cuanto a la DUREZA :									
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Muy blanda	Blanda	Adecuada	Dura	Muy dura					
*En cuanto a la JUGOSIDAD									
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
Muy poco jugosa	Poco Jugosa	Adecuado	Muy Jugosa	Demasiado jugosa					
2 - Para cada atributo evaluado indique cuál o cuáles muestras prefiere.									
Apariencia	Muestra N°.....	Sabor	Muestra N°.....						
Textura	Muestra N°.....	Aceptabilidad general	Muestra N°.....						
Color	Muestra N°.....								

Figura 2.2 Planilla entregada a los evaluadores en el panel sensorial.

2.3.7 Análisis estadístico

Procedimientos estadísticos tales como análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones pareadas de medias se llevaron a cabo mediante el software Infostat v2009 (Infostat 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó el ensayo de Tukey para estudiar las comparaciones pareadas de medias. Las diferencias entre medias y ensayos F se consideraron significativas cuando las probabilidades estimadas fueron inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Los resultados experimentales se informaron como valor medio y error estándar de la media entre paréntesis.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Tiempo de cocción

Cuando se registró la evolución térmica durante la cocción de hamburguesas congeladas en plancha calefactora de doble contacto (**Figura 2.3**) se observó que durante el primer minuto aproximadamente no se registraron cambios importantes en la temperatura del centro del producto, y que fueron necesarios 2 minutos más para poder alcanzar la temperatura segura de 71 °C. Por lo tanto, el tiempo de cocción para los productos se estableció en 3 min.

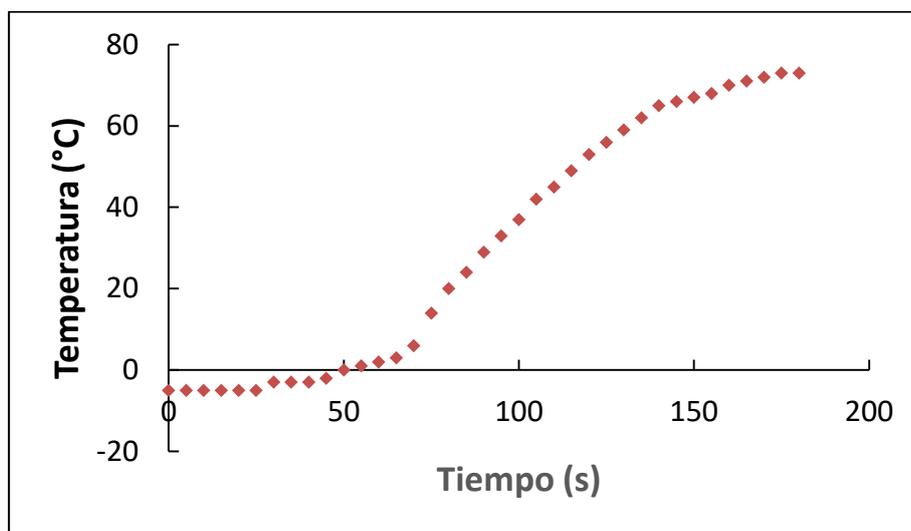


Figura 2.3 Evolución térmica de hamburguesas congeladas durante su cocción en plancha calefactora de doble contacto.

2.4.2 Caracterización física de los productos

Las propiedades físicas son de extrema importancia tanto en la aceptabilidad de los productos por parte de los consumidores y la industria (Velioglu *et al.*, 2010). Por esta razón se evaluaron diversas propiedades.

Los resultados de los ensayos realizados sobre los productos obtenidos a partir de los dos lotes de carne no presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sí, lo que indicó que el ensayo fue reproducible.

Los resultados obtenidos para actividad acuosa (a_w) y rendimiento se presentan en las **Figuras 2.4 a) y b)**, respectivamente.

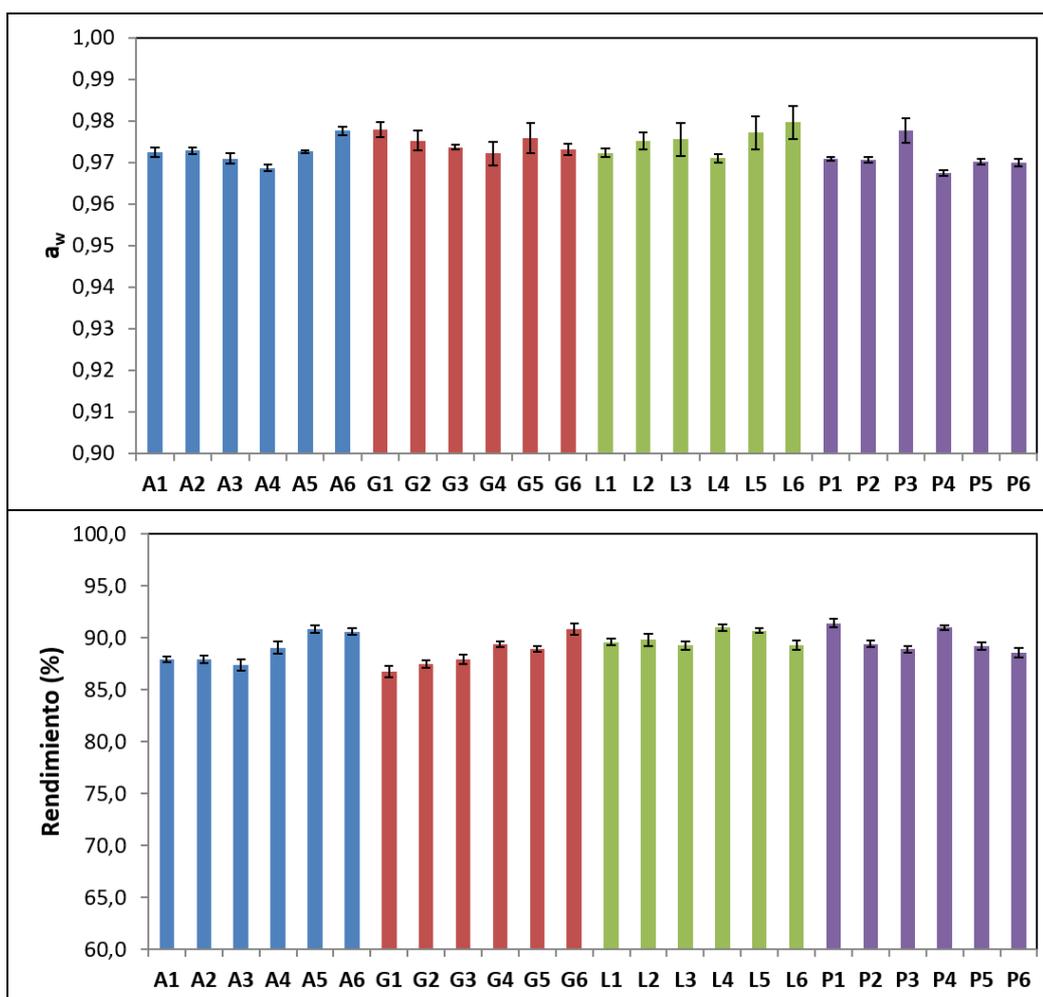


Figura 2.4 Actividad acuosa (a_w) (a) y Rendimiento (b) de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas de legumbres (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**).

Cuando se analizaron los resultados de **actividad acuosa (Figura 2.4a)**, de acuerdo al análisis de varianza, el *tipo de harina* como la *relación agua/harina* adicionado resultaron significativos. Todos los productos presentaron valores de a_w entre 0,967 y 0,980, valores relativamente altos pero asociados con sus elevados contenidos de agua. Entre todas las formulaciones, sólo una formulación, P4 resultó significativamente menor al resto. El valor de a_w del producto comercial fue de 0,967, estadísticamente igual a la formulación antes mencionada (P4), mientras que la a_w del control (0,972) resultó en un valor intermedio respecto a las hamburguesas híbridas.

Respecto al **rendimiento (Figura 2.4b)**, el análisis de la varianza mostró que los factores individuales *tipo de harina* y el *nivel de harina* adicionada resultaron significativos, mientras que todas las interacciones (dobles y triple) fueron significativas ($P < 0,05$), aun las que involucraban al factor *relación agua/harina* que no

había sido significativo en forma individual. Cuando se analizó su interacción con el *tipo de harina* se observó que a baja *relación agua/harina* para las harinas de porotos y lentejas se obtuvieron los mejores resultados pero ocurrió lo opuesto para las harinas de arvejas y de garbanzos, mientras que cuando la *relación agua/harina* era alta, el efecto fue menos evidente.

En la **Figura 2.4b** pueden observarse los rendimientos obtenidos para las hamburguesas híbridas. Todas las formulaciones presentaron valores elevados, superiores al 87 % y alcanzando en algunos casos el 91 %. Para las formulaciones con harinas de garbanzos y arvejas (formulaciones G y A), los mayores rendimientos se observaron en productos con el mayor nivel de harina agregado (15 %, formulaciones G 4-6 y A 4-6), sin embargo, para las hamburguesas con harinas de porotos y lentejas (formulaciones P y L), el efecto de la cantidad de harina fue menos evidente obteniéndose los valores más altos tanto para 8 como para 15 %. Esto podría explicarse por las mayores capacidades de absorción de agua (CAA) que presentaron estas harinas (**Tabla 1.6**) respecto a las harinas de garbanzo y arveja.

Los rendimientos obtenidos en los productos híbridos resultaron mayores ($P < 0,05$) a los encontrados tanto para el producto comercial (84,3 %) como para el control sin reemplazo elaborado en el laboratorio (76,4 %), por lo que la incorporación de harina de legumbres mejoró significativamente el rendimiento de los productos.

Una hamburguesa generalmente se compone de fibras de carne más o menos intactas y haces de fibras, distribuidos al azar (Tornberg, 2005) en comparación con la estructura anisotrópica bien definida del músculo completo. El molido de la carne en combinación con la adición de sal da como resultado cierta extracción en la fase acuosa de proteínas miofibrilares que, con el subsiguiente calentamiento, permiten la formación de un complejo gel cárnico junto con otros componentes de la hamburguesa, como se mencionó anteriormente. De acuerdo con Salcedo-Sadoval *et al.* (2015) el rendimiento depende de los niveles de agua y aceite incorporados, y de cuan efectivo resulta el ingrediente empleado para retener esos fluidos en los productos reformulados, en este caso, la harina de legumbres adicionada. Los mayores rendimientos observados en la hamburguesas con harinas de legumbres respecto al control estarían entonces relacionados no solo con la capacidad de las proteínas cárnicas extraídas para formar un gel y la baja contracción que presentan los trozos de

fibras, sino además con los componentes de las harinas: fibra, almidón y proteínas, ya sea solos o interaccionando con proteínas de la carne, que formarían una red más eficiente para evitar las pérdidas de líquido (Sanjeeva *et al.*, 2010). Los componentes de las harinas ayudan a retener agua y grasa durante el proceso de cocción, aumentando el rendimiento (Farooq y Boye, 2011).

La celulosa presente en las legumbres está compuesta por una larga secuencia lineal de restos de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ unidas por puente de hidrógeno formando una serie de agregados denominados microfibrillas. La celulosa forma intersticios e incrementa el área superficial por unión a hemicelulosa, constituida por una cadena lineal relativamente larga sobre la que pueden aparecer cadenas laterales cortas. Esta contribuye a la capacidad de retención de agua y aceite de la fibra insoluble (Shariati-levari *et al.*, 2016). Debido a los altos contenidos de fibra dietaria total de las harinas de legumbres (**Tabla 1.4**) esta podría reforzar entonces estas matrices cárnicas mediante su hidratación y capacidad espesante, colaborando también con el aumento de los rendimientos (Jiménez-Colmenero y Delgado-Pando, 2013). En cuanto al almidón, éste tiene la habilidad de gelatinizar, absorbiendo una cantidad de agua considerable, contribuyendo a la mejora de la retención de agua en las hamburguesas (Totosaus, 2009).

Tendencias similares fueron observadas por Dzudie *et al.* (2002) con la utilización de harina de porotos en salchichas de carne de bovina y por Serdaroglu *et al.* (2005) con harina de porotos alubia tipo carilla (*Vigna unguiculata*), harina de garbanzos y de lentejas en productos tipo albóndigas.

En las **Figuras 2.5 a) y b)** se presentan los resultados obtenidos para el líquido liberado por presión y reducción de diámetro, respectivamente.

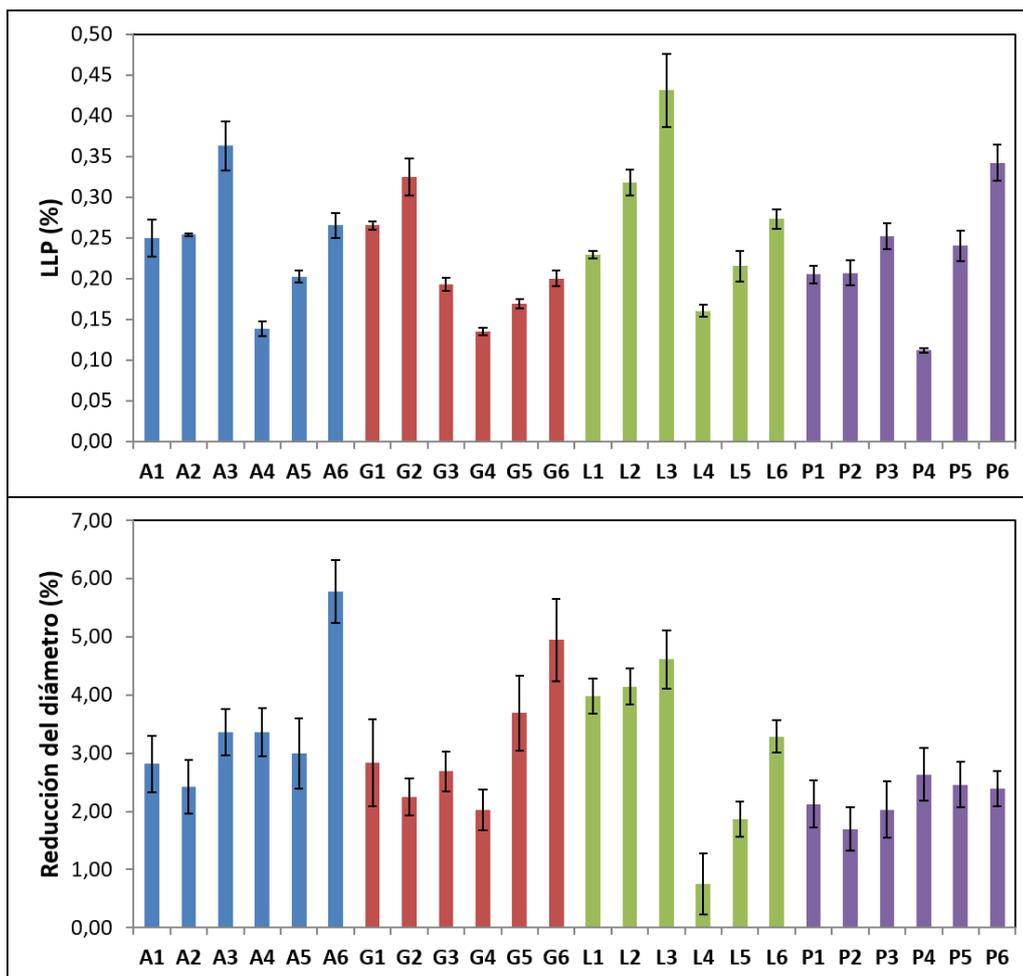


Figura 2.5 Líquido liberado por presión (a) y reducción del diámetro (b) de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas de legumbres (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**).

Para el **líquido liberado por presión (LLP)** (**Figura 2.5a**) de acuerdo al análisis de varianza todos los factores así como las interacciones entre ellos resultaron significativos. Respecto al *tipo de harina* utilizado, se encontró que con el agregado de harina de lentejas en general se obtuvieron valores mayores del LLP. Cuando se analizó la influencia del *nivel de harina* adicionada, se encontró que las formulaciones con 15 % de harina (formulaciones 4-6) presentaron los menores valores de LPP, con excepción de las formulaciones con harina de porotos, para las cuales las medias para las formulaciones con 8 % y 15 %, no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$). También se observó que los valores de LLP aumentaban para ambos *niveles de harina* conforme aumentaba la *relación agua/harina*. La relación entre mayores niveles de agua agregada y líquidos liberados por presión más altos fue descrita también por

Chang y Carpenter (1997) en el desarrollo de salchichas tipo *Frankfurters* con el agregado de agua y salvado de avena, y por Gujral *et al.* (2002) en hamburguesas formuladas con huevo líquido y proteínas de soja.

Cuando se compararon los resultados obtenidos para las hamburguesas con harinas de legumbres, para el control y para el producto comercial, se encontró que éstos últimos presentaron valores significativamente mayores (6,20 y 1,1 %, respectivamente) respecto a las hamburguesas híbridas, lo que concuerda con los resultados de rendimiento y el efecto que tendrían los componentes aportados por las harinas en estos sistemas cárnicos. Bajos valores de LLP estarían relacionados con productos más jugosos, por lo que las hamburguesas híbridas serían matrices que retiene más eficientemente el agua (Holliday *et al.*, 2011).

Con respecto a los resultados obtenidos para la **reducción de diámetro (Figura 2.5b)** fueron significativos en forma individual los factores *tipo de harina* y *relación agua/harina*, y respecto a interacciones, existió una interacción doble significativa entre todas las variables. Todas las formulaciones ensayadas presentaron bajos valores de reducción de diámetro (0,7 - 5,8 %). En general, se observaron los mejores resultados (menores valores para reducción de diámetro) cuando se utilizó harina de porotos. Respecto al factor *relación agua/harina*, se obtuvieron reducciones menores tanto para el nivel bajo como intermedio de agua, para ambos niveles de harina. En general, a mayor proporción de agua, mayor la reducción del diámetro observada, que estaría relacionado con un mayor LLP.

El agregado de harina permitió disminuir entre 53,2 y 94,35 % la reducción del diámetro de los productos respecto al control (cuya reducción fue de 12,4 %) y entre 39,6 y 92,7 % respecto al comercial (con reducción de 9,5 %). Estos resultados se atribuyeron a una mayor retención de líquidos por parte de la matriz de las hamburguesas con carne y harina de legumbres. Durante el proceso de cocción de la hamburguesa, el producto pierde peso y se encoge debido a desnaturalización y contracción de las proteínas, evaporación de agua y goteo de grasa (Braeckman *et al.*, 2009). Los componentes de las harinas de legumbres, como ya se mencionó, pueden absorber agua y retener la materia grasa, a partir de la capacidad de hinchamiento del gránulo de almidón y la gelación de proteínas al aplicar calor (Gujaska *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999; Pietrasik y Janz, 2010; Soria-Hernández *et al.*, 2015). Parte del agua,

como así también, los lípidos quedan atrapados en la red gelificada formada por las proteínas, como también, algunas moléculas se pueden unir a las proteínas vegetales (Maninder *et al.*, 2007). Estas propiedades permiten que los productos híbridos retengan más agua y lípidos durante el proceso de cocción, lo que permite al producto mantener mejor su tamaño original.

Por lo tanto, el reemplazo parcial de hasta un 44,6 % carne por harinas de legumbres, debido a la composición de las harinas y sus propiedades, redundaría en productos híbridos con buenos rendimientos, baja reducción de diámetro y poca pérdida de líquidos por presión, aspectos que serían bien apreciados por el consumidor.

La **Figura 2.6 (a,b,c)** presenta los resultados obtenidos para los parámetros dureza, cohesividad, y elasticidad obtenidos del análisis de perfil de textura realizado sobre las hamburguesas híbridas.

Según el análisis de los resultados obtenidos para la **dureza** de las hamburguesas híbridas (**Figura 2.6a**) fue significativamente afectada ($P < 0,05$) por los tres factores individuales y por las interacciones entre ellos, a excepción de la interacción *tipo de harina-relación agua/harina*. En general, la combinación de altos niveles de harina y agua resultó en productos más blandos (menor dureza). Por otro lado, hamburguesas con 15 % de harina de arvejas, garbanzos o lentejas y la menor relación agua/harina (formulaciones A4, G4 y L4), resultaron ser las más duras, pero este efecto no fue observado en formulaciones equivalentes con harina de porotos. Se observó también que, en general, las hamburguesas adicionadas de harina de porotos (formulaciones P) resultaron ser las más blandas.

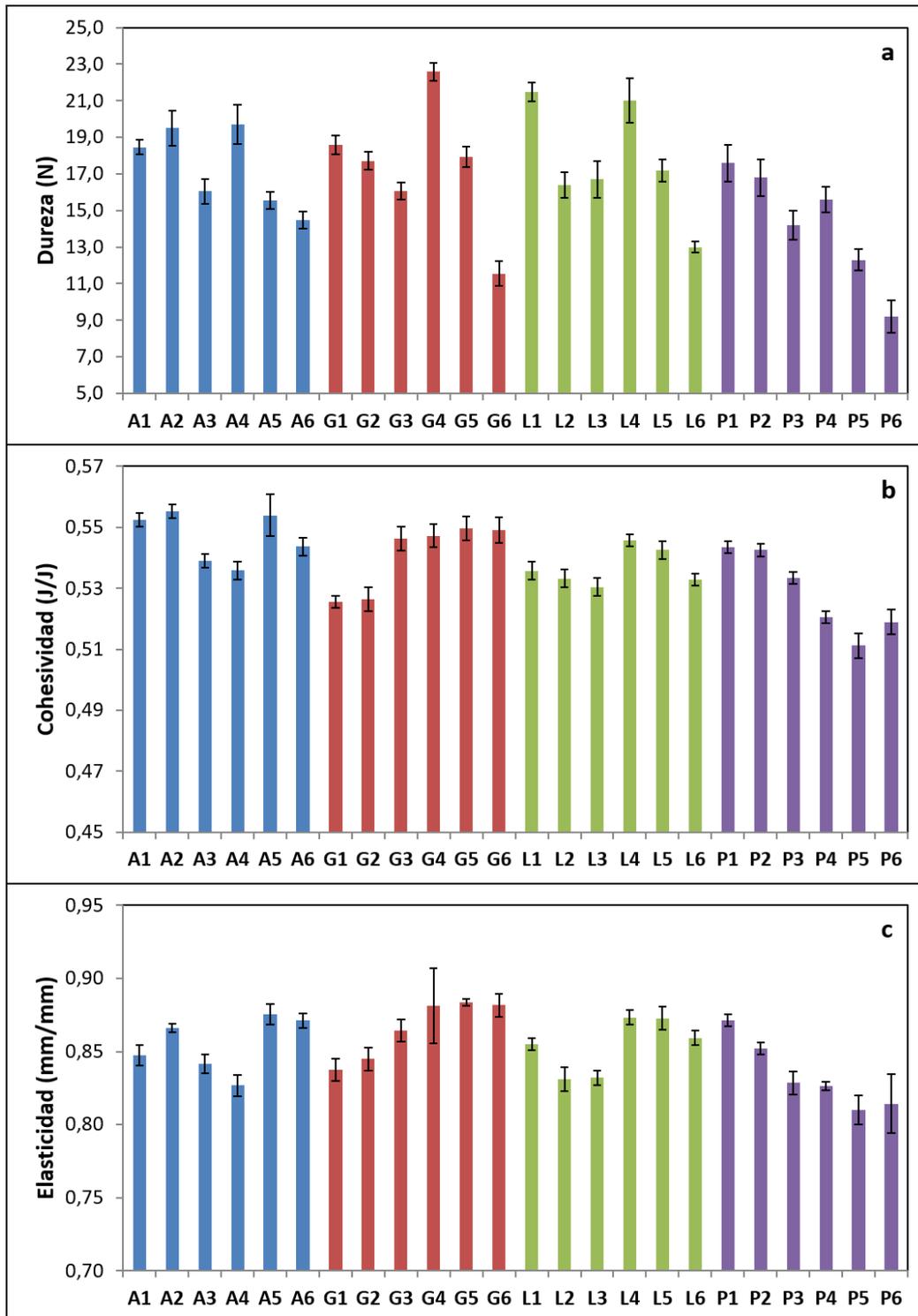


Figura 2.6 Parámetros del análisis de perfil de textura: **a)** dureza, **b)** cohesividad, **c)** elasticidad, de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas de legumbres (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**).

Por otro lado, las durezas obtenidas para el control (10,2 N) y el producto comercial (12,0 N) resultaron estar entre las más bajas en comparación con las hamburguesas híbridas, solo presentando la formulación P6 un valor aún menor. Algunas formulaciones (A6, G6, P6, L6, P3, P5) resultaron de similar dureza respecto al producto comercial ($P > 0,05$). El hinchamiento de los gránulos de almidón contenidos en la harina, al aumentar la temperatura durante la cocción de la hamburguesa, permitiría obtener una red más compacta y fuerte que da como resultados productos más firmes. El efecto de refuerzo al gel por parte del agregado del almidón puede deberse al hinchamiento del mismo, estos inmersos en el gel proteico, comprimirían la matriz, produciendo además una pérdida de agua que aumentaría la firmeza (Carballo *et al.*, 1996).

Respecto al análisis de la **cohesividad** de las hamburguesas híbridas (**Figura 2.6b**), todos los factores individuales y las interacciones resultaron significativos, con excepción de la interacción *nivel de harina-relación agua/harina*. En general, se encontró que las formulaciones con harina de porotos a 15 % (formulaciones P 4-6) presentaron las matrices menos cohesivas. Si bien el factor *nivel de harina* adicionada resultó significativo, las diferencias de cohesividad entre ambos niveles resultaron pequeñas, mientras que hubo una cierta tendencia de que, a menor *relación agua/harina*, más cohesiva resultaba la matriz. La combinación de 15 % de harina agregada y alta *relación agua/harina* resultó en los valores más bajos encontrados, siendo las formulaciones en las que el reemplazo de carne fue mayor.

Todos los valores de cohesividad obtenidos para hamburguesas con reemplazo de carne de cerdo por harinas de legumbres estuvieron comprendidos en el rango 0,50 – 0,56 J/J, resultando menores con respecto al control sin reemplazo preparado en el laboratorio (0,59 J/J) pero similar al producto comercial (0,54 J/J).

Estos resultados podrían indicar que, si bien las interacciones entre las proteínas de la carne y los componentes de la harina podrían aumentar la dureza, también reducirían las conexiones de partículas de carne entre sí, dando lugar a una estructura menos densa y uniforme, disminuyendo la cohesividad de las hamburguesas (Jiménez-Colmenero, 2000). Resultados similares fueron observados en sistemas cárnicos con el agregado de fibra de salvado de arroz (Zhuang *et al.*, 2016), harina de semillas de

quínoa (Verma *et al.*, 2019), harina de lentejas (Baugreet *et al.*, 2016; Baugreet *et al.*, 2017) y harina precocida de mandioca (Akwetey y Knipe, 2012).

Cuando se analizaron los resultados de elasticidad (**Figura 2.6c**) se encontró que los factores individuales *tipo de harina* y *relación agua/harina* resultaron significativos, al igual que todas las interacciones con excepción de la interacción *nivel de harina-relación agua/harina*. En general, para las hamburguesas con 15 % de harina agregada se encontraron los menores valores en el caso de emplear harina de porotos, aunque esta tendencia no fue observada cuando la adición fue de 8 %.

Las hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harina de legumbres presentaron valores de elasticidad entre 0,78 y 0,88 mm/mm, mientras que los obtenidos para el producto comercial (0,80 mm/mm) y para el control (0,84 mm/mm) estuvieron cercanos a los más bajos o intermedios de los productos híbridos.

En la **Figura 2.7 (a,b)** se presentan los resultados obtenidos para la masticabilidad y resiliencia en el análisis de perfil de textura realizado sobre hamburguesas híbridas.

La **masticabilidad** siguió una tendencia bastante similar a la dureza, como puede observarse en la **Figura 2.7a**, atribuido a que este parámetro es función de los otros tres (dureza x cohesividad x elasticidad), y que fue la dureza la que presentó la mayor variación relativa entre formulaciones. Para este parámetro, todos los factores y sus interacciones resultaron significativos.

Respecto al análisis de la **resiliencia** (**Figura 2.7b**) todos los factores individuales y sus interacciones resultaron significativos, con excepción de la interacción *nivel de harina-relación agua/harina*. En general, los menores valores de resiliencia se encontraron en las formulaciones con harina de porotos y lentejas (formulaciones P y L, respectivamente). Además, el agregado de agua disminuyó los valores encontrados.

El producto comercial presentó uno de los valores más bajos de resiliencia (0,32 J/J) mientras que fue intermedio para el control (0,36 J/J), en concordancia con los resultados obtenidos para la elasticidad debido a la estrecha relación entre ambos parámetros.

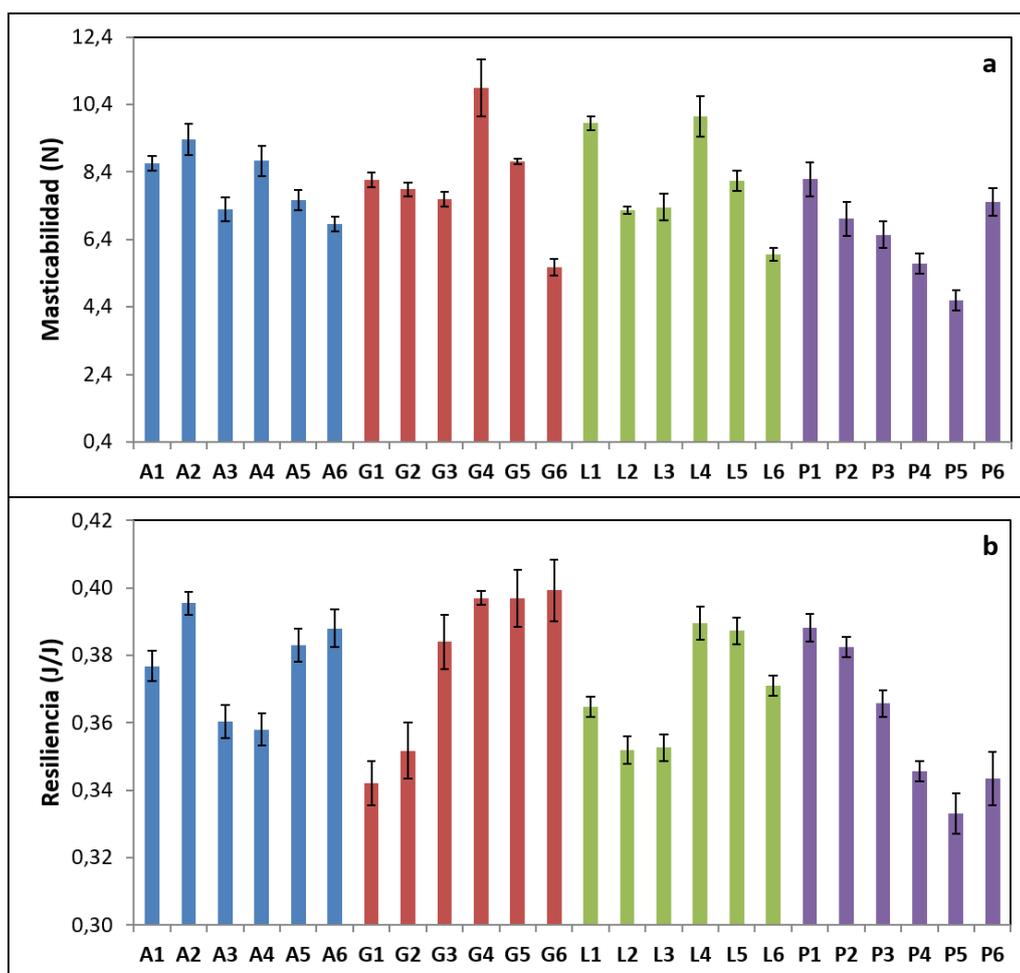


Figura 2.7. Parámetros del análisis de perfil de textura: **a)** masticabilidad, **b)** resiliencia de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas de legumbres (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**)

Se encontraron correlaciones positivas entre cohesividad y elasticidad ($R = 0.60$, $P < 0.001$), y entre resiliencia y cohesividad ($R = 0,85$, $P < 0,001$). La primera estaría relacionada con el hecho que ambos parámetros tienden a reflejar la fuerza y resistencia de los enlaces internos del producto. La segunda se relaciona con el hecho que la resiliencia es la tendencia de las muestras para recuperar su forma original luego de ser sometidas a la primer compresión: una muestra con valores altos de este parámetro, también presentará valores altos para la cohesividad, ya que el si el material resiste el primer ciclo sin desintegrarse, el valor será cercano a 1. Si bien la elasticidad y la resiliencia son parámetros que guardan cierta similitud, en muchos

casos sin embargo, los productos recuperan su altura luego de la compresión de manera diferente a la energía que ejercen para recuperar su forma.

Los resultados para los parámetros de textura en productos cárnicos similares descritos por otros autores son muy variados. Der (2010) observó que la incorporación de un 12 % de harina de lentejas micronizada en hamburguesas de carne vacuna baja en grasas no tuvo efecto en su dureza, pero si disminuyó la cohesividad respecto al producto sin el agregado. Albarracín, Acosta y Sánchez (2010) observaron incrementos en dureza y disminución en cohesividad y elasticidad al incorporar harina de porotos al 6 y 9 % en salchichas escaldadas. Holliday *et al.* (2011) reportaron que el agregado de harina de lenteja verde en dos niveles (42,5 y 50 %) en hamburguesas de carne vacuna con 20 % de grasa resultaron más blandas comparadas con un control sin el agregado de la harina. Una tendencia similar fue encontrada por Shariati-levari *et al.* (2016) con el agregado de harina de garbanzos y lentejas verdes. Motamedi *et al.* (2015) ensayaron el agregado de harina de garbanzos y lentejas en hamburguesas en tres niveles (4, 8 y 12 %). Los resultados indicaron que la dureza y masticabilidad aumentaban conforme aumentaba el contenido de harina, en comparación con el control. Baugreet *et al.* (2017) formularon hamburguesas de carne vacuna con el agregado de harina de lentejas en dos niveles, 3 y 7 %, encontrando para ambas formulaciones valores de dureza y cohesividad menores que los correspondientes a la formulación control. Aslinah *et al.* (2018) incorporaron harina de poroto adzuki (*Vigna angularis*) en albóndigas de carne vacuna reducidas en grasas, encontrando que el agregado de la harina aumentó los valores de dureza y masticabilidad.

Por lo tanto, existe un rango muy amplio de resultados posibles de textura que depende del sistema, del tipo de legumbre y de la forma de su incorporación.

En la **Figura 2.8 (a,b,c)** se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de color.

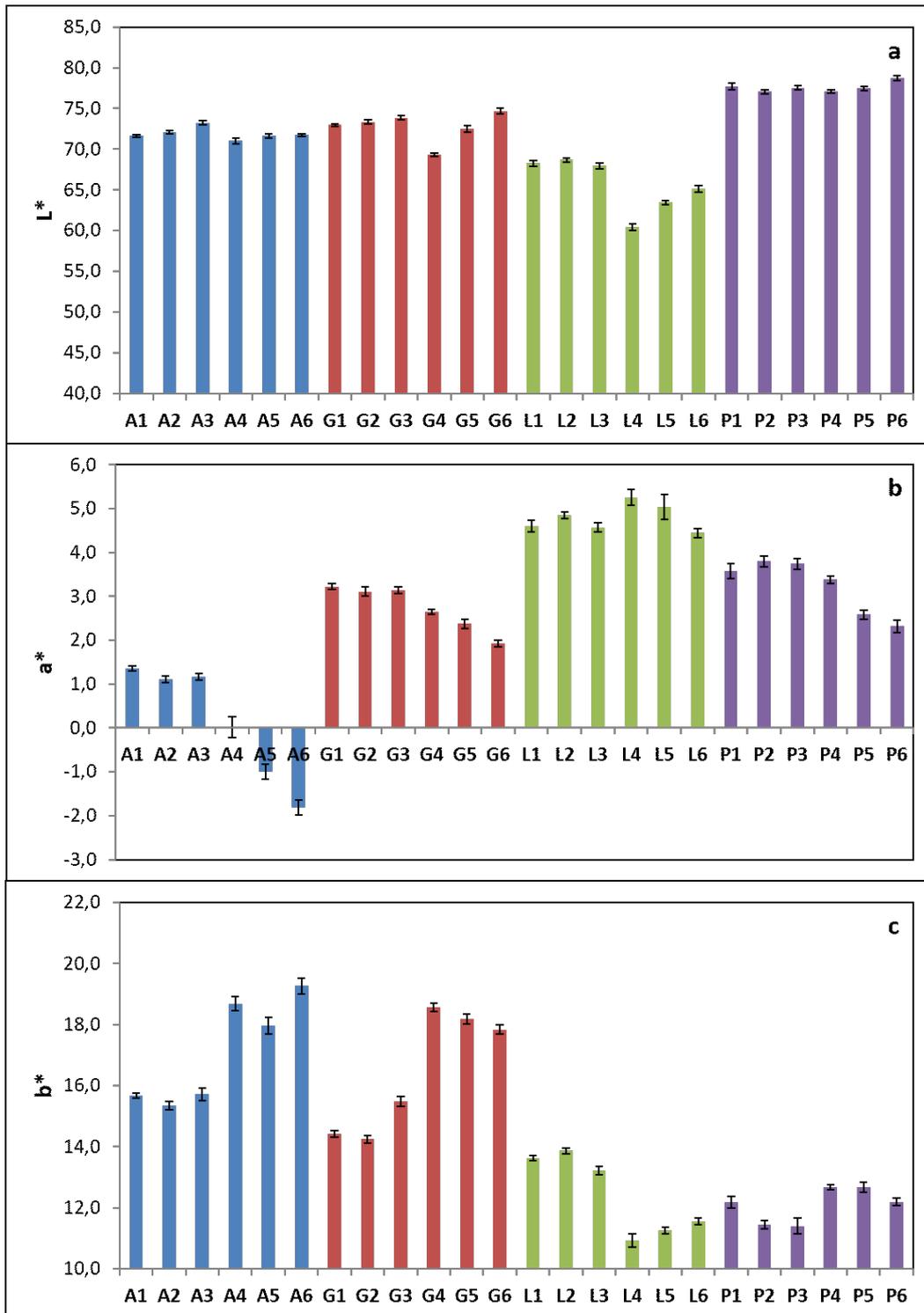


Figura 2.8 Parámetros de color a) L*, b) a* y c) b* de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harinas de legumbres (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**)

Al analizar los resultados obtenidos para la luminosidad L^* (**Figura 2.8a**), todos los factores y sus interacciones resultaron significativos. Se pudo observar una cierta tendencia de que hamburguesas con harina de lentejas en ambos niveles, 8 y 15 % (formulaciones L 1-6) presentaron los menores valores de L^* , mientras que las que contenían harina de porotos en ambos niveles (formulaciones P 1-6) mostraron los valores mayores. En general también se observó que, respecto al *nivel de harina* adicionada, los mayores valores de L^* se obtuvieron para 8 %, y con el factor *relación/agua harina*, mayores L^* fueron obtenidos conforme aumentaba la relación. Los valores de L^* para el control (66,00) y el producto comercial (70,08) resultaron entre los más bajos, similares a las formulaciones con harina de lenteja (formulaciones L).

De acuerdo al análisis de varianza para el parámetro a^* (**Figura 2.8b**), los tres factores individuales resultaron significativos y también las interacciones a excepción de la interacción *tipo de harina-relación agua/harina*. Las formulaciones con harina de arvejas (A) presentaron los menores valores de a^* , siendo las hamburguesas con 15 % y mayor relación agua/harina (formulación A6) las de resultados más bajos, alcanzando valores negativos (más verdoso) ($P < 0,05$). Esto estaría relacionado con la coloración que presentó la harina de arvejas caracterizada previamente (**Tabla 1.3**), en donde se observó que el parámetro a^* resultó el más bajo respecto a las demás harinas.

En general, todas las formulaciones con adición de 8 % de harina, resultaron con valores más altos de a^* , debido probablemente a la mayor proporción de carne y su aporte a este parámetro. Respecto al factor *relación agua/harina*, a medida que aumentaba la relación, disminuyó el valor de a^* . Asimismo, las diferencias entre 8 y 15 % se redujeron a medida que disminuyó la *relación agua/harina*.

Por otro lado, los mayores valores de a^* se obtuvieron en las formulaciones con harina de lentejas. La incorporación de harina de lentejas en ambos niveles y para todas las relaciones agua/harina resultó en valores de a^* mayores (más rojo) ($P < 0,05$) respecto a las hamburguesas con las otras harinas, pero comparables a los obtenidos para el control y el producto comercial (4,83 y 4,25, respectivamente) ($P < 0,05$). Esta coloración más rojiza obtenida en las hamburguesas con carne de cerdo y harina de lentejas sería atribuida al elevado contenido de carotenoides de esta leguminosa (Lee *et al.*, 2017). Las hamburguesas con carne de cerdo y harinas de arvejas, garbanzos y

porotos (formulaciones A, G y P) presentaron valores para el parámetro a^* inferiores al control y al producto comercial.

Cuando se analizó el parámetro de color b^* (**Figura 2.8c**) de hamburguesas híbridas, todos los factores y sus interacciones, con excepción de la interacción *nivel de harina-relación agua/harina*, resultaron significativos. En general los menores valores para b^* se encontraron en las formulaciones con harina de lentejas y porotos (formulaciones L y P), siendo este efecto mayor para el nivel de 15 %. El efecto de la *relación agua/harina* fue menos evidente.

El producto comercial presentó un parámetro b^* de 13,00, similar a las formulaciones con 8 % de harina de lentejas (L 1-3) y 15 % de harina de porotos (P 4-6), mientras que el control, con un $b^* = 15,12$, resultó similar a las formulaciones con 8 % de harina de arvejas y garbanzos (A 1-3 y G 1-3).

En la **Figura 2.9** se presentan las diferencias de color (ΔE) de hamburguesas híbridas respecto al producto comercial.

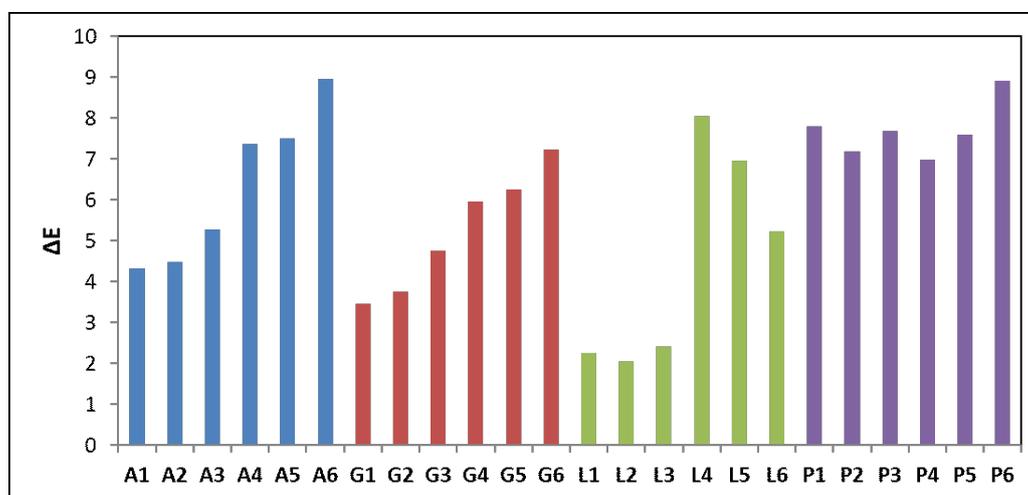


Figura 2.9 Diferencia total de color (ΔE) entre hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo respecto al producto comercial (A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos; formulaciones 1-6: códigos para el nivel de harina y agua según **Tabla 2.1**)

Cuando los tres parámetros de color fueron combinados en el cálculo de la diferencia total de color respecto al producto comercial, (**Figura 2.9**), se encontró que los productos que emplearon harina de lentejas al 8 % en reemplazo de carne de cerdo (formulaciones L1-3) presentaron la menor diferencia total de color, seguidas de las

hamburguesas elaboradas con harinas de garbanzos o arvejas al mismo nivel (formulaciones G1-3 y A1-3). De acuerdo a Mokrzycki y Tatol (2012), existe una correlación entre los valores de ΔE y las diferencias que puede observar un consumidor. Cuando ΔE toma valores entre 0 y 1, el observador no puede apreciar las diferencias entre ambos productos; cuando oscila entre 1 y 2 solo un observador experimentado puede notar las diferencias; entre 2 y 3,5 un observador sin experiencia puede notarlas; entre 3,5 y 5 la diferencia de color es clara y cuando es mayor a 5 cualquier observador puede distinguirlos como dos colores distintos. Según lo expuesto, todas las formulaciones serían reconocidas como diferentes por un observador inexperto e incluso algunas serían diferenciadas como de colores distintos.

El color es quizás el atributo más difícil de enmascarar a la hora de sustituir la carne por harinas de legumbres, ya que éstas presentan una coloración muy diferente a la de la carne. Además, el proceso de cocción también puede afectar los cambios de color generados por el agregado de la harina.

2.4.3 Análisis sensorial

Dado que todas las formulaciones estudiadas presentaron características tecnológicas (rendimiento, reducción de diámetro, textura, color) dentro de rangos adecuados o esperables para este tipo de productos, se seleccionó para cada tipo de legumbre la formulación con el mayor agregado de harina (15 %), y con una relación de agua/harina intermedia (por presentar dureza similar o levemente mayor a los controles) (1,6 g/g) (formulaciones P5, C5, L5, B5 según **Tabla 2.1**) a fin de realizar el análisis sensorial. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2.2**.

El análisis de los resultados obtenidos indicó que todos los productos obtuvieron puntajes aceptables (> 5) para apariencia, sabor, textura y aceptabilidad. Respecto al color, las hamburguesas con harina de arveja obtuvieron puntajes inferiores a 5, atribuido en parte quizás al desconocimiento por parte de los panelistas de los ingredientes y/o diferencias entre formulaciones.

Las observaciones realizadas por el panel sensorial fueron clasificadas dentro de tres grupos de acuerdo a su percepción sobre el producto: el primero correspondió a los que no les gusto (puntuación entre 1 y 4), el segundo al cual le resultó indiferente (puntuación de 5), y el tercero al grupo que le gustó (puntuación entre 6 y 9). El

porcentaje de panelistas que puntuaron cada propiedad entre 6 y 9 está dado entre paréntesis en la **Tabla 2.2**. Según esta clasificación entonces, más del 41,6 % de los panelistas expresaron que les gustó el sabor, el 61,1 % la textura, el 30,5 % el color, 36,1 % la apariencia y más del 44 % estaba de acuerdo con una buena aceptabilidad general para todas las formulaciones.

Estos resultados indicaron que los productos presentaron adecuados atributos de calidad sensorial. Para todos los parámetros sensoriales estudiados no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) con el tipo de harina empleada en los productos.

A partir de estos resultados se podría inferir que si en las hamburguesas se incluyera menor cantidad de harina en las formulaciones, como las formulaciones con 8 % estudiadas, los productos serían también bien aceptados por los consumidores.

Tabla 2.2: Evaluación sensorial de hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por 15 % de harinas de legumbres con una relación agua/harina de 1,6 g/g.

Atributo	Formulación*			
	A5	G5	L5	P5
Apariencia	5,17 ^a (36,1)	5,75 ^a (58,3)	5,14 ^a (44,4)	6,22 ^a (63,8)
Color	4,69 ^a (30,5)	5,44 ^a (52,7)	5,25 ^a (50)	6,00 ^a (61,1)
Textura	6,11 ^a (61,1)	6,43 ^a (72,2)	6,06 ^a (61,1)	6,08 ^a (72,2)
Sabor	5,78 ^a (58,3)	6,14 ^a (61,1)	5,00 ^a (41,6)	5,72 ^a (55,5)
Aceptabilidad	5,47 ^a (50)	6,06 ^a (66,6)	5,25 ^a (44,4)	5,78 ^a (52,7)
Dureza (%)**				
-1	13,9	25(0,28)	2,8	36,1(0,09)
0	80,6	69,4	86,1	55,6
1	5,6	5,6	11,1	8,3
Jugosidad (%)**				
-1	36,1(1,9)	25(1,6)	58,3(0,05)	30,6(0,01)
0	58,3	69,4	41,7	66,7
1	5,6	5,6	0	2,8

*A: arvejas, G: garbanzos, L: lentejas, P: porotos. Medias con distintos superíndices en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$). El porcentaje de panelistas que puntuaron cada propiedad entre 6 y 9 está dado entre paréntesis.

**Para la dureza y la jugosidad fueron agrupados los puntajes en tres: los que correspondían a puntajes <1 , se agruparon en -1 = más blando/jugoso que el ideal, 0 = adecuado, y los que correspondían a valores >1 en 1 = más duro/jugoso que el ideal. Entre paréntesis se indica la penalización cuando el porcentaje de casos fue mayor al 20%.

Respecto al sabor, dado que en estos productos solo se utilizó sal (NaCl) y no se incluyeron condimentos, el perfil de sabor aún podría ser ajustado con el agregado de distintas opciones en estudios posteriores.

Los consumidores consideran a la terneza y la jugosidad como los atributos de calidad más importante tanto en carne fresca como en productos cárnicos (Xiong, 2005). Por lo tanto, con la finalidad de realizar un análisis más minucioso del efecto de la incorporación de harinas de legumbres sobre la dureza y jugosidad de las hamburguesa se llevó a cabo el análisis de estos atributos mediante escala JAR y análisis de penalizaciones.

Como se mencionó, la dureza es un parámetro de gran impacto en la aceptación del producto (Grasso y Jaworska, 2020) y es fácilmente comprensible su descripción. Además, dado que en el TPA los resultados para la dureza no diferían sustancialmente entre las formulaciones, se buscó indagar más allá del puntaje obtenido en la escala hedónica para la textura (percepción global que incluye a la dureza), cuál era la percepción de los consumidores respecto a lo que esperaban de ese parámetro.

Asimismo, se analizó la jugosidad con escala JAR, para evaluar si esta característica se podría relacionar con la medida instrumental del LLP, que resultó de menores valores en las hamburguesas híbridas respecto a ambos controles.

Los resultados obtenidos se incluyeron también en la **Tabla 2.2**. Mediante este análisis se confirmó que la dureza de los productos obtenidos con los distintos tipos de harina (A5, G5, L5, P5) fue aceptada dado que para las 4 formulaciones se obtuvieron altas proporciones de valores 0 (dureza adecuada), siendo mayores para formulaciones con harinas de arvejas y lentejas (A5 y L5), y algo menores para las que contenían harinas de garbanzos y porotos (G5 y P5), lo que indicó que entre el 55 y 86 % de los panelistas encontraron a la dureza de los productos como la adecuada. Asimismo, los valores de penalización para las formulaciones con harinas de garbanzos y porotos resultaron muy bajos (**Tabla 2.2**).

Respecto a la jugosidad, las respuestas obtenidas se centraron principalmente en considerarlas con la jugosidad adecuada o con una jugosidad más baja del ideal. Aunque predominaron las que encontraban la jugosidad como ideal, con excepción de la L5, las penalizaciones fueron bajas para todas las hamburguesas.

El LLP constituye una prueba objetiva de la medida de la jugosidad (Woodlley, 2014), y aunque ambos parámetros se hayan positivamente correlacionados (Mwove *et al.*, 2018), la relación no siempre es buena debido a la complejidad que presentan estos (Lyon y Lyon, 1990). Por lo tanto, los bajos valores obtenidos para el LLP de las hamburguesas híbridas respecto al control y al producto comercial indicarían una adecuada de jugosidad.

Cabe destacar que la cantidad de panelistas que puntuaron la jugosidad con valores extremos (-2 o 2) fue solo de 7, mientras que para la dureza fue solo uno.

Los bajos valores obtenidos para las penalizaciones para ambos parámetros indicarían que la dureza y la jugosidad no fueron atributos clave en la aceptación de los productos y que una mejora en éstos no conllevaría un aumento importante en la aceptación de los mismos, ya que la diferencia en la puntuación obtenida para la aceptabilidad general para los panelistas que evaluaron como “ideal” en el JAR y los que evaluaron como “más blandas/menos jugosas” fue pequeña.

Este análisis permitió concluir que, a pesar de estos productos presentaron diferencias significativas para la dureza instrumental (ensayo TPA) y para el LLP, no afectaron negativamente su aceptación sensorial.

Este tipo de productos híbridos podrían salvar la brecha entre los productos cárnicos y las alternativas sin carne, brindando un producto con buenas cualidades organolépticas.

2.5 CONCLUSIONES

Fue posible reemplazar parcialmente carne de cerdo por harina de diferentes legumbres en hamburguesas formuladas con aceite de girasol alto oleico obteniendo productos con elevados rendimientos, que conservaron adecuadamente su tamaño en la cocción y presentaron valores bajos de pérdidas de líquido por presión. La textura y el color, en general, estuvieron afectados por el tipo de harina, el nivel de la misma y la proporción de agua/harina adicionada, resultando en hamburguesas con mayor dureza y menor cohesividad respecto a su equivalente sin agregado de harina. Respecto a su evaluación sensorial presentaron adecuada aceptabilidad independientemente del tipo de harina adicionada.

Por lo tanto, mediante el reemplazo de hasta un 44,6 % de carne de cerdo por harina de legumbres en hamburguesas con aceite de girasol alto oleico fue posible obtener productos híbridos con características tecnológicas adecuadas.

CAPÍTULO 3

Variedades de porotos alubia del NOA. Caracterización fisicoquímica y funcional de sus harinas

RESUMEN

Argentina se ha posicionado mundialmente como un país exportador de materias primas, en su gran mayoría. Entre uno de sus productos más competitivos, el poroto se destaca por su calidad y altos valores nutricionales, por lo que ha logrado liderar las exportaciones en los últimos años. Dentro de las legumbres cultivadas en el país, el poroto representa el 80 % de la superficie sembrada total, y exporta más del 90 % de lo producido, siendo el consumo sólo de 250 g/habitante/año y de manera estacional; representando la región del NOA la principal zona de cultivo.

Las variedades de porotos desarrolladas son determinantes para el éxito del cultivo, por lo que una importante cantidad de ellas se renuevan año tras año, no solo debido a la necesaria rotación, sino al hecho de que enfermedades virales, bacterianas y fúngicas ponen en riesgo el potencial de producción. La evolución tecnológica facilitó una destacada transformación del sector, combinada con proyectos de mejoramiento genético orientados a continuar la búsqueda de materiales superiores con altos rendimientos, tolerantes a las principales enfermedades de la región, de buenas características agronómicas y de calidad comercial.

Una de las opciones de revalorización de la cadena productiva del NOA sería a través de la obtención de la harina de poroto como primer eslabón del agregado de valor para poder ser empleada como ingrediente funcional. Para esto, es necesario analizar previamente sus propiedades funcionales como así también su perfil nutricional para que resulte exitoso el posterior proceso de desarrollo del alimento al cual se incorpora.

Por lo tanto, se seleccionaron dos variedades genéticamente mejoradas del NOA de porotos alubia: Cerrillos y Paloma, y se analizaron diferentes propiedades y características y se compararon con una harina comercial equivalente.

Al analizar la morfología y el color de las semillas de ambas variedades, se encontró que las características eran similares. Se obtuvieron harinas a partir de la molienda de sus respectivos granos y se analizaron su composición proximal, propiedades funcionales y térmicas, presencia de compuestos bioactivos y de factores antinutricionales. Se evaluó además la microestructura y características espectrales de los componentes.

Se encontró que los contenidos de fibra dietaria total y de proteínas fueron similares en harinas de ambas variedades, mientras que la de Cerrillos presentó un contenido ligeramente mayor de lípidos y la de Paloma de cenizas. Sin embargo, las propiedades funcionales de las harinas no presentaron diferencias significativas entre las variedades. Al comparar estas con la harina comercial del **Capítulo 1**, se observó que si bien existieron algunas diferencias en la composición proximal, no se observaron en las propiedades funcionales. Respecto a los compuestos bioactivos, ambas harinas presentaron contenidos de clorofila b de más del doble de los de clorofila a, con similares niveles para las distintas clorofilas y carotenoides; los niveles de flavonoides y taninos también resultaron similares en ambas variedades. El contenido de compuestos polifenólicos totales fue mayor para la harina de poroto variedad Cerrillos, correlacionando con una mayor capacidad antioxidante evaluada por dos métodos. Asimismo, las variedades NOA resultaron de mayor contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante por DPPH respecto a la harina comercial. Respecto al contenido de fitoesteroles, la harina proveniente de la variedad Paloma presentó el mayor contenido de estigmasterol. Entre los tocoferoles, solo se detectó γ -tocoferol, siendo mayor en la harina proveniente de porotos variedad Cerrillos. En cuanto a los compuestos antinutricionales, en ambas harinas se detectó ácido fítico e inhibidor de tripsina, para el cual la harina de porotos Paloma presentó un contenido mayor.

Los espectros FTIR obtenidos presentaron los picos característicos para estos productos, mientras que los espectros de difracción de rayos X de las harinas de ambas variedades de porotos presentaron un patrón de almidón tipo C, encontrándose un similar grado de cristalinidad. En ambas harinas pudieron observarse gránulos de almidón de características morfológicas similares. En cuanto a las características térmicas, no se encontraron diferencias entre ambas variedades para las transiciones térmicas obtenidas.

A nivel mundial existe una tendencia generalizada a los cambios en las formas de vida y hábitos de consumo más saludables. Esto implica una oportunidad para revalorizar este cultivo, ya que desde esta perspectiva, el poroto argentino cuenta con potencial para el agregado de valor creando nuevos productos más sanos y adecuándose así a las nuevas demandas.

3.1 INTRODUCCIÓN

El sector legumbrero en Argentina es una de las principales actividades agrícolas, destacándose a los porotos como la cuarta economía regional por ser la legumbre de mayor peso en cuanto a los volúmenes de producción nacional, representando más del 80 % de la superficie cultivada total de legumbres. Es un cultivo de verano, de tipo extensivo y de ciclo corto que dura aproximadamente entre 90 y 100 días durante el período de lluvias más intensas, por lo que se ubica en zonas con una adecuada distribución de precipitaciones. En nuestro país se producen principalmente las variedades de porotos blanco y negro. En la campaña 2020/21 (MAGYP, 2021), aproximadamente el 38 % de la superficie sembrada con esta especie le correspondió al poroto alubia (blanco) mientras que el poroto negro representó el 40 %. El porcentaje restante abarcó variedades de menor relevancia: porotos colorados, ovals, coral, carioca, *cranberrys*, entre otros, los cuales constituyen nichos de mercado poco significativos para la producción nacional. Cabe señalar que Argentina es formadora de precio a nivel mundial en la especie poroto alubia debido a que la oferta exportable de nuestro país no coincide con la de los principales exportadores mundiales de este producto (Reginatto, 2018).

Originalmente, el cultivo de porotos estaba centrado entre las zonas de Metán (Salta) y Trancas (Tucumán), en una banda que no superaba los 100 kilómetros, con un poroto blanco traído por los inmigrantes, que con el tiempo tomaría denominación de origen ya que en el mundo se lo reconoce como “Alubia Argentino” (Vizgarra *et al.*, 2016). En la actualidad, el cultivo se encuentra expandido al noroeste desde el límite con Bolivia al norte de la provincia de Córdoba. La producción argentina de porotos se encuentra localizada en el NOA, siendo Salta el principal productor, seguido de Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero y Catamarca. La producción de legumbres salteña en la campaña 2019/2020 alcanzó un nivel 511 mil toneladas, casi la mitad de la producción nacional, donde el 92,5 % correspondió a porotos (Ministerio de Economía, 2021)

Como ya se mencionó en el **Capítulo 1** de esta Tesis, las legumbres tienen diversas características biológicas que contribuyen a mejorar la biodiversidad de las explotaciones agrícolas, constituyendo una opción sustentable para incluir en el esquema de rotación de cultivos que mejora el rendimiento de las variedades de

verano. La amplia diversidad genética permite seleccionar y cultivar variedades mejoradas. Esta diversidad es un atributo especialmente importante debido a que se pueden desarrollar variedades resistentes al clima para su uso en zonas propensas a las inundaciones, sequías y otros fenómenos meteorológicos extremos. Asimismo, tienen capacidad biológica para fijar su propio nitrógeno en el suelo y necesitan menos fertilizantes, tanto orgánicos como sintéticos, por lo que desempeñan un papel importante en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, al tiempo que favorecen la fertilidad del suelo.

En cuanto a la producción de porotos en Argentina, los factores que afectan la estabilidad de la producción y la productividad se relacionan con la variabilidad agroclimática de las distintas zonas de producción, los sistemas de cultivo y los demás cultivos que interactúan en los muy diversos sistemas productivos de la región. Las condiciones de sequía o el exceso de humedad, así como las altas temperaturas o la limitación de luz en ciertos períodos, ocasionan pérdidas de rendimiento y calidad y, además, son factores predisponentes para el desarrollo de enfermedades y plagas. Estos problemas de producción se intentan superar mediante el mejoramiento varietal, ya sea en su forma tradicional o mediante el uso de herramientas modernas como la biotecnología y utilización de germoplasma primitivo o silvestre. La producción del “alubia” tradicional es afectada por distintos tipos de virosis a pesar de la protección buscada con insecticidas de alto impacto ambiental, lo que ocasiona también daño, afectando la calidad comercial por reducción de tamaño del grano, brillo y color, incluido el manchado en distintas intensidades.

El mejoramiento genético del poroto se centra en dos líneas principales: mejoramiento de caracteres y mejoramiento de cultivares o varietal. Existen tres métodos tradicionales que se han usado para el mejoramiento varietal: selección, introducción e hibridación (García Medina, 1993).

El mejoramiento de poblaciones locales por selección individual de plantas con caracteres superiores deseados y desarrollo de líneas mejoradas ha sido un método común en el inicio del mejoramiento en muchos países de América. Este es el origen de la variedad de porotos tipo blanco grande denominada “Selección Cerrillos-INTA” (**Figura 3.2a**), inscripta en el año 1975 y obtenida por un trabajo de selección de 500 plantas en la zona núcleo de producción del sur de Salta en 1969; y finalmente como

compuesto masal de 11 líneas superiores seleccionadas y evaluadas desde 1972 en ensayos de rendimiento. Su difusión a través de la producción de semilla comenzó en 1977 y aún hoy ocupa el 60 % del área de poroto blanco.

En cuanto a la hibridación, este proceso requiere de cuatro etapas: evaluación de germoplasma, selección de progenitores, planificación de cruzamientos, evaluación y selección de poblaciones híbridas segregantes y líneas avanzadas. El cultivar denominado “Paloma” (**Figura 3.2b**) obtenido por hibridación fue liberado en el año 1994. Esta variedad fue seleccionada por presentar buena tolerancia a los patógenos y al estrés hídrico, además de buen potencial de rendimiento y buena calidad de grano (De Simone y Failde de Calvo, 2002).



Figura 3.2. Porotos alubia variedad: Cerrillos (a) y Paloma (b)

Los criterios de selección de variedades están relacionados con su resistencia a enfermedades, rendimientos, tasas de maduración, pero la información acerca de sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y calidad nutricional es aun escasa.

Nutricionalmente los porotos son reconocidos entre las legumbres como una buena fuente de proteínas, con un alto contenido de almidón, fibra dietaria (soluble e insoluble), vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, B6 y ácido fólico) y algunos minerales (calcio, magnesio, hierro, fósforo, potasio y zinc), como así también por ser ricos en flavonoides y polifenoles (Hayat *et al.*, 2013). El consumo de porotos contribuye a la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas/degenerativas, como la obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares, debido a los micronutrientes presentes (como el ácido fólico y el magnesio), y el alto contenido de

fibra y aminoácidos no esenciales (Campos-Vega *et al.*, 2018). Los porotos también presentan componentes considerados como “antinutricionales” como los inhibidores enzimáticos (de tripsina y α -amilasa), fitatos, compuestos fenólicos y taninos, saponinas, entre otros. Sin embargo, existen estudios donde se reporta que estos compuestos pueden tener efectos beneficiosos para la salud (Brouns, 2022; Choudhary *et al.*, 2021; Gitlin-Domagalska *et al.*, 2020; Oliveira de Lima *et al.* 2019; Rana *et al.* 2019; Tatipamula y Kukavica, 2021), por ello incluso se los han clasificado como compuestos bioactivos (Campos-Vega *et al.*, 2018).

Las enzimas proteolíticas, o proteasas, son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces peptídicos específicos en sus proteínas blanco. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Laskowski Jr y Kato, 1980). Las proteasas juegan un papel fundamental en casi todos los procesos biológicos. La digestión de proteínas de los alimentos, la apoptosis, coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular, son algunos de los procesos en los que estas moléculas participan escindiendo proteínas o pro-enzimas (Ivanov y col., 2006).

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido estudiados de la naturaleza son de origen proteico (Otlewski *et al.*, 2005). Son polipéptidos que inhiben la acción de proteasas y se encuentran extensamente distribuidos en diferentes tejidos de animales, plantas y microorganismos. Su actividad obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuros, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Turk y Bode, 1991; Iwanaga *et al.*, 2005; Rawlings *et al.*, 2016).

Las proteasas se encuentran agrupadas de acuerdo al aminoácido o grupo involucrado en el sitio activo: serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu), o un átomo metálico en metaloproteasas. Las proteasas de serina son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de péptidos y proteínas. Esta clase de enzimas incluye a la tripsina y quimotripsina, entre otras. Dentro del grupo de los inhibidores de serín proteasas se encuentran, como las familias más importantes en semillas de legumbres, los inhibidores de tipo Bowman-Birk (BBIs) y los inhibidores de tipo Kunitz. La principal diferencia entre estos dos tipos de inhibidores es el número de enlaces disulfuro que presentan: los BBIs suelen contener siete, mientras que la

mayoría del tipo Kunitz contienen solo dos. Además, estos últimos presentan un solo sitio reactivo, mientras que, en algunos BBIs, hay dos sitios. Independientemente de estas diferencias, ambas familias comparten un mecanismo similar de inhibición (Bendre *et al.*, 2018). Sin embargo, la particularidad del gran número de enlaces disulfuro en los de tipo BBIs le confiere una extrema termoestabilidad.

Dentro de los inhibidores de proteasas en legumbres, algunas variedades contienen ambos tipos, mientras que, en otras, solo está presente uno de ellos, por ejemplo, los BBIs en los porotos y lentejas son sólo los que están presentes (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018).

Si bien es conocida la inhibición de estos compuestos sobre la actividad de enzimas pancreáticas como tripsina y quimotripsina, reduciendo la digestión y absorción de proteínas, también se ha informado que presentarían efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, se ha descrito que este tipo de compuestos presentan actividad antiinflamatoria (Qi *et al.*, 2005), y que a través de esta propiedad, protegerían a las neuronas de la neurotoxicidad mediada por macrófagos activados (Li *et al.*, 2011). Además, han sido descritos como agentes antibacterianos, por inhibir proteasas bacterianas implicadas en varios procesos fisiológicos, o por interactuar con la pared celular o proteínas de membrana ocasionando cambios en la permeabilidad celular e inducir la muerte bacteriana (Supuran *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009). Incluso se ha encontrado evidencia basada en estudios epidemiológicos y en animales que indicaron que los inhibidores tipo Bowman-Birk podrían actuar como agentes anticancerígenos (Chen *et al.*, 2005; Mehdad *et al.*, 2016).

El ácido fítico (hexafosfato de inositol) es una sustancia presente en alimentos de origen vegetal. Está distribuido de manera uniforme en el cotiledón y asociado a proteínas en las legumbres (Reddy y Pierson, 1987; Sandberg y Svanberg, 1991). Constituye la principal forma de almacenamiento de fósforo en las semillas y se encuentra generalmente en forma de sales (Abdulwaliyu *et al.*, 2019) Se considera un antinutriente debido a su capacidad de interferir en la absorción intestinal y en la biodisponibilidad de diversos minerales debido a su alta afinidad por cationes polivalentes como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} y Ca^{2+} (Silva y Bracarense, 2016), debido a que, animales monogástricos como el hombre no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar los

minerales de la estructura del fitato. Sin embargo, también existen evidencias de la fuerte actividad antioxidante que presenta asociada a esta capacidad, especialmente el hierro, que actúa como pro-oxidante en la degradación oxidativa de lípidos (Brouns, 2021). Específicamente, se ha encontrado que el ácido fítico también muestra actividad protectora frente a lesiones hepáticas al disminuir el estrés oxidativo (Abdulwaliyu *et al.*, 2019). Por otro lado, modula las funciones del sistema inmune regulando la acción de los neutrófilos, aumentando la actividad de las células NK (del inglés, *natural killer*) y disminuyendo la expresión de interleucinas proinflamatorias y citocinas. También modula la apoptosis para proteger las células y prevenir el desarrollo de enfermedades (Silva y Bracarense, 2016). Karkle y Beleia (2010) estudiaron el efecto que producía el remojo y cocción en alimentos que contenían ácido fítico, revelando que el remojo disminuye la cantidad de ácido fítico mientras que la cocción no produce una mayor reducción en su cantidad.

La presencia de taninos en alimentos cobra relevancia ya que actúan como inhibidores de enzimas digestivas y pueden reducir también la palatabilidad de un alimento por la astringencia que producen al combinarse con las proteínas salivales. Ha sido también señalado que interfieren en la asimilación de la vitamina B1 (tiamina) (Janssen, 1997). Por otra parte, ciertas clases de taninos han sido asociadas con la reducción del riesgo de enfermedades coronarias (Gresele *et al.*, 2011; Kabagambe *et al.*, 2005).

En relación con el contenido proteico, el rango reportado en porotos es amplio (17,08 – 25,46 %) (Miles *et al.*, 2015), dependiendo de la variedad y condiciones ambientales. La fracción mayoritaria de las proteínas en los porotos, como se describió previamente en el Capítulo 1, son las globulinas seguidas por las albúminas. La fracción 7S es la principal proteína de reserva en las semillas de porotos (40–50 %), y representan la principal fuente de aminoácidos y de nitrógeno, desempeñando un papel clave durante el proceso de la germinación y el crecimiento temprano de la plantas, mientras que la fracción 11S solo aporta el 10 % del nitrógeno (Ganesan y Xu, 2017). Sin embargo, desde el punto de vista nutricional, presentan una baja digestibilidad (en su estado nativo) por ser pobremente degradadas por enzimas en el tracto gastrointestinal (Bessada *et al.*, 2019).

Respecto las prolaminas y glutelinas los porotos contienen una alta proporción de glutelinas (20 – 30%) en comparación con otras legumbres, que suelen presentar entre 7 y 15 % (Słupski, 2010).

En relación a los hidratos de carbono, éstos se encuentran en alta cantidad (55-75 g/100 g porotos), donde la fracción predominante es el almidón, pudiendo alcanzar casi el 50 % del peso de la semilla (Ganesan y Xu, 2017; Gouveia *et al.*, 2014, Hoover *et al.*, 2010) pero también incluye a la fibra dietaria y los oligosacáridos. Más del 50 % de la fibra presente es del tipo insoluble, compuesta principalmente por pectinas, pentosanos, hemicelulosas, celulosa y lignina (Ganesan y Xu, 2017). En comparación con los cereales (maíz, trigo, arroz), los porotos presentan cantidades considerablemente más altas de almidón resistente, que puede estar asociado con su mayor contenido de amilosa, con la longitud de las ramificaciones de amilopectina, grado de cristalinidad y tamaño de los gránulos (Los *et al.*, 2018). Además, el alto contenido de fibra así como la presencia de inhibidores de amilasa y fitatos, también pueden contribuir a disminuir la tasa y grado de digestibilidad del almidón (Hayat *et al.*, 2014).

En cuanto al contenido lipídico, los porotos presentan niveles más bajos respecto a otras legumbres, no excediendo el 2 %. Se caracterizan por poseer alta proporción de ácidos grasos insaturados, siendo el ácido linolénico (C18:3 n-3) y el linoleico (C18:2 n-6) los principales (62 – 83 % del total), seguidos por palmítico (C16:0) y oleico (C18:1 n-9) (Chen *et al.*, 2015). Esta alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados n-3, está asociada con una relación n-6/n-3 baja, que resulta beneficiosa para la salud (Sanhuesa Catalán *et al.*, 2015; Khrisanapant *et al.*, 2019). Además de ser fisiológica y bioquímicamente esenciales para las funciones corporales, también juegan un papel importante en el desarrollo de tejidos sanos (Gomez-Candela *et al.*, 2011).

3.2 OBJETIVOS

Sobre **dos variedades de porotos alubia** agronómicamente mejoradas, desarrolladas en INTA Cerrillos (Salta) se buscó:

- estudiar las características morfológicas y de color de las semillas.

Sobre las **harinas** obtenidas a partir de las mismas variedades se propuso:

- analizar sus características fisicoquímicas, incluyendo su composición proximal, color, contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.
- evaluar el contenido de ácido fítico e inhibidor de tripsina.
- analizar sus propiedades funcionales y térmicas.
- evaluar su microestructura y características espectrales de componentes.
- comparar los resultados con los obtenidos para la harina comercial.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

Se trabajó con dos variedades genéticas distintas de porotos alubia, "Selección Cerrillos-INTA" y "Paloma", a los que denominaremos en este trabajo de Tesis como "Cerrillos" y "Paloma", respectivamente, y aportadas desde el Proyecto Nacional de Mejoramiento de Legumbres de INTA Cerrillos (INTA, Estación Experimental Agropecuaria Salta, Cerrillos, Salta). Los cultivos se realizaron en microparcelas (porciones de tierra independientes) conteniendo 5 hileras de 5 m de largo con 50 cm de separación entre ellas, bajo similares condiciones climáticas (Cwa/Cwb según clasificación de Köppen), y bajo prácticas agronómicas normales con mínimo uso de agroquímicos para conservar el material genético local y evitar pérdidas agronómicas.

Los porotos (3 kg de cada variedad) se limpiaron y clasificaron para eliminar polvo y granos defectuosos, y se envasaron en bolsas de polietileno a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

3.3.2 Caracterización morfológica y de color de porotos

Los consumidores tienen diferentes preferencias de combinaciones de tamaño, forma y color, y éstos representan los parámetros principales cuando realizan la elección de compra de porotos. A nivel industrial, el tamaño, la forma y el color, son

importantes características en los procesos de limpieza, clasificación, almacenamiento y proceso, pero también porque estos parámetros determinan la calidad de los granos y eso se relaciona con el mercado al que pueden ser comercializados. Además, el color de la superficie de los porotos está relacionado con la presencia de ciertos compuestos y su concentración, como los glicósidos de flavonoles, antocianinas y taninos condensados (Beninger y Hosfield, 2003).

3.3.2.1 Morfología

Para cada cultivar se seleccionaron al azar 25 porotos para medir su largo (L), ancho (A), y espesor (E) empleando un calibre digital con lectura a 0,01 mm (SC111201, Schwyz SA, Suiza).

Se calcularon el diámetro equivalente (DE), esfericidad (ϕ), volumen (V), área superficial (A) y relación de aspecto (RA) de las semillas según las siguientes ecuaciones (Wani *et al.*, 2017):

$$DE = (LAE)^{1/3} \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$\phi = [(LAE)^{1/3}/L] \times 100 \quad \text{Ec. 3.2}$$

$$V = \pi B^2 L^2 / 6(2L - 3), \text{ con } B = (AE)^{1/2} \quad \text{Ec. 3.3}$$

$$A = \pi B^2 L^2 / 2L - B \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$R_A = A/L \quad \text{Ec. 3.5}$$

La forma de los alimentos generalmente está definida por dos parámetros: la esfericidad y la relación de aspecto. La esfericidad es una expresión utilizada para la descripción de la forma de sólidos no esféricos. Se define como la relación entre la superficie exterior de la partícula y la superficie de la esfera con el mismo volumen que la partícula. Mientras que la relación de aspecto se define como el cociente entre las dimensiones máximas y mínimas de una partícula, lo que es un indicativo de su tendencia a tener forma oblonga (Omobuwajo *et al.*, 1999). Valores mayores a 70 %

para la esfericidad y a 0,7 para la relación de aspecto, implican que el grano tiene una forma similar a una esfera y que tiende a rodar más que a deslizarse (Singh y Chandra, 2014).

3.3.2.2 Color

El color de la superficie de las semillas se determinó mediante imágenes de las mismas obtenidas con una cámara digital y el procesamiento con un software acoplado (Goñi y Salvadori, 2017). El sistema emplea un patrón de color X-Rite ColorChecker (X-Rite Inc., Grand Rapids, Michigan, EE.UU.) que permite ajustar un modelo empírico de conversión entre el espacio de color RGB de la cámara y el espacio de color CIE-Lab empleado para caracterizar las muestras.

3.3.3 Obtención de harinas de porotos

A partir de granos enteros, limpios, secos y con sus cubiertas se obtuvieron las respectivas harinas con un molino ciclónico (3010-030 UDY Corporation, Fort Collins, CO, EE.UU.) utilizando una malla de 1 mm. Las harinas obtenidas fueron almacenadas herméticamente en bolsas de polietileno (Maraflex, Bemis, Argentina) al abrigo de la luz y del calor hasta su análisis.

3.3.4 Composición proximal, pH, color y propiedades funcionales de harinas de porotos

La determinación de la composición proximal se llevó a cabo evaluando el contenido de humedad, cenizas, lípidos, proteínas, fibra dietaria total e hidratos de carbono disponibles, según lo descrito en la sección **1.3.2.1**. Para la medida del pH de dispersiones al 10 % de las distintas harinas se siguió el protocolo descrito en la sección **1.3.2.2**.

Las mediciones de color se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección **1.3.2.3**.

Se determinaron la capacidad de absorción de agua (CAA) y de aceite (CAAc), la actividad emulsificante (AE), la estabilidad de emulsión (EE), y la concentración mínima de gelificación (CMG) de las harinas de porotos según lo descrito en la sección **1.3.3**.

3.3.5 Cuantificación de compuestos bioactivos en las harinas de porotos

3.3.5.1 Pigmentos

Se midieron los contenidos de clorofilas (clorofilas a y b) y carotenoides, en extractos de las harinas utilizando un espectrofotómetro (T-60 Vis spectrophotometer, PG Instrument, Reino Unido) de acuerdo con el trabajo de Lichtenthaler (1987). Se obtuvieron extractos a partir de harinas de ambas variedades (0,5 g), por duplicado, utilizando acetona:agua (80:20 v/v) como solvente (2,5 ml) agitando durante 15 s en vórtex y centrifugando a 5500 g, 5 min (Centrífuga CM2036, Rolco, Buenos Aires, Argentina). Se retiraron y reservaron los sobrenadantes, repitiendo el proceso de extracción sobre los residuos obtenidos y combinando finalmente los sobrenadantes. Se midió la absorbancia (A) de los extractos a tres longitudes de onda 663,2; 646,8 y 470 nm. El contenido de los pigmentos en los extractos fue calculado de acuerdo a las **Ecuaciones 3.6-3.9** y luego expresado en función de las harinas ($\mu\text{g/g}$ harina).

Clorofila a:	$Ca = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$	Ec. 3.6
Clorofila b:	$Cb = 21,50 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2}$	Ec. 3.7
Clorofilas totales (a+b):	$C(a+b) = 7,15 \times A_{663,2} + 18,71 \times A_{646,8}$	Ec. 3.8
Carotenoides totales (x+c):	$C(x+c) = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times Ca - 85,02 \times Cb) / 198$	Ec. 3.9

3.3.5.2 Flavonoides y taninos

Para las determinaciones de flavonoides y taninos se obtuvieron extractos de acuerdo a la metodología propuesta por Xu y Chang (2007) empleando acetona:agua (80:20 v/v) como solvente de extracción. Para cada harina, se mezclaron 0,5 g con 5 ml de solvente, se agitaron durante 3 h a temperatura ambiente y a resguardo de la luz, y luego se mantuvieron en reposo durante 12 h. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min (Centrífuga CM2036, Rolco, Buenos Aires, Argentina), se separó el sobrenadante y sobre el residuo se repitió todo el proceso de extracción. Los sobrenadantes obtenidos fueron combinados y almacenados a 4 °C hasta su análisis.

La determinación del *contenido de flavonoides* se realizó a través de la técnica descrita por Heimler *et al.* (2005). Sobre 0,25 ml de extracto de cada una de las harinas se adicionaron agua desionizada (1,25 ml) y NaNO_3 5 % p/v (0,075 ml). Luego

de 6 min de reposo, se añadieron 0,15 ml de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 % p/v) y transcurridos 5 min, se incorporaron 0,5 ml de NaOH 1 M. La mezcla se agitó y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm. Los resultados fueron calculados y expresados como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra (mg EC/g harina) utilizando una curva de calibración de (+)-catequina.

La estimación cuantitativa de *taninos* se realizó utilizando el método descrito por Julkunen-Tiitto (1985). El método se basa en la capacidad de taninos condensados para reaccionar con la vainillina en medio ácido para producir un color rojo. Sobre 0,5 ml de extracto de cada una de las harinas se adicionaron 3 ml de una solución 4 % de vainillina/metanol y 1,5 ml de HCl concentrado (30 %), dejando reaccionar al resguardo de la luz durante 20 min. Luego se midió la absorbancia a 500 nm empleando metanol como blanco. Los resultados se expresaron en términos de mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de harina (mg EC/g harina) utilizando una curva de calibración de (+)-catequina.

3.3.5.3 Compuestos polifenólicos totales y capacidad antioxidante

Las metodologías utilizadas para obtener los extractos y para las determinaciones de los compuestos polifenólicos totales y la capacidad antioxidante (métodos de DPPH y ABTS) corresponden a las descritas en la sección **1.3.3.3**.

3.3.5.4 Fitoesteroles y tocoferoles

El contenido de fitoesteroles y tocoferoles presentes en las harinas de porotos fue determinado de acuerdo con Duong *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Se realizaron extractos a partir de 25 g de harina mediante método de Folch (Folch *et al.*, 1957). La fase lipídica fue saponificada con 5 ml de KOH 2,5 M a 80 °C por 30 min con agitación continua. La mezcla fue enfriada y enjuagada repetidas veces con agua destilada y HCl 4 M. La fase orgánica fue separada y el solvente eliminado en rotavapor. Los extractos obtenidos fueron derivatizados por resuspensión en 0,3 ml de piridina, 0,3 ml BSA (N,O-bis (trimetilsilil) acetamida) y 0,4 ml de cloroformo, y reacción a 80 °C por 30 min.

Los extractos derivatizados fueron analizados por cromatografía de gases con detector de ionización de llama, GC-FID (Agilent Technologies, 7890A, EE.UU.)

utilizando una columna HP-5 (fenilo al 5 %, dimetilpolisiloxano al 95 %, 30 m, 0,320 mm, 0,25 μm espesor de relleno), con relación de inyección *Split* de 1:30 a 260 °C, utilizando hidrógeno como gas transportador. La temperatura inicial de la columna fue 50 °C, se mantuvo por 30 s, se calentó a una velocidad de 20 °C/min hasta los 320 °C y se mantuvo durante 10 min más, con un flujo de 1,4 ml/min. La identificación y cuantificación de fitoesteros (campesterol, β -sitosterol, estigmasterol) y tocoferos (α -, δ -, y γ -tocoferol) se realizó empleando curvas de calibración obtenidas para cada estándar (Sigma-Aldrich, CABA, Argentina) considerando sus tiempos de retención y áreas bajo las curvas. Los resultados para cada uno se expresaron como mg/100 g harina.

3.3.6 Compuestos antinutricionales en las harinas de porotos

3.3.6.1 Ácido fítico

Latta y Eskin (1980) desarrollaron el método espectrofotométrico para la determinación de fitatos, el cual se basa en la decoloración de un complejo púrpura entre el ion férrico y el ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,03% y ácido sulfosalicílico al 3%) producido en presencia del fitato y con un máximo de absorción a 500 nm. En presencia de fitato, el hierro se une al éster de fosfato y no está disponible para reaccionar con el ácido sulfosalicílico, lo que resulta en una disminución de la intensidad del color rosa.

Vaintaub y Lapteva (1988) han demostrado que no se requiere la separación preliminar del fósforo inorgánico presente en el material vegetal a través de una columna de intercambio y que este método puede realizarse directamente sobre los extractos crudos, por ser considerablemente más bajo que la cantidad de fitatos en las muestras ensayadas.

Se obtuvieron extractos de las harinas según Belmiro *et al.* (2020) en HCl 2,4 % con agitación durante 14 h y posterior centrifugación. El contenido de fitatos se determinó sobre diluciones apropiadas de los sobrenadantes obtenidos. Los resultados se expresaron como mg de ácido fítico/g harina, utilizando una curva de calibración correspondiente, y realizando la conversión entre el fitato de sodio a ácido fítico.

3.3.6.2 Inhibidor de tripsina

Se realizó según método AOCS (*American Oil Chemists' Society*) Ba 12a-2020 descrito por Liu *et al.* (2021). En este método se emplea el sustrato sintético BAPA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanalida hidrocloreuro), el cual es hidrolizado por la tripsina produciendo p-nitroanilina, un compuesto de color amarillo, cuya producción se puede seguir por medida de la absorbancia a 410 nm. La presencia de inhibidores de tripsina en una muestra de interés se puede evaluar midiendo la disminución de velocidad de conversión de BAPA en p-nitroanilina cuando se emplea una cantidad fija de la enzima comercial.

Las muestras de harina fueron tamizadas con malla 50, equivalente a una abertura de 300 μm de diámetro o menor. A 1 g de cada harina se agregaron 50 ml de NaOH 10 mM dejando con agitación a 500 rpm por 3 h a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron centrifugadas por 10 min (10000 rpm) (Centrífuga RC 5B, Sorvall, Alemania) reservándose los sobrenadantes.

Se realizaron diluciones de los sobrenadantes obtenidos de modo que 1 ml de cada uno lograra una inhibición de la actividad de la tripsina de entre un 40 y 60 %. Se utilizó una solución patrón de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y como sustrato una solución de BAPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). El producto de reacción de color amarillo se cuantificó a través de la absorbancia a 410 nm. La actividad de inhibición de la tripsina fue expresada como unidades inhibidoras de tripsina por mg de harina (UIT/mg harina).

3.3.7 Microestructura de harinas y análisis elemental por SEM-EDS

La microestructura de las harinas de porotos fue evaluada con un microscopio electrónico de barrido (SEM, FEI Quanta 200, EE.UU.). Las muestras fueron colocadas sobre tacos de aluminio empleando cinta doble contacto y metalizadas con capa de oro bajo vacío. Se procesaron duplicados de cada variedad y para cada uno se observaron varios campos. Para la determinación del tamaño de los gránulos de almidón se utilizó el *software* ImageJ (National Institutes of Health, Stapleton, NY, EE.UU., disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), midiendo al menos 10 gránulos por campo.

Para la estimación del contenido mineral en las harinas se utilizó la técnica de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, también abreviada EDX o XEDS). Es una técnica analítica que permite la caracterización química y/o análisis elemental de materiales. Una muestra excitada por una fuente de energía (como el haz de electrones de un microscopio electrónico) disipa parte de la energía absorbida expulsando un electrón del núcleo. Un electrón de una capa exterior de mayor energía continúa ocupando su posición, liberando la diferencia de energía como un rayo X que tiene un espectro característico basado en su átomo de origen. Esto permite el análisis de composición de un volumen de muestra específico excitado por la fuente de energía. La posición de los picos en el espectro identifica el elemento, mientras que la intensidad de la señal corresponde a la concentración del elemento.

3.3.8 Análisis por Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR) sobre harinas de porotos

Las técnicas de espectroscopia vibracional, que incluyen tanto la espectroscopia Raman como la de infrarrojo, son herramientas muy eficaces para el estudio de la estructura y la reactividad molecular, tanto en moléculas de pequeña dimensión como en biomoléculas más complejas. La espectroscopia de infrarrojos (IR) se basa en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética, en el rango infrarrojo del espectro, con la materia. Dependiendo del rango de energía de la radiación que sea utilizada, la interacción con el material será de diferente naturaleza. Al absorber la radiación infrarroja, las moléculas pueden cambiar su estado de energía vibracional y rotacional. En el caso de muestras sólidas y líquidas, sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional, lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto.

La técnica de FTIR-ATR proporciona una buena alternativa para la detección de los componentes mayoritarios de manera rápida, no destructiva ni invasiva, confiable y efectiva que puede ser utilizada en una amplio rango de matrices alimentarias (Candoğan *et al.*, 2021; Cozzolino, 2014; Dong *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2020).

Se registraron 3 espectros FTIR-ATR para cada harina en modo de transmisión en el rango 4000-500 cm^{-1} . Cada espectro resultó del promedio de 32 escaneos con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . La adquisición de datos se realizó con el *software*

OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, EE.UU.) en un espectrómetro Nicolet Thermo iS10 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.).

3.3.9 Espectroscopia de difracción de Rayos X de harinas de porotos

Los rayos X son una radiación electromagnética con una longitud de onda típica entre 0,1 y 1 nm, longitud comparable a los espaciamientos moleculares en un cristal. Cuando un haz de rayos X incide en un cristal, el cual es mantenido en un montaje especial que permite su rotación con respecto al haz incidente, ocurre una difracción. Los rayos difractados se registran a fin de obtener información de la estructura del cristal (Jovanovich, 1997).

El análisis de difracción de rayos X de ángulo amplio (WAXS) fue realizado empleando un difractómetro de Rayos X (Xeuss 1.0, Xenocs, Grenoble, Francia) con un detector Pilatus100K (Dectris, Suiza) y una fuente de rayos X de Cu-K α 1.2 ($\lambda = 1.54178$ Å). Los ensayos se realizaron en configuración de transmisión con una distancia muestra-detector fija de 97.68 mm a temperatura ambiente, la exploración de ángulos 2θ se realizó en un rango de 5 a 40°, a una velocidad de 3 repeticiones de 900 s cada una y tamaño de paso de 0,1°. Se utilizaron bases de aluminio para las muestras. Los difractogramas obtenidos se analizaron con el software OriginPro 9.0 Software (OriginLab Corporation, Massachusetts, EE.UU.).

Para la cuantificación de la cristalinidad se utilizó una adaptación del método propuesto por Hermans y Weidinger (1948) para materiales semicristalinos, en el cual se evalúa la relación del área de los picos (que se atribuye a las regiones cristalinas) respecto al área total del difractograma, ambas estimadas mediante integración. El grado de cristalinidad se calculó entonces como:

$$\text{Grado de cristalinidad (\%)} = \frac{A}{\text{Área total}} \times 100 \quad \text{Ec. 3.10}$$

Donde A corresponde al área de los picos de difracción determinada mediante el procesamiento de los difractogramas.

3.3.10 Propiedades térmicas de harinas de porotos

Se realizó un análisis de las transiciones térmicas de las harinas de porotos mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (TA Instruments, Delaware, EE.UU.). Una hora antes de efectuar el análisis, se pesaron aproximadamente 10 mg de cada muestra en cápsulas de aluminio, se agregó agua desionizada en relación 1:3 p/v y se sellaron las cápsulas. Una cápsula vacía fue empleada como referencia.

El programa de calentamiento estuvo comprendido entre 25 y 120 °C y la velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min. A partir de los termogramas se estimaron las temperaturas (°C) de *onset* (T_o), de pico (T_p) y final (T_f) de la transición, así como la entalpía (ΔH) correspondiente al área de los picos, expresada como J/g harina en base seca.

3.3.11 Análisis estadístico

Procedimientos estadísticos tales como análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones pareadas de medias se llevaron a cabo mediante el software Infostat v2009 (Infostat 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó el ensayo de Tukey para estudiar las comparaciones pareadas de medias. Las diferencias entre medias y ensayos F se consideraron significativas cuando las probabilidades estimadas fueron inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Los resultados experimentales se informaron como valor medio y error estándar de la media entre paréntesis.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Morfología y color de porotos

Los resultados obtenidos para la caracterización morfológica y de color de las variedades de porotos se presentan en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Característica morfológicas y de color de variedades de porotos alubia.

	Cerrillos	Paloma
Largo (mm)	16,33 ^a (0,15)	16,03 ^a (0,33)
Ancho (mm)	7,49 ^b (0,11)	7,91 ^a (0,15)
Espesor (mm)	6,45 ^a (0,09)	6,55 ^a (0,06)
Diámetro equivalente (mm)	9,24 ^a (0,08)	9,39 ^a (0,11)
Esfericidad (%)	56,59 ^a (0,60)	58,74 ^a (0,88)
Relación de aspecto	0,46 ^b (0,01)	0,50 ^a (0,01)
Volumen (mm³)	227,62 ^a (5,78)	240,15 ^a (8,20)
Área superficial (mm²)	226,52 ^a (3,68)	233,77 ^a (5,50)
L*	84,4 ^a (2,7)	84,5 ^a (3,2)
a*	0,62 ^a (0,8)	0,75 ^a (0,9)
b*	6,2 ^a (1,4)	5,7 ^a (1,6)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Para la mayoría de los parámetros relacionados con el tamaño no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las variedades de porotos. El ancho varió significativamente entre 7,49 mm Cerrillos y 7,91 mm para Paloma, mientras que el largo y el espesor promediaron los 16,18 y 6,50 mm, respectivamente.

Según los resultados obtenidos para relación de aspecto, inferiores a 0,70, y para esfericidad, inferiores a 70 %, las semillas de ambas variedades presentarían tendencia a deslizar más que a rodar. Se encontraron diferencias significativas para la relación de aspecto entre las variedades, asociadas quizá a las diferencias observadas para el ancho. En cuanto al volumen y el área superficial no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre variedades.

Como puede observarse en la **Tabla 3.1**, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros de color entre las variedades de porotos ($P > 0,05$), presentando valores para la luminosidad de 84,5 cercanos a cero para a* (valor medio: 0,68) y para b* un valor medio de 5,95.

Si bien las variedades analizadas presentan diferencias en su genotipo, esto no repercutió en sus características de color, y respecto al tamaño, las diferencias encontradas fueron mínimas.

3.4.2 Composición, pH, color y propiedades funcionales de las harinas de porotos

En la **Tabla 3.2** se presentan los resultados obtenidos para el pH, la composición proximal, el color y las propiedades funcionales de las harinas obtenidas a partir de porotos alubia variedades Cerrillos y Paloma.

Tabla 3.2 Composición proximal, pH, color y propiedades funcionales (CAA: Capacidad de absorción de agua, CAAC: Capacidad de absorción de aceite, CMG: Concentración mínima de gelificación, AE: Actividad emulsificante, EE: Estabilidad de emulsión) de harinas de porotos alubia variedades Cerrillos y Paloma.

	Cerrillos	Paloma
pH	6,62 ^a (0,03)	6,57 ^a (0,02)
Proteínas (g/100 gbs)	22,1 ^a (0,4)	24,9 ^a (0,7)
Lípidos (g/100 gbs)	1,33 ^a (0,01)	1,26 ^b (0,01)
Cenizas (g/100 gbs)	4,96 ^b (0,002)	5,08 ^a (0,02)
Fibra dietaria total (g/100 gbs)	26,6 ^a (0,6)	27,9 ^a (0,2)
Carbohidratos disponibles	45,1	40,9
L*	93,8 ^a (0,3)	93,2 ^a (0,4)
a*	-0,179 ^a (0,005)	-0,26 ^b (0,02)
b*	7,9 ^a (0,1)	8,1 ^a (0,2)
CAA (g agua/g)	1,40 ^a (0,02)	1,62 ^a (0,03)
CAAC (g aceite/g)	0,72 ^a (0,01)	0,701 ^a (0,007)
CMG (% p/v)	14	12
AE (%)	64 ^a (1)	68,2 ^a (0,9)
EE (%)	87,4 ^a (0,7)	86,3 ^a (0,6)

Humedad (%): 10,41^a±0,07 para la variedad Cerrillos y 9,27^b±0,07 para la variedad Paloma. Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas (P < 0,05).

No se encontraron diferencias en los valores de pH evaluados sobre las dispersiones de las harinas, los que resultaron levemente superiores al obtenido para la harina comercial (6,42), caracterizada en el **Capítulo 1 (Tabla 1.4)**. Alves *et al.* (2019) encontraron valores de pH similares para otras variedades: 6,29 para harina de grano entero de poroto tipo Carioca (variedad gateada) y 6,47 para la variedad “manteca” (*Phaseolus lunatus* L.).

El contenido de humedad de las harinas obtenidas de las variedades de porotos INTA fue significativamente diferente (P < 0,05), siendo superior para Cerrillos respecto a Paloma.

Cuando se analizó la composición de las harinas en base seca, no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de fibra dietaria total y de proteínas (P > 0,05) para ambas variedades. Se encontró además, que la variedad Cerrillos presentó

un contenido ligeramente mayor de lípidos, mientras que Paloma mostró un contenido algo mayor de cenizas (**Tabla 3.2**). Al comparar estos resultados con los obtenidos para la harina comercial de porotos blancos (**Tabla 1.4**) no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la variedad Paloma y la harina comercial para el contenido de lípidos (media 1,23 g/100 gbs) ni entre el contenido de proteínas de la variedad Cerrillos y la harina comercial (media 19,05 g/100 gbs). Respecto a la fibra dietaria total, las harinas de Paloma y Cerrillos presentaron un nivel significativamente mayor respecto a la harina comercial (20,40 g/100gbs). Para los carbohidratos disponibles, Cerrillos presentó el valor más alto, pero en ambas variedades resultó menor respecto al valor hallado en la harina comercial. Esta fracción estaría compuesta principalmente de almidón, polisacárido mayoritario de reserva en porotos al igual que para el resto de las legumbres, representando entre un 25 % y 45 % (Su *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2003).

Respecto a los parámetros de color, sólo se encontraron diferencias en el parámetro a^* entre las harinas, siendo levemente más negativo para la variedad Cerrillos. Respecto a la harina comercial, se obtuvieron valores estadísticamente diferentes entre sí, pero cercanos para los 3 parámetros, siendo levemente mayor la diferencia para el parámetro L^* (valores medios 93,5 y valor medio para la comercial 95,9).

Al comparar con los parámetros de color obtenidos para los porotos enteros (**Tabla 3.1**) y las harinas obtenidas a partir de ellos (**Tabla 3.2**) se observó principalmente un aumento en los valores de L^* y disminución de a^* en las harinas, indicando que la luminosidad del endospermo es mayor que la de las cubiertas de la semilla. Gupta *et al.* (2018) también observó un aumento en el parámetro L^* para diversos tipos de porotos luego de obtenida la harina en relación al poroto entero.

Las propiedades funcionales evaluadas no presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las variedades de porotos INTA. Estos resultados podrían relacionarse con que las diferencias encontradas en la composición entre las variedades fueron mínimas. Asimismo, para ninguna de las propiedades evaluadas se encontró diferencia significativa ($P > 0,05$) respecto a los resultados obtenidos para la harina comercial (**Tabla 1.6**).

3.4.3 Cuantificación de biocompuestos en harinas de porotos

En la **Tabla 3.3** se presentan los resultados obtenidos para las determinaciones de los diferentes biocompuestos analizados.

Tabla 3.3 Compuestos bioactivos, capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS), fitoesteroles y tocoferoles de harinas de variedades de porotos alubia.

	Cerrillos	Paloma
Clorofila a (µg/g)	0,25 ^a (0,05)	0,24 ^a (0,06)
Clorofila b (µg/g)	0,53 ^a (0,09)	0,53 ^a (0,08)
Clorofila total (a+b) (µg/g)	0,6 ^a (0,1)	0,6 ^a (0,1)
Carotenoides (x+c) (µg/g)	0,34 ^a (0,03)	0,30 ^a (0,07)
Flavonoides (mg EC/g)	0,41 ^a (0,01)	0,5 ^a (0,1)
Taninos (mg EC/g)	4,4 ^a (0,2)	5,12 ^a (0,08)
CFT (mg EAG/g)	3,32 ^a (0,07)	2,90 ^b (0,04)
DPPH (µmol ET/g)	4,43 ^a (0,17)	3,04 ^b (0,17)
ABTS (µmol ET/g)	8,53 ^a (0,37)	7,08 ^b (0,16)
Campesterol (mg/100 g)	0,33 ^a (0,02)	0,38 ^a (0,05)
Stigmasterol (mg/100 g)	5,8 ^a (0,2)	4,57 ^b (0,08)
β-Sitosterol (mg/100 g)	5,2 ^a (0,2)	4,600 ^a (0,009)
γ-Tocoferol (mg/100 g)	0,79 ^a (0,06)	0,5 ^b (0,1)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Cuando se analizaron los **pigmentos** de las harinas obtenidas a partir de porotos variedades Cerrillos y Paloma no se encontraron diferencias en los contenidos de las distintas clorofilas ni de los carotenoides entre ambas. Los niveles de clorofila b resultaron de más del doble de los de clorofila a. A su vez, los niveles de clorofilas resultaron del doble respecto al de carotenoides.

Respecto al contenido de **flavonoides**, para ambas variedades se obtuvieron valores similares entre ellos (**Tabla 3.3**). En general, el contenido de flavonoides es menor en las variedades blancas que en las pigmentadas, como lo demuestran diversos trabajos (Ganesan y Xu, 2017; Ombra *et al.*, 2016).

En legumbres, los taninos se encuentran presentes en las cubiertas, encontrándose en un 0 - 2 % en semillas secas, variando según la especie y el color (Reddy *et al.*, 1985), y siendo el principal compuesto fenólico presente en las cubiertas de porotos coloreados (Gan *et al.* 2016). El contenido de taninos (**Tabla 3.3**) de harinas obtenidas de ambas variedades de porotos alubia fue similar ($P > 0,05$), presentando un valor

medio de 4,7 mg EC/g. En general, se ha reportado que las variedades blancas de porotos contienen valores bajos de taninos (Welch *et al.*, 2000).

El tipo y cantidad de compuestos fenólicos son muy variados, dependiendo del color de la cubierta de la semilla del poroto, como así de la variedad estudiada. El color de la cubierta de la semilla es atribuido a la presencia de polifenoles que incluyen antocianinas (flavonoides) y taninos condensados principalmente. Las variedades de color oscuro (color rosado, rojo y negro) normalmente tienen el mayor contenido de antocianinas. Los colores amarillentos generalmente se atribuyen a la presencia de taninos condensados (Juárez-López y Aparicio-Fernández, 2012). Beninger y Hosfield, (2003) detectaron taninos, mientras que el contenido de flavonoides en las cubiertas de porotos de variedades blancas, fue muy bajo o nulo, resultados similares a los encontrados por Choung *et al.* (2003).

Respecto a los **compuestos polifenólicos totales** evaluados en ambas harinas (**Tabla 3.3**), los niveles detectados fueron bajos pero significativamente mayor ($P < 0,05$) en la harina de poroto variedad Cerrillos. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en otros trabajos que destacan los bajos contenidos de CFT en harinas de porotos de variedades blancas en comparación con variedades coloreadas (Campos-Vega *et al.*, 2010; Madhujith *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2022; Rodríguez Madrera *et al.*, 2021).

Los compuestos polifenólicos en los porotos se encuentran principalmente en las estructuras externas del grano, siendo menor el contenido en el cotiledón (Madhujith *et al.*, 2004; Mojica *et al.*, 2015). Además, la concentración de estos tipos de compuestos depende de las condiciones de crecimiento (acidez del suelo, temperatura, humedad y factores genéticos (Rocha-Guzmán *et al.*, 2007; Rengel, 2015). Sin embargo, ambas variedades fueron cultivadas en similares condiciones y las respectivas harinas fueron obtenidas con granos sin pelar, por lo que las diferencias observadas serían independientes de los factores mencionados, y estarían relacionadas a las diferencias genéticas entre ambas.

Una de las propiedades principales que presentan los compuestos polifenólicos es la de exhibir propiedades antioxidantes, asociados con varios mecanismos, aunque se cree que su principal modo de acción está relacionado con la alta reactividad hacia

radicales libres (Singh *et al.*, 2017). La capacidad antioxidante de legumbres está relacionada directamente con su contenido en compuestos polifenólicos (Xu y Chang, 2007). Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de las harinas de las variedades de porotos alubia se pueden observar en la **Tabla 3.3**. Por ambos métodos, la harina proveniente de la variedad Cerrillos presentó mayor capacidad antioxidante, coincidiendo con una mayor cantidad de CFT respecto a la variedad Paloma. Al comparar estos resultados con los obtenidos para la harina comercial de porotos (**Capítulo 1, Tabla 1.5**) se observó que el contenido de CFT resultó mayor en las variedades NOA, siendo también mayor la capacidad antioxidante evaluada por el método del DPPH, mientras que por el método de ABTS las harinas de variedades NOA los resultados fueron inferiores a los obtenidos para harina comercial.

Como puede observarse en la **Tabla 3.3** para los fitoesteroles, las harinas de las variedades de porotos estudiadas presentaron niveles de β -sitosterol y de estigmasterol de similar orden, aproximadamente 10 veces mayor respecto al campesterol. Asimismo, el contenido de campesterol y β -sitosterol resultó similar entre las harinas, con niveles medios de 0,35 y 4,90 mg/100g, respectivamente. Sin embargo, la proveniente de la variedad Cerrillos presentó el mayor contenido de estigmasterol.

Entre los tocoferoles, solo se detectó γ -tocoferol, siendo mayor en la harina proveniente de porotos variedad Cerrillos respecto a la obtenida con porotos Paloma. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Boschín y Arnoldi (2011), quienes informaron un predominio de γ -tocoferol en distintas variedades de porotos, encontrando δ -tocoferol en cantidades bajas y no detectando α -tocoferol. La misma tendencia fue observada por Yoshida *et al.* (2005) y Kan *et al.* (2017), donde el α -tocoferol no pudo ser detectado utilizando distintas técnicas cromatográficas. Se ha reportado que el γ -tocoferol es el homólogo más eficaz en la prevención de la autooxidación de alimentos en algunos sistemas modelo (Grela y Gunter, 1995; Boschín y Arnoldi, 2011).

En general, los tocoferoles totales y la distribución de los homólogos en los vegetales varían según la especie, variedad, etapa de madurez, condiciones de cosecha y contenido de humedad durante el almacenamiento (Bauerfeind, 1980).

3.4.4 Compuestos antinutricionales en harinas de porotos

En la **Tabla 3.4** se presentan los resultados obtenidos para la determinación de compuestos antinutricionales en las harinas de porotos alubia variedades Cerrillos y Paloma.

Tabla 3.4 Compuestos antinutricionales en harinas de poroto alubia variedades Paloma y Cerrillos.

	Cerrillos	Paloma
Ácido Fítico (mg/g)	11 ^a (2)	14 ^a (1)
Inhibidor de Tripsina (UIT/mg)	20 ^b (2)	30,7 ^a (0,7)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

En ambas harinas se detectó ácido fítico (valor medio: 12,5 mg/g) pero sin diferencias significativas entre ellas. Según otros trabajos, estos niveles serían algo mayores a los encontrados en cereales: trigo (9,6 - 22,2 mg/g) y maíz (10,8 mg/g); centeno (4,5 - 5,7 mg/g) y arroz (5,5 - 13,5 mg/g), pero similares a los reportados en leguminosas como soja (12,0 - 17,5 mg/g) y arvejas (7,2-12,3 mg/g) (Hidvegi y Lasztity, 2002; Kikunaga *et al.*, 1985; García-Esteba *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2009). Como se explicó anteriormente, existen dos preocupaciones principales sobre la presencia del ácido fítico en la dieta humana. El primero es su impacto negativo sobre la biodisponibilidad de varios minerales y el segundo es la evidencia de que puede inhibe varias proteasas esenciales en la degradación de proteínas. El papel beneficioso de ácido fítico ha sido subestimado debido a sus distintas consecuencias negativas. Pero se ha informado que también es un potente antioxidante vegetal natural que desempeña un papel protector contra el estrés oxidativo en las semillas y un papel preventivo en diversas enfermedades en humanos. Incluso recientemente se han informado funciones beneficiosas de del ácido fítico como agente hipoglucémico y antibacteriano, entre otras (Kumar *et al.*, 2021). Por lo tanto, el desarrollo de variedades genéticas con niveles bajos de ácido fítico (Kumar *et al.*, 2019; Yamaji *et al.*, 2017) sería una posible estrategia en pos de minimizar los efectos negativos, sin perder los beneficios asociados a bajas concentraciones del mismo (Vaz Patto *et al.*, 2015).

Respecto al inhibidor de tripsina, la harina obtenida de porotos variedad Paloma presentó un contenido mayor respecto a la obtenida con la variedad Cerrillos (**Tabla 3.4**). Los inhibidores de tripsina se encuentran en la mayoría de las legumbres, variando considerablemente sus niveles entre las distintas especies. Sin embargo, la mayoría de las legumbres presentan menos del 50 % de la cantidad encontrada para soja (Savage y Morrison, 2003). Respecto a otras variedades de porotos, si bien los resultados varían, mantienen rangos similares. Lajolo y Genovese (2002) y Jourdan *et al.* (2007) estudiaron distintas variedades de porotos cultivadas en Brasil, encontrando valores entre 19 - 22 UIT/mg y 23,1 - 27,6 UIT/mg respectivamente. De Mejia *et al.* (2005), encontraron valores del orden de 26,8 UIT/mg para un cultivar de origen Mexicano.

3.4.5 Microestructura de harinas de porotos y análisis elemental por SEM-EDS

En la **Figura 3.3** pueden observarse micrografías de las harinas de variedades de poroto alubia Cerrillos y Paloma obtenidas por SEM. En la **Tabla 3.5** se muestran los resultados obtenidos para los parámetros de tamaño de los gránulos de almidón de las respectivas harinas.

Se pudieron observar algunos gránulos partidos (indicado con una flecha en la **Figura 3.3c**) pero en escasa cantidad, indicando signos de daños físicos por el proceso de molienda. Se observó también, que los gránulos se presentaron en forma de gránulos simple, como la mayoría de los almidones de legumbres, aunque se han encontrado excepciones para algunas variedades de arvejas, en donde se observaron granos compuestos (Bertoft *et al.*, 1993; Colonna *et al.*, 1982; Zhou *et al.*, 2004).

Los gránulos de almidón de las diferentes harinas de porotos presentaron diferencias de tamaños ($P < 0,05$) (**Tabla 3.5**), siendo los correspondientes a la variedad Cerrillos más largos y más anchos respecto a los observados en la harina de la variedad Paloma. Los resultados encontrados coinciden con los tamaños descritos para diversos almidones de legumbres, entre 15 y 28 μm (Ma *et al.*, 2017; Sandhu y Lim, 2008; Wang y Ratnayake, 2014).

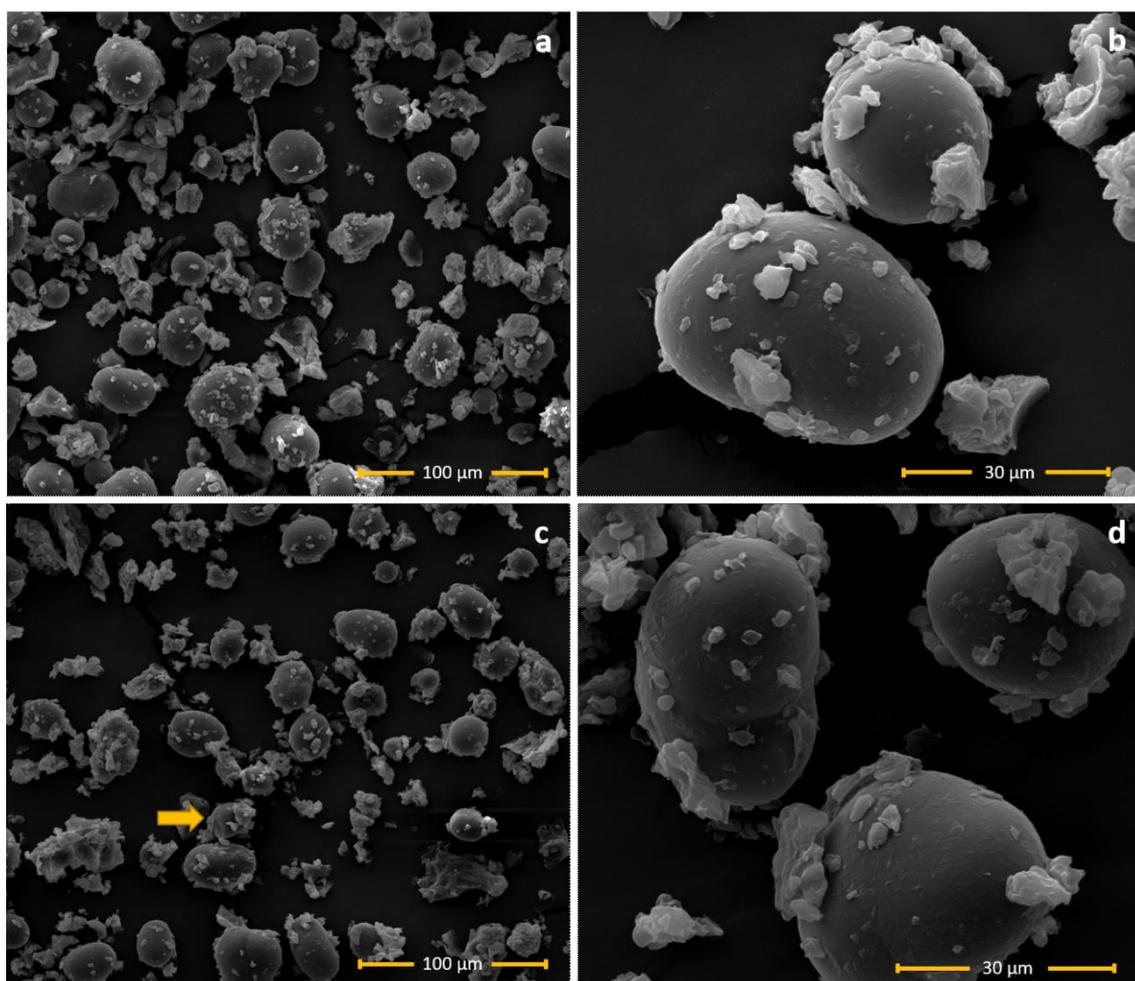


Figura 3.3. Micrografías de harinas de porotos alubia correspondientes a la variedad Cerrillos (a,b) y Paloma (c,d) a diferentes aumentos. Con la flecha se indican gránulos partidos.

Tabla 3.5. Parámetros de tamaño de gránulos de almidón de harinas de porotos alubia variedades Cerrillos y Paloma.

	Cerrillos	Paloma
Largo (µm)	33 ^a (1)	28 ^b (1)
Ancho (µm)	26,7 ^a (0,8)	21,3 ^b (0,8)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los gránulos observados para ambas harinas presentaron formas que variaron entre ovales, arriñonadas e irregulares, las cuales son similares a las descritas para gránulos de almidón de otras legumbres (Du *et al.*, 2014; Hoover *et al.*, 2010). Sus superficies fueron lisas y sin evidencia de fisuras o agujeros, como lo han descrito diversos estudios (Hoover y Manuel 1995; Hoover y Ratnayake, 2002; Chung *et al.*, 2008a).

Las partículas observadas entre los gránulos corresponderían a fragmentos de la matriz proteica generados por la molienda que podrían contener además minerales y componentes de la fibra (Ma *et al.*, 2011). Los restos de fragmentos de paredes celulares pueden presentarse en una amplia variedad de tamaños (desde pocas micras a tamaños por encima de los 40 μm), y pueden observarse también en las distintas micrografías.

En la **Figura 3.4** se presentan, a modo de ejemplo, las micrografías y el espectro EDS obtenidos para la harina de porotos de variedad Cerrillos obtenidos para realizar su análisis elemental.

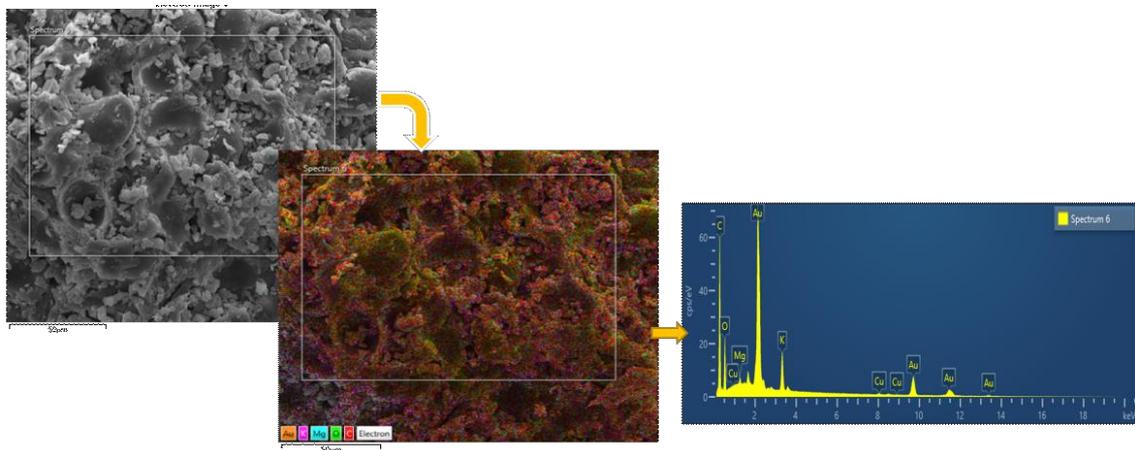


Figura 3.4 Imagen SEM y análisis por EDS para la harina de porotos variedad Cerrillos.

Respecto a los resultados obtenidos para el análisis elemental por EDS de las harinas, donde se informó cada elemento detectado en forma semicuantitativa como masa porcentual (%) respecto al 100 % (normalizado), el potasio (K) fue el mineral que se encontró en mayor proporción en ambas variedades, siendo mayor para Cerrillos respecto a Paloma (4,38 % vs 1,39 %). Para el magnesio (Mg), la variedad Paloma presentó un contenido del 1,01 %, el doble respecto a Cerrillos (0,49 %) En cuanto al cobre (Cu), los valores fueron similares para ambas variedades, siendo en promedio de 0,77 %. Estos resultados confirman la información de literatura que sugiere que las variedades de *Phaseolus* sp son una excelente fuente de varios minerales como el K y el Mg (Ma *et al.*, 2011).

3.4.6 Análisis por FTIR-ATR de harinas de porotos

Los espectros obtenidos para las harinas de porotos variedades alubia estudiadas se pueden observar en la **Figura 3.5**.

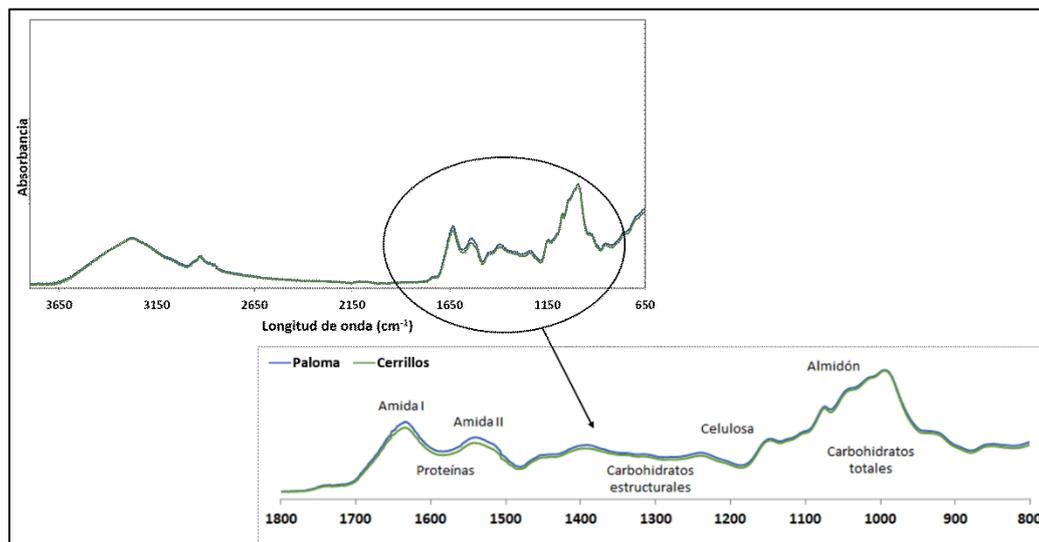


Figura 3.5 Espectros FTIR obtenidos para las harinas de variedades de poroto alubia.

Los principales picos espectrales observados se atribuyeron a una variedad de compuestos constituyentes de las harinas, que incluyen agua, polisacáridos y proteínas.

El espectro infrarrojo de una proteína presenta picos de absorción asociados principalmente con los grupos amida. De acuerdo con la bibliografía, los picos en los rangos de 1229 a 1301 cm^{-1} , 1480 a 1575 cm^{-1} , 1600 a 1690 cm^{-1} , corresponden a amida III, amida II, y amida I, respectivamente (Carbonaro y Nucara, 2010). La zona amida I está relacionada con la organización macromolecular de las proteínas (de la Rosa-Millán *et al.*, 2018) y la de amida II con la estructura secundaria de las mismas (Vedantham *et al.*, 2000; Cai y Singh, 2004) siendo frecuentemente el pico correspondiente a amida I más intenso que el de amida II. La región de amida III no ha sido tan estudiada, pero se ha relacionado con las interacciones moleculares entre proteínas y otras macromoléculas (como polisacáridos y polifenoles), pudiendo entonces aportar información sobre posibles interacciones a nivel molecular que tengan impacto significativo en sus características funcionales (Cai y Singh, 2004; Barth, 2007).

El espectro de infrarrojo del agua presenta dos picos notables, uno alrededor de los 1645 cm^{-1} y otro pico muy intenso y ancho ubicado alrededor de 3600 y 3020 cm^{-1} (Cozzolino *et al.*, 2014; Gnanasambandam y Proctor, 2000; Gordon *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2010). Es conveniente mencionar que los picos del agua en un espectro, provenientes de una muestra alimenticia diluida o con poca cantidad de agua como las harinas, pueden solapar otros picos de interés de la muestra en cuestión, sobre todo en muestras ricas en proteínas, cuyos picos característicos de interés aparecen alrededor de 1645 cm^{-1} .

Respecto a los lípidos, alrededor del intervalo entre 2950 y 2800 cm^{-1} aparecen picos asociados con los enlaces C-H o un pico intenso ubicado aproximadamente a 1740 cm^{-1} , el cual está relacionado con el enlace C=O del grupo carbonilo (Gnanasambandam y Proctor, 2000; Lai *et al.*, 2010). Cozzolino *et al.* (2014) informaron que los patrones espectrales entre 3000 y 2720 cm^{-1} estaban relacionados con el contenido de lípidos insaturados cuando se estudió el germen en cereales.

Los hidratos de carbono presentan en su estructura un gran número de grupos OH. Estos grupos son muy flexibles conformacionalmente. La similitud de los grupos sustituyentes y su naturaleza hacen que los espectros vibracionales de las diferentes formas de una molécula de hidrato de carbono sean similares entre sí (Huang *et al.*, 2008). Las bandas observadas entre 900 a 1200 cm^{-1} corresponden a la zona de los carbohidratos, principalmente almidón (Warren *et al.*, 2016), relacionándose el pico a 1047 cm^{-1} con la zona cristalina y 1022 cm^{-1} con los dominios amorfos (Ambigaipalan *et al.*, 2011; Chávez-Murillo *et al.*, 2018). En esta zona asociada a los carbohidratos es donde no se observaron diferencias en la intensidad de los picos entre los espectros de las harinas, principalmente entre los 970 y 1000 cm^{-1} .

Sin embargo, al comparar los espectros obtenidos para las harinas se pudo notar que la ubicación de los picos espectrales fue prácticamente la misma entre ambas, presentando solo una ligera diferencia en magnitudes de algunos picos, presentando la variedad Cerrillos menores valores, principalmente en la zona correspondiente a las proteínas y carbohidratos estructurales (1100 - 1500 cm^{-1} aproximadamente).

3.4.7 Estudio mediante Difracción de Rayos X

Los espectros de difracción de rayos X obtenidos para las harinas de porotos de las variedades Cerrillos y Paloma se presentan en la **Figura 3.6**.

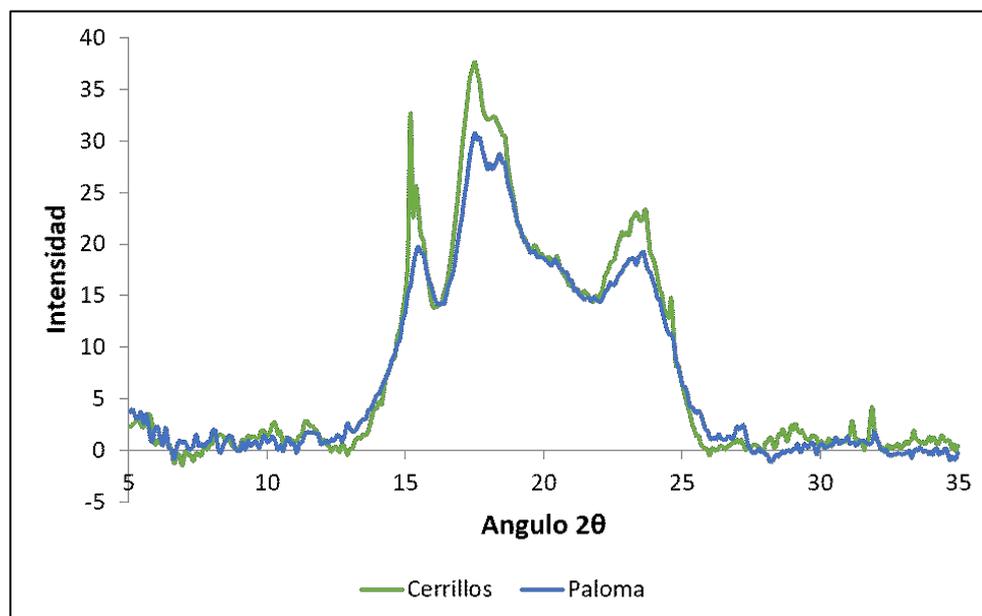


Figura 3.6 Espectro de difracción de rayos X para harinas de poroto alubia.

Al comparar los espectros de rayos X obtenidos para las harinas no se observaron diferencias en las posiciones de los picos, en acuerdo con otros autores (Hoover *et al.*, 2010; Santiago-Ramos *et al.*, 2018). Este patrón observado en las harinas de ambas variedades de porotos estuvo en concordancia con diversos trabajos que lo describen como un patrón de "almidón tipo C" (Chung *et al.*, 2008b; Hoover *et al.*, 2010) caracterizado por picos alrededor de $2\theta = 5,6^\circ$, 15° , 17° y 23° . Este patrón, descrito para almidones de legumbres y de ciertos tubérculos y semillas (Fraser-Reid *et al.*, 2008), es una forma mixta entre los patrones tipo A y B; donde el patrón de difracción tipo A es el más común en almidones de cereales como maíz, trigo y arroz, mientras que el patrón tipo B es característico de almidones de tubérculos y frutas como papa y banana, y de almidones retrogradados. Estos patrones son consecuencia de los diferentes cristales polimórficos que el arreglo de las dobles hélices de la amilopectina puede formar (Imberty y Pérez, 1998). Los cristales tipo A producen estructuras relativamente compactas empaquetadas en forma monoclinica con una menor proporción de agua, mientras que los B dan lugar a una estructura más abierta

conteniendo un núcleo helicoidal hidratado, empaquetado en forma hexagonal (Jane, 2006).

Sin embargo, al comparar los espectros, se observaron picos de mayor intensidad alrededor de $2\theta = 15^\circ$, 17° y 23° para la variedad Cerrillos respecto a Paloma.

Según Ovando-Martinez *et al.* 2011, un pico a $2\theta = 20^\circ$ estaría relacionado con la presencia del complejo amilosa-lípido. Estos picos resultaron prácticamente imperceptibles en los espectros obtenidos para ambas variedades de porotos, posiblemente por solapamiento con los otros picos o por su baja proporción. Incluso, Singh *et al.* (2008) han reportado que, en general, este pico está ausente en almidones de legumbres.

El pico a $2\theta = 5,6^\circ$ es característico del almidón tipo B (Zhou *et al.*, 2014), muy débil en legumbres. Las harinas de porotos estudiadas no fueron la excepción, incluso en el espectro correspondiente a la variedad Paloma el pico fue prácticamente imperceptible.

A partir de los espectros se calculó el grado de cristalinidad de los almidones. En legumbres estos valores están en el rango entre 17 y 34 %. Las harinas estudiadas presentaron valores acordes a los encontrados en legumbres, resultando en 26,5 % para la variedad Cerrillos y 24,3 % para Paloma. Estas pequeñas diferencias podrían deberse a distinto número y tamaños de los cristalitos, y estructura de los mismos, como así también a los diferentes contenidos de humedad que presentan las harinas (Hoover *et al.*, 2010).

3.4.8 Estudio de transiciones térmicas mediante DSC

Los termogramas obtenidos para las harinas de variedades de porotos alubia Cerrillos y Paloma presentaron dos picos endotérmicos (**Figura 3.7**). En la **Tabla 3.6** se informan las temperaturas de *onset* (T_o), de pico (T_p) y final (T_f) de las transiciones observadas para ambas harinas.

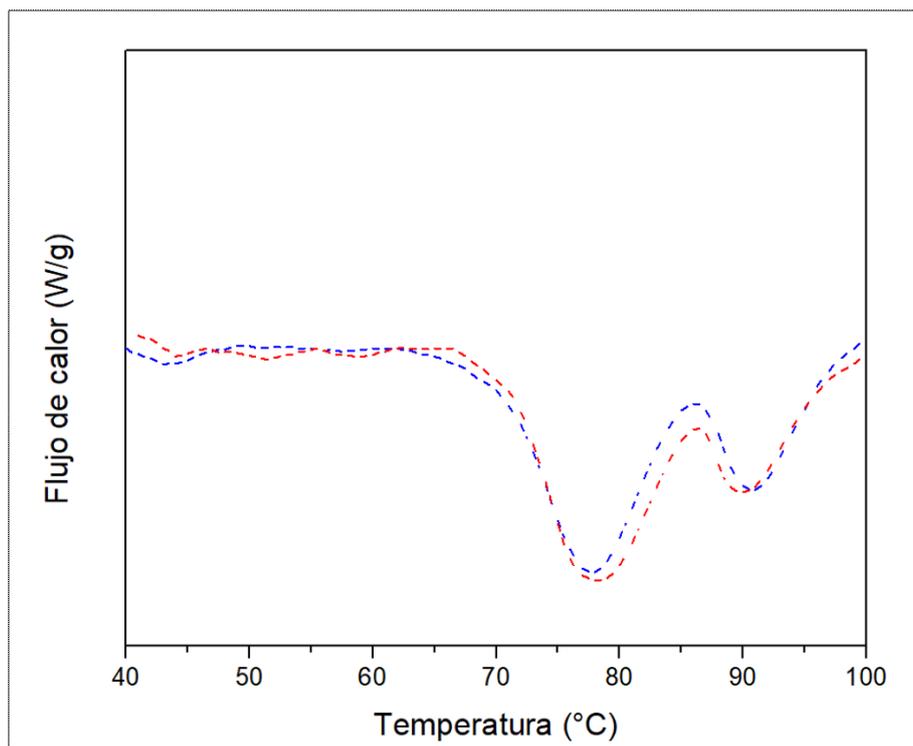


Figura 3.7 Termogramas correspondientes a la harina de porotos variedad Cerrillos (---) y Paloma (---).

Tabla 3.6: Temperaturas de *onset* (T_o), de pico (T_p) y final (T_f) y entalpía asociada (ΔH) para las transiciones térmicas de harinas de porotos alubia variedades Cerrillos y Paloma.

	Cerrillos	Paloma
Endoterma 1*		
T_o (°C)	70,9 ^a (0,9)	70,5 ^a (1)
T_p (°C)	77,3 ^a (0,2)	77,61 ^a (0,07)
T_f (°C)	84,6 ^a (0,4)	81,1 ^a (0,6)
ΔH (J/g)	1,9 ^a (0,5)	1,43 ^a (0,07)
Endoterma 2*		
T_o (°C)	86,1 ^a (0,2)	88,2 ^a (0,3)
T_p (°C)	89,6 ^a (0,2)	90,6 ^a (0,2)
T_f (°C)	95,2 ^a (0,6)	97,0 ^a (0,5)
ΔH (J/g)	0,6 ^a (0,1)	0,68 ^a (0,02)

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

La **primera transición** observada en los termogramas fue asociada a la gelatinización del almidón. No se encontraron diferencias entre harinas de ambas variedades de porotos NOA para esta primera transición, lo que indicaría similitudes

entre los cristalitos y su estabilidad dentro de los gránulos de almidón nativo (Chung *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2011).

El cambio de entalpía refleja la cantidad de energía necesaria para fundir las dobles hélices del almidón durante el proceso de gelatinización (Cooke y Gidley, 1992). Para este parámetro tampoco se observaron diferencias entre ambas variedades, lo que indicaría una disposición similar de las dobles hélices de las cadenas de amilopectina. En general, cuando se comparan valores de entalpía de almidones de legumbres con los obtenidos para almidones de otros orígenes botánicos, se encuentra que los primeros son más bajos que los encontrados para cereales o maíz (Li *et al.*, 2019). Estas diferencias se han relacionado con el mayor contenido de amilosa presente en el almidón de legumbres.

Por lo tanto, las temperaturas medias asociadas a la gelatinización de las harinas de porotos NOA (T_o , T_p , y T_f) y su entalpía correspondiente fueron 74,7 °C, 77,5 °C, 82,8 °C, y 1,66 J/g, respectivamente.

La **segunda transición** observada en los termogramas entre 87,1 y 96,1 °C tampoco presentó diferencias significativas entre ambas variedades de porotos. Algunos autores (Chung *et al.*, 2008a; Ovando-Martínez *et al.*, 2011; Wani *et al.*, 2017) atribuyeron esta transición exclusivamente a la fusión del complejo amilosa-lípido, otros a la desnaturalización de una fracción de proteínas termoresistentes (Bernal-Lugo *et al.*, 1997; Sánchez-Arteaga *et al.*, 2015), mientras que otros a un efecto conjunto de ambos fenómenos (Santiago-Ramos *et al.*, 2018). Para las variedades estudiadas, el pico del espectro de difracción de rayos X asociado por Santiago-Ramos *et al.* (2018) al complejo amilosa-lípido no se evidenció claramente, por lo que la segunda transición estaría principalmente relacionada con la desnaturalización proteica. Las temperaturas correspondientes a la segunda transición fueron similares a las de desnaturalización de las principales fracciones proteicas de los porotos, globulinas (82 – 105 °C), lectinas (89 - 95 °C), y fracción de albúminas (89 – 105 °C), como se han reportado previamente por otros autores (Chung *et al.*, 2008a; Hoover y Ratnayake, 2002; Meng y Ma, 2001; Rocha *et al.*, 2002; Rui *et al.*, 2011; Tang, 2008).

Numerosos trabajos han reportado las temperaturas de transiciones tanto de proteínas como de almidones aislados. Sin embargo, las harinas tienen una composición más compleja por presencia de otros componentes que podrían dar como

resultado un termograma más complejo que los reportados para las fracciones aisladas, por lo tanto las temperaturas de las transiciones presentan algunas diferencias con lo reportado en bibliografía.

3.5 CONCLUSIONES

Los porotos alubia del NOA variedades Cerrillos y Paloma presentaron parámetros de tamaño, morfología y color similares.

Las harinas obtenidas a partir de los mismos presentaron composiciones similares, caracterizándose por su alto contenido de fibra y proteínas, así como propiedades funcionales similares. Se observó para la harina de la variedad Cerrillos un mayor contenido de estigmasterol y de γ -tocoferol, así como de compuestos polifenólicos totales, y una mayor capacidad antioxidante. Ambas harinas presentaron ácido fítico e inhibidor de tripsina, siendo este último mayor en la harina de porotos variedad Paloma. El potasio fue el mineral en mayor proporción en ambas variedades. El almidón en ambas harinas presentó un patrón tipo C, con similar grado de cristalinidad. Ambas harinas presentaron similares transiciones endotérmicas, la primera asociada a la gelatinización del almidón, y la segunda a la desnaturalización proteica.

Al comparar las variedades de porotos agronómicamente mejoradas con la harina comercial analizada en el **Capítulo 1**, se observó que si bien existieron algunas diferencias de composición, éstas no condicionaron sus propiedades funcionales y presentaron similares resultados. Sin embargo, las harinas de porotos variedades NOA resultaron de mayor contenido de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante respecto a la harina comercial.

Por lo tanto, las harinas de porotos NOA agronómicamente mejorados serían potenciales ingredientes funcionales para el desarrollo de hamburguesas híbridas.

CAPÍTULO 4

Optimización del contenido de harina de porotos y agua en la formulación de hamburguesas saludables

RESUMEN

La metodología de superficie de respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esa respuesta. En el presente Capítulo se buscó modelar las principales variables asociadas a la calidad de un producto (rendimiento, parámetros de textura y color), a partir de los resultados obtenidos en el **Capítulo 2**, para las hamburguesas elaboradas con harina de poroto comercial.

Luego de modelar las respuestas de interés, se intentó predecir el nivel de harina de porotos y la relación agua/harina a emplear en el producto que optimizara sus parámetros de calidad, logrando asemejarse al producto comercial tradicional sin reemplazo de carne, utilizando la metodología de función objetivo.

De acuerdo a los resultados comparativos entre la harina comercial y las obtenidas con las variedades INTA Paloma y Cerrillos del **Capítulo 3**, se concluyó que no existían diferencias en las propiedades funcionales, y que las composiciones eran similares, destacándose un menor contenido de fibra en la comercial. Por lo tanto se decidió elaborar la hamburguesa resultante de la formulación optimizada con una mezcla 50:50 de las harinas de Paloma y Cerrillos. Una vez elaborado el producto con la formulación optimizada, se determinaron experimentalmente sus parámetros de calidad previamente establecidos y se compararon los resultados obtenidos con los resultados predichos con los modelos matemáticos. Para las variables respuesta analizadas, no se encontraron diferencias significativas entre los valores predichos y los experimentales, lo que permitió validar de manera satisfactoria el modelo matemático propuesto. Y además que con la utilización de las harinas provenientes de variedades genéticamente mejoradas los resultados fueron equivalentes a cuando se utilizó la variedad comercial.

Por lo tanto, el reemplazo permitió elaborar un producto con las características predichas por el modelo de optimización, con la utilización de variedades genéticamente mejoradas del NOA argentino.

Además se analizaron térmicamente las formulaciones utilizadas para el modelado de las respuestas para analizar el efecto del agregado de la harina de porotos (HP) a las matrices cárnicas. Los resultados indicaron que la harina de poroto ocasionó un aumento significativo en la energía requerida para la desnaturalización de miosina, y que las transiciones de la harina se produjeron a temperaturas mayores en la hamburguesa respecto a las medidas realizadas sobre las harinas en forma individual. Asimismo, en el análisis de las transiciones térmicas de las formulaciones ya cocidas no se detectaron transiciones en la parte interna de la superficie de los productos (donde se alcanzaron temperaturas mayores), pero sí en el centro del mismo, que pudo relacionarse con la persistencia de una fracción de almidón nativo evidenciada en la observación por microscopía electrónica de barrido de los productos cocidos.

4.1 INTRODUCCIÓN

Existen experiencias en las que no se obtienen las respuestas buscadas o el nivel de mejoras logrado no es suficiente, por lo que resulta necesario experimentar de manera secuencial hasta encontrar lo deseado. En ese caso, después de una primera etapa experimental, se vuelve necesario desplazar la región experimental (espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados con cada factor) en una dirección adecuada. En otros casos se busca explorar en forma más detallada la región experimental inicial. La forma de realizar ambas cosas es parte de la llamada *Metodología de Superficie de Respuesta* (MSR). La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto, a través de una colección de técnicas matemáticas y estadísticas. La determinación del punto óptimo plantea un fuerte reto para el experimentador y requiere de una estrategia más completa, que incluye la posibilidad de realizar varios experimentos en forma secuencial y el uso de otras técnicas de análisis (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2012).

Los orígenes de la MSR como tal se remiten al trabajo de Box y Wilson (1951), pero fue en los últimos 30 años que, debido en parte al avance en la informática, esta metodología ha tenido un desarrollo considerable tanto en aspectos teóricos como en aplicaciones. Este desarrollo se refleja en varias publicaciones sobre el tema, entre las que destacan Myers y Montgomery (1995), Box y Draper (1987), Khuri y Cornell (1987) y Cornell (2002).

La MRS implica tres aspectos: *diseño*, *modelo* y *técnica de optimización*. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y dependen del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. De manera específica, el *modelo* puede ser de primer o de segundo orden (plano o con curvatura); por ello, el tipo de diseño utilizado y el método de optimización se clasifican, según sea el caso, como de primer o segundo orden. El aspecto *diseño* implica que para optimizar un proceso se debe aplicar el *diseño de experimentos*. El aspecto del *modelo* utiliza el *análisis de regresión lineal múltiple*, junto con sus elementos básicos que son: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y

coeficiente de determinación. Por último, el aspecto de *optimización* está formado por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo.

Resulta habitual en un alimento tener que evaluar diversas características (variables respuesta) para poder lograr productos con mejor calidad y propiedades. Por ejemplo propiedades como textura, pH, color, sabor, apariencia, etc., pueden resultar todas importantes para que el alimento sea bien aceptado por los consumidores. Si la optimización solo se hace para una característica del producto podrían resultar en condiciones inadecuadas para las otras características. Por ello es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés.

El problema de la optimización simultánea radica en que es necesario buscar una solución compromiso, donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio. Existen distintas maneras de abordar esta evaluación, uno de estos métodos analíticos es el basado en la función "deseabilidad". Este método fue propuesto originalmente por Harrington (1965) y después fue mejorado por Derringer y Suich (1980) y Derringer (1994). Consiste en definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global (D) del producto en cada punto; de esta forma, convierte el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado. Entonces, basta maximizar D para obtener el punto óptimo buscado.

La MSR permite estimar las condiciones óptimas de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia, productividad, cumplimiento de especificaciones, y mejorar su calidad, y puede ayudar en la investigación del efecto de la interacción de varias variables y en la construcción de un modelo matemático que describa con precisión el proceso global (Myers y Montgomery, 2002). Se ha utilizado con eficacia para la optimización de formulaciones de una variedad de productos alimenticios cárnicos (Baugreet *et al.*, 2017; Dos Santos *et al.*, 2021; Keenan *et al.*, 2014; Sariçoban *et al.*, 2009; Marchetti *et al.*, 2014; Melendres *et al.*, 2014; Pathera *et al.*, 2017; Tahmasebi *et al.*, 2016; Thangavelu *et al.*, 2022).

Por ejemplo, Baugreet *et al.* (2017) utilizó un diseño de mezclas para optimizar tecnológicamente la incorporación de harina de lentejas en hamburguesas bovinas. El modelado mostró que la inclusión de esta harina mejoró las características de textura y las pérdidas en la cocción. Tahmasebi *et al.* (2016) estudió el efecto de la harina de guandú (*Cajanus cajan*) en combinación con harina de maíz como reemplazo de carne y de pasta de sésamo y nuez como reemplazo de grasa, en la estabilidad de la emulsión y propiedades de textura de salchichas utilizando la MSR. Todos los reemplazos condujeron a mejoras en la estabilidad de la emulsión, pérdidas de cocción y en las propiedades de textura, y fue posible encontrar una formulación óptima.

4.2 OBJETIVOS

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización de las hamburguesas con aceite de girasol pre-emulsificado y reemplazo parcial de carne de cerdo por harina de **porotos** comercial (**Capítulo 2**), en diferentes niveles y con distintas relaciones agua/harina, se propusieron los siguientes objetivos:

- modelar matemáticamente las respuestas obtenidas para las variables estudiadas en las distintas formulaciones siguiendo una Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).
- predecir el nivel de harina de porotos y la relación agua/harina a emplear en el producto que optimice sus parámetros de calidad, logrando asemejarse al producto comercial tradicional sin reemplazo de carne, utilizando la metodología de función objetivo o deseabilidad.
- validar la formulación optimizada elaborando el producto empleando harina de porotos alubia variedades NOA, determinando experimentalmente sus parámetros de calidad y comparando los resultados obtenidos con los resultados predichos con los modelos matemáticos.
- estudiar el efecto del agregado de harina de sobre las propiedades térmicas del sistema cárnico y su microestructura.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Diseño experimental

Para realizar el análisis sobre los resultados obtenidos en el Capítulo 2 se consideró un diseño bifactorial, siendo los factores analizados el *nivel de harina de porotos (HP)* en reemplazo de carne de cerdo, y la *relación agua/harina (A/HP)* alcanzada en la formulación, tomando el primer factor a 2 niveles (8 y 15 g HP/100 g producto crudo) y el segundo factor a 3 niveles (1,2; 1,6, y 1,8 g agua/g HP), representando así 6 condiciones experimentales evaluadas por duplicado (dos partidas independientes de hamburguesas a partir de dos lotes independientes de carne (**Tabla 4.1**)).

Tabla 4.1 Contenidos de carne de cerdo (g/100 g) y contenidos reales (g/100 g) y codificados para nivel de harina de porotos (HP) y relación agua/harina de poroto (A/HP) en 100 g de hamburguesas crudas. Códigos de formulación según **Tabla 2.1**.

Formulación	Carne de cerdo (g/100g)	Harina de porotos (HP)		Relación agua/harina (A/HP)	
		g/100g	codificado	adimensional	Codificado
1	70,50	8	-1	1,25	-1
2	67,70	8	-1	1,6	-0,067
3	64,50	8	-1	2	1
4	54,75	15	1	1,25	-1
5	49,50	15	1	1,6	-0,067
6	43,50	15	1	2	1

4.3.2 Modelado de las variables respuesta

Como variables respuesta se consideraron los resultados obtenidos sobre hamburguesas con reemplazo parcial de carne de cerdo por harina comercial de porotos para rendimiento, parámetros de textura y color (**Capítulo 2, sección 2.4.2**).

Se utilizó el método de regresión de mínimos cuadrados para ajustar los datos de cada variable respuesta a un modelo polinómico de segundo orden completo según la siguiente expresión:

$$\hat{Y}_n = \beta_0 + \beta_1 C_1 + \beta_2 C_2 + \beta_{11} (C_1)^2 + \beta_{22} (C_2)^2 + \beta_{12} C_1 C_2 \quad \text{Ec 4.1}$$

donde,

\hat{Y}_n es la variable respuesta predicha (Y_1 : rendimiento, Y_2 : dureza, Y_3 : cohesividad, Y_4 : elasticidad, Y_5 : masticabilidad, Y_6 : resiliencia, Y_7 : parámetro L*, Y_8 : parámetro a*, Y_9 : parámetro b*)

C_1 , C_2 son los contenidos codificados de las variables independientes (HP y A/HP, respectivamente, **Tabla 4.1**)

β_0 es el término constante

β_1 y β_2 son los coeficientes lineales

β_{11} , β_{22} , son los coeficientes cuadráticos

β_{12} es el coeficiente de interacción.

Para obtener los modelos matemáticos de cada respuesta se empleó una metodología de eliminación tipo “paso a paso hacia atrás” (*stepwise backward*) para establecer los términos significativos de dichos polinomios en cada caso. La adecuación del modelo fue verificada utilizando un test de falta de ajuste (*lack of fit*). En cada caso también se informó el coeficiente “precisión adecuada” (*Adequate Precision*), medida de la relación entre la señal y el ruido, que es deseable que sea mayor que 4. Luego de ajustar los modelos, se llevó a cabo un análisis de los residuos para validar las hipótesis en los ANAVA.

4.3.3 Optimización simultánea

Se utilizó una optimización multirespuesta para predecir la formulación óptima empleando una metodología de “función objetivo o deseabilidad”, “D”.

Para definir la deseabilidad global, D, se requiere que todas las variables Y estén en la misma escala, y esto se logra transformando cada respuesta predicha Y_n en un valor de deseabilidad individual d_n , utilizando los modelos ajustados y estableciendo los criterios de optimización. Cada una de esas funciones es continua y monótona variando desde cero

(respuesta no deseada o inaceptable) hasta 1 (respuesta óptima o completamente deseable). La función D viene dada por la media geométrica ponderada de las deseabilidades individuales.

En general, la conveniencia de cada respuesta debe ser mayor que cero como condición necesaria para establecer la conveniencia total de un sistema. En el intervalo [0,1] la conveniencia puede tener, según el caso, una variación lineal o no lineal, dependiendo de las condiciones propias del producto o proceso, que deberá ser previamente definida. Dependiendo de si la respuesta particular predicha va a ser maximizada, minimizada o asignado un valor objetivo en un rango determinado, se pueden emplear diferentes funciones objetivo d_n (Derringer y Suich, 1980).

$$d_n = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \text{si } Y_n \leq Y_n^{\min} \\ \left(\frac{Y_n - Y_n^{\min}}{Y_n^{\max} - Y_n^{\min}} \right)^r & \text{si } Y_n^{\min} \leq Y_n \leq Y_n^{\max} \\ 1 & \text{si } Y_n \geq Y_n^{\max} \end{array} \right\} \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde,

Y_n^{\min} es el mínimo valor aceptable para Y_n

Y_n^{\max} es el máximo valor considerado deseable

r es una constante positiva

Si $r = 1$, la función d_n aumenta linealmente conforme al aumento de Y_n ; si $r > 1$, la función d_n aumenta más rápidamente hacia Y_n^{\max} ; y si $r < 1$, la función d_n aumenta más lentamente hacia Y_n^{\max} .

Luego, las funciones individuales de deseabilidad de las respuestas consideradas son combinadas para obtener la función de D, que se define como la media geométrica de los valores de conveniencia individuales (Harrington, 1965; Derriger y Suich, 1980):

$$D = (d_1 * d_2 \dots * d_n)^{1/n} \quad \text{Ec. 4.3}$$

El valor de D (**Ec. 4.3**) será el más alto en condiciones donde la combinación de los diferentes criterios a nivel global sea óptima y será nulo si al menos uno de los atributos resulta completamente indeseable.

4.3.4 Validación

Una vez determinada la formulación óptima, es decir, valores de nivel de HP y relación A/HP para los cuales se obtuvo la D, se la empleó para elaborar hamburguesas con harina de porotos alubia variedades NOA. Debido a que estas harinas caracterizadas previamente (**Capítulo 3**), presentaron composición y propiedades funcionales similares a la harina comercial utilizada en el **Capítulo 2**, los porotos variedades Cerrillos y Paloma fueron mezclados en partes iguales para obtener harina utilizada para los ensayos de validación.

La harina se obtuvo según metodología descrita en **Sección 3.3.3**. Las hamburguesas se elaboraron según metodología descrita en **Sección 2.3.3**, empleando la combinación de nivel de HP y relación A/HP optimizada, y los ingredientes comunes mencionados en la **Tabla 2.1**. Los productos se almacenaron congelados hasta su análisis, no más de 1 semana.

Sobre las hamburguesas se analizaron todas las variables de respuesta mencionadas (**Sección 4.3.2**). Los valores experimentales obtenidos y los predichos (**Sección 4.3.3**) de cada variable respuesta fueron comparados para determinar la validez de los modelos obtenidos.

4.3.5 Estudio de las transiciones térmicas

Para analizar el efecto del agregado de la harina de porotos (HP) a las matrices cárnicas se estudiaron las transiciones térmicas en hamburguesas crudas y cocidas de formulaciones 1, 3, 4, y 6, (**Tabla 4.1**), correspondientes a contenidos mínimos y máximos de HP y de agua, consideradas representativas del sistema estudiado. Además, para analizar la contribución de cada ingrediente mayoritario en el producto, se analizaron las transiciones térmicas de la harina de porotos NOA obtenidas previamente (**Sección 3.4.9**) y de la mezcla carne de cerdo/sales (NaCl/TPP; 1,27/0,63 g/100 g carne, relación para el producto Control según **Tabla 2.1**).

Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, TA Instruments, Delaware, EE.UU). Para las hamburguesas y la carne de cerdo se siguió el protocolo de Marchetti *et al.* (2015). Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada muestra en cada cápsula, se sellaron en forma hermética, sometiéndose a un programa que consistió en un calentamiento entre 25 y 120 °C, con una velocidad de 10 °C/min.

Los termogramas de las diferentes muestras fueron analizados mediante el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments, EE.UU).

4.3.6 Análisis de la microestructura

Se estudió la microestructura de los sistemas cárnicos mediante SEM. Se realizaron observaciones en hamburguesas control y optimizada, tanto en crudo como en cocido, a fin de evaluar el efecto del agregado de la harina de porotos al sistema. Para ello, se volvió a elaborar una nueva unidad de producción según **Sección 2.3.3** para todas las formulaciones mencionadas.

En todos los casos se tomaron pequeñas muestras de hamburguesa (aproximadamente 2 mm por 2 mm). En el caso de las hamburguesas cocidas, se extrajeron dos tipos de muestras, una de la cara interna debajo de la superficie y otra del centro del producto.

Todas las muestras fueron fijadas con la solución de Carnoy (60 % alcohol etílico, 30 % cloroformo, 10 % ácido acético glacial, v/v) a 4 °C durante 24 h. Luego se realizó una

deshidratación utilizando soluciones de etanol de concentraciones crecientes (etanol 70 % v/v, 12 h; etanol 95 % v/v dos ciclos de 2 h; etanol 100 % v/v dos ciclos de 2 h). Posteriormente se aplicó la técnica del punto crítico (Trieu y Qutubuddin, 1994). Este es un método de secado posterior a la deshidratación con alcohol, que permite conservar la forma y estructura celular de la muestra. El proceso se basa en el reemplazo de los líquidos (utilizados en la extracción, fijación y conservación iniciales) por CO₂, que es finalmente evacuado sin dañar los tejidos de la muestra.

Previo a su observación, las muestras fueron montadas en soportes de aluminio utilizando una cinta adhesiva de doble contacto, y luego recubiertas con una capa de oro (40-50 nm) al vacío por pulverización catódica o *sputtering*, para su visualización. La observación se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido (FEI - QUANTA 250, Hillsboro, EE.UU), con diferentes aumentos y en diversos campos para cada muestra, de modo de obtener las imágenes más representativas de la microestructura.

4.3.7 Metodología y herramientas estadísticas empleadas

Procedimientos estadísticos tales como análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones pareadas de medias se llevaron a cabo mediante el software Infostat v2009 (Infostat 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó el ensayo de Tukey para estudiar las comparaciones pareadas de medias. La generación de superficies de respuesta y optimización fueron realizados con el software estadístico Expert Design (trial version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.). Las diferencias entre medias y ensayos F se consideraron significativas cuando las probabilidades estimadas fueron inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Los resultados experimentales se informaron como valor medio y error estándar de la media entre paréntesis.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Modelado y optimización

4.4.1.1 Ajuste de modelos y selección de variables respuesta

Se calcularon las ecuaciones individuales predictivas (Ec. 4.1) para todas las variables respuesta analizadas sobre hamburguesas obtenidas con harina de porotos comercial (Capítulo 2). La Tabla 4.2 muestra los coeficientes de los modelos resultantes para el rendimiento, parámetros de color y de textura.

Tabla 4.2. Coeficientes de regresión para los modelos propuestos para las variables respuesta (rendimiento, dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad, resiliencia, L* y b*) expresados en términos de nivel de harina de porotos (HP) y relación agua/harina de porotos (A/HP) codificados en las formulaciones de hamburguesas. Se expresan además los P valor para el modelo, falta de ajuste y coeficiente de “precisión adecuada”.

Variable respuesta	Coeficientes de regresión				Correlación (P)	Falta de ajuste (P)	Precisión Adecuada (P)
	Constante	HP	A/HP	HP x A/HP			
Rendimiento	89,58	-0,12	-1,16	----	<0,0001	0,137	11,57
Dureza	15,07	-2,18	-2,32	-0,94	<0,0001	0,385	14,46
Cohesividad	0,53	-0,013	-7,90x10 ⁻³	-4,41x10 ⁻³	<0,0001	0,911	16,49
Elasticidad	0,84	-0,024	-0,025	----	<0,0001	0,922	15,30
Masticabilidad	6,62	-1,17	-1,23	----	<0,0001	0,300	15,05
Resiliencia	0,36	-0,023	-0,013	----	<0,0001	0,165	19,70
L*	77,65	0,31	0,81	0,271	<0,0001	0,995	8,04
b*	12,06	0,39	-0,21	----	<0,0001	0,446	8,08

Es importante señalar que la mayoría de los modelos propuestos predijeron adecuadamente los resultados experimentales. Para el análisis de la varianza del modelo, valor P fue muy significativo para la mayoría de las variables (P < 0,0001). Sin embargo, no fue posible establecer un modelo matemático para la respuesta del parámetro a* del color.

Un modelo de regresión exhibe falta de ajuste cuando no puede describir adecuadamente la relación funcional entre los factores experimentales y la variable de respuesta. En este caso, los valores de falta de ajuste resultaron no significativos (P >

0,05). Por lo tanto, los resultados indicaron que la mayoría de las variaciones podrían explicarse bien con los modelos propuestos.

Respecto al parámetro “precisión adecuada”, todas las variables respuesta ajustadas por el modelo presentaron un valor mayor a 4, lo que indicó que los modelos resultaron adecuados para estudiar el espacio del diseño.

4.4.1.2 Análisis de las superficies de respuesta obtenidas

A partir de la significancia de los términos de cada modelo se pudieron analizar los efectos de las variables independientes sobre los parámetros de calidad de las hamburguesas elaboradas con harina de poroto proveniente de las variedades Cerrillos y Paloma.

Respuestas de rendimiento y parámetros de textura

En la **Figura 4.3** se presenta la superficie de respuesta obtenida para la variación del rendimiento de los productos híbridos en función del nivel de harina de porotos y de la relación agua/harina en su formulación.

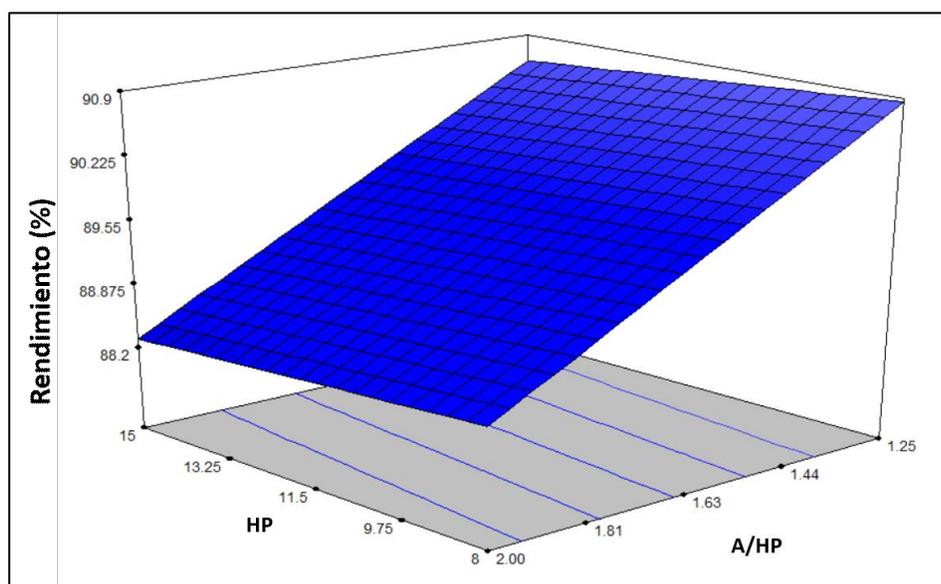


Figura 4.3 Superficie de respuesta para la variación del rendimiento (g/100 g) en función del nivel de harina de porotos (HP) y de la relación agua/harina de porotos (A/HP) de hamburguesas híbridas. Colores más claros indican mayores valores para los parámetros modelados.

Como se discutió anteriormente (**Capítulo 2**) el rendimiento para todas las hamburguesas híbridas fue mayor al 88 %. Según la **Tabla 4.1** y observando la superficie de respuesta correspondiente se pudo concluir que ambos factores (HP y relación A/HP) afectaron negativamente al rendimiento, pero siendo principalmente controlado por el factor A/HP debido a su coeficiente de un orden de magnitud mayor al correspondiente a HP (-1,16 vs. -0,12, **Tabla 4.1**). Es interesante señalar el bajo valor del coeficiente correspondiente al nivel de HP que demostraría que la sustitución parcial de la carne de cerdo por harina de porotos no ocasionaría una disminución marcada en el rendimiento del producto, indicando que podrían alcanzarse niveles de reemplazo más altos sin afectar significativamente a este parámetro.

En la **Figura 4.4 (a,b)** se presentan las superficies obtenidas para las variaciones de los parámetros de textura dureza y cohesividad de las hamburguesas híbridas en función del nivel de harina de porotos y de la relación agua/harina en las mismas. Como puede observarse en los coeficientes de la **Tabla 4.2**, los comportamientos de ambos parámetros estuvieron controlados por los dos factores, HP y relación A/HP, como así también por la interacción entre ellos, con coeficientes mayores para el caso de la dureza. Por lo tanto, las superficies de respuesta para estas dos variables mostraron tendencias similares. Ambos parámetros disminuyeron a medida que aumentaba el nivel de HP, con un efecto más notable cuando la relación A/HP aumentaba. Diversos autores han reportado que ciertos sustitutos cárnicos pueden proporcionar productos más blandos o tiernos, en productos elaborados a partir de carne picada debido a la capacidad de estos ingredientes para absorber agua y disolverse en la matriz de proteínas cárnicas, generando un producto más blando (Shorky, 2016; Ozer y Secen, 2018). Respecto a esto, Baugreet *et al.* (2016) explicaron el ablandamiento observado en hamburguesas con harina de legumbres por la baja densidad de las partículas de la harina y su rápida hidratación. La reducción en los valores de dureza conforme aumentó la cantidad de agua añadida (mayores relaciones A/HP) podría estar relacionada por el debilitamiento de la matriz en presencia de mayores cantidades de agua retenida (Liu *et al.*, 2008).

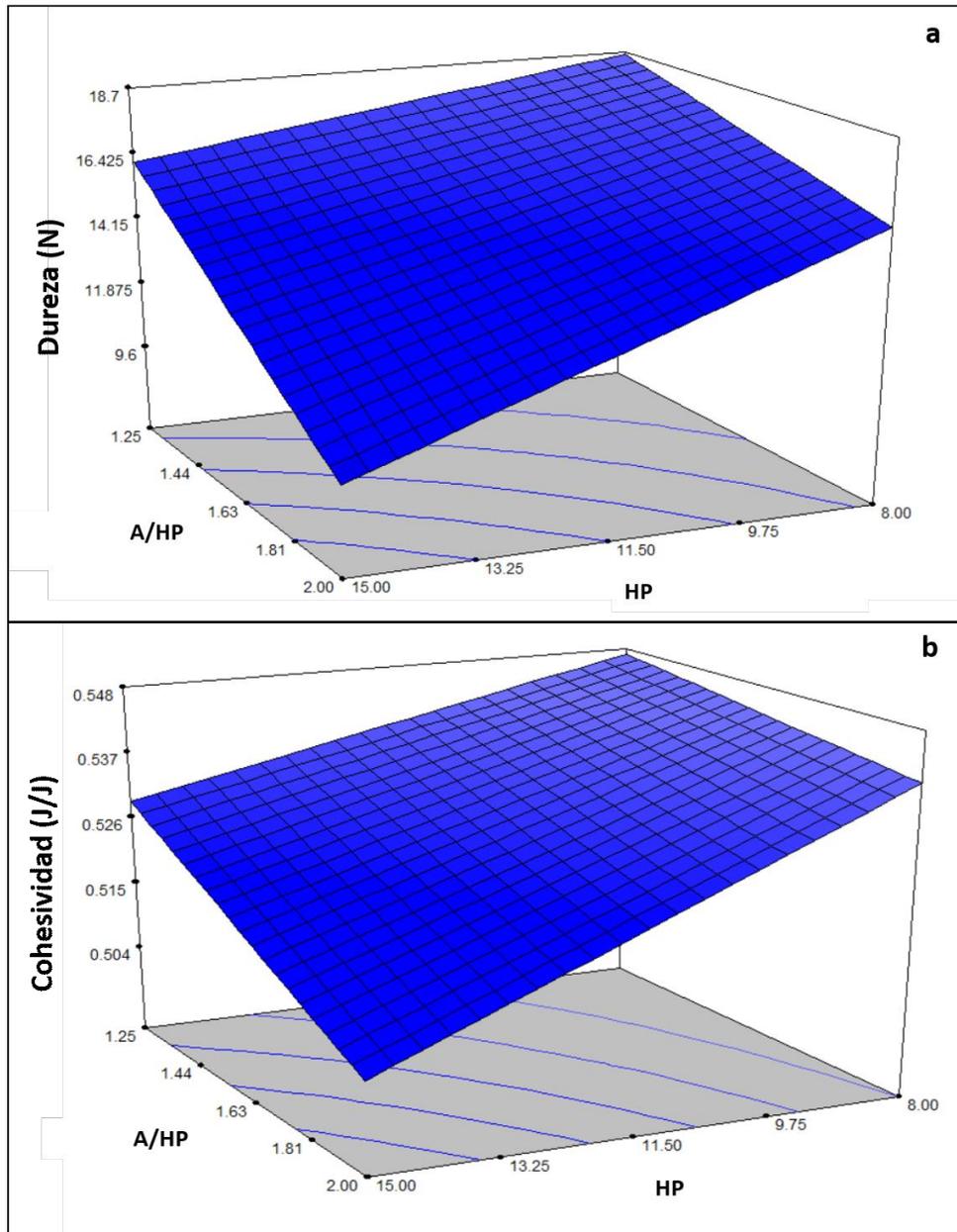


Figura 4.4 Superficie de respuesta para la variación de la (a) dureza y (b) cohesividad en función del nivel de harina de porotos (HP) y de la relación agua/harina de porotos (A/HP) de hamburguesas híbridas. Colores más claros indican mayores valores para los parámetros modelados.

En la **Figura 4.5** se presentan las correlaciones encontradas entre la dureza y la cohesividad de las hamburguesas y el contenido de carne (**Tabla 4.1**) en los productos.

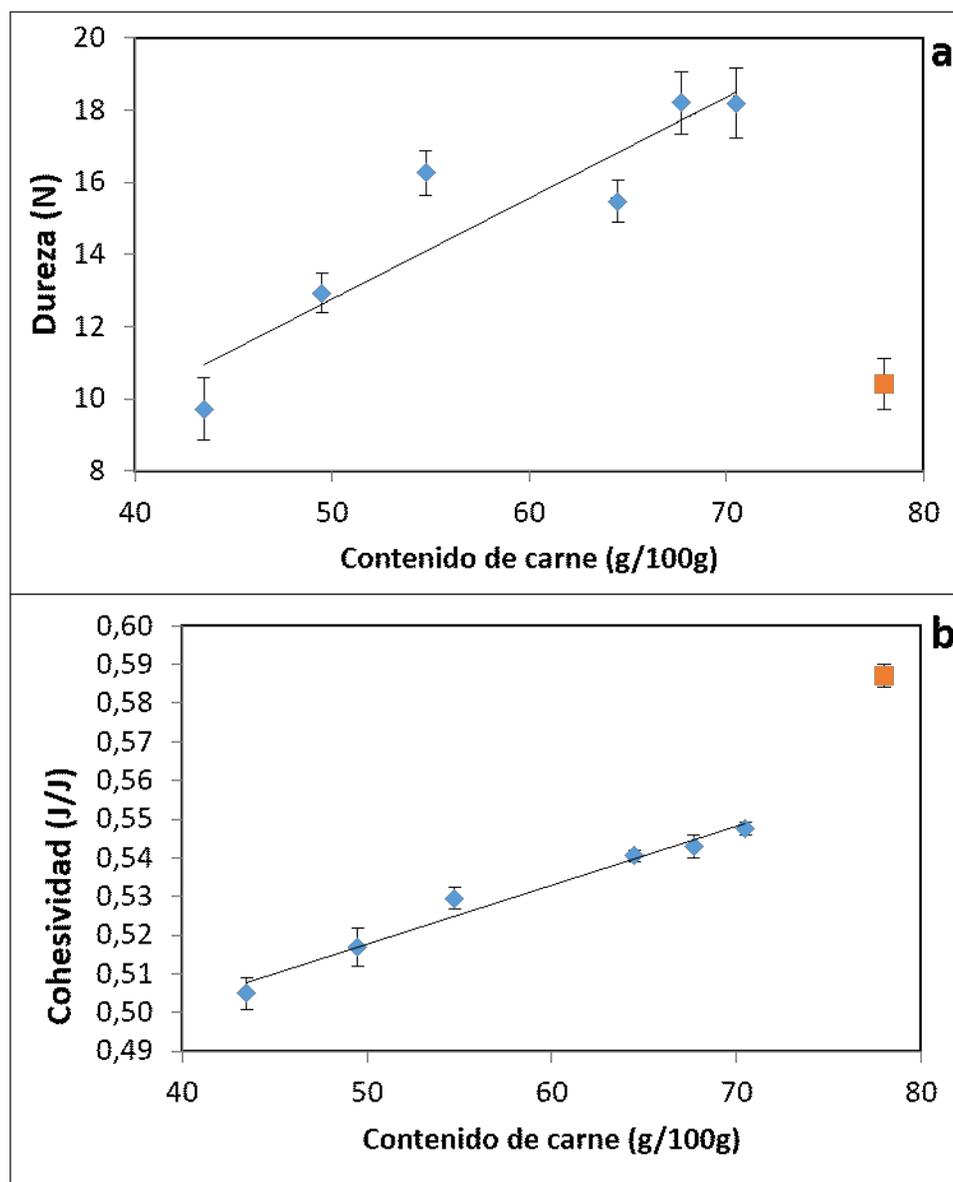


Figura 4.5. Dureza (a) y cohesividad (b) en función del contenido de carne del producto. (◆) hamburguesas con harina de poroto; (■) hamburguesa control; (—) correlación.

Cuando se analizó el comportamiento de la dureza de las hamburguesas híbridas se encontró una correlación importante entre este parámetro y el contenido de carne ($R^2 = 0,85$) del producto (**Figura 4.5a**). A mayores contenidos de harina y agua (mayor HP y

relación A/HP), que implican menor contenido de carne en la formulación (mayor reemplazo), los productos obtenidos presentaron menor dureza. Sin embargo, cuando se intentó incluir en este análisis el valor de dureza obtenido para la formulación control sin harina de porotos (máximo contenido de carne) se observó que éste fue similar a la dureza de la formulación híbrida con el menor contenido de carne (mayor contenido de harina+agua) y que no correlacionó con los resultados anteriores.

La diferencia entre la dureza de las hamburguesas híbridas y el control, donde se agregó agua, en menor cantidad, pero no harina de porotos, indicaría que ésta modifica la dureza del gel cárnico probablemente por cambios estructurales en la matriz compleja carne-harina, donde los componentes de la harina estarían interactuando con las proteínas de la carne. En bajas cantidades, el agregado de harina+agua reforzaría la matriz del sistema cárnico provocando el aumento de la dureza del producto obtenido, pero a mayores agregados resultaría en una matriz gelificada más blanda. Esto podría explicarse, como ya se mencionó, debido a la capacidad de los componentes de la harina de absorber agua, disolverse en la matriz de proteínas cárnicas, generando un producto cada vez más blando por una matriz con mayor cantidad de agua retenida.

Diversos resultados fueron observados por Tahmasebi (2015), quien encontró mayor dureza en salchichas con agregado de harina de Guandú (*Cajanus cajan*), y por Choi *et al.* (2010), quienes reportaron que la adición de fibra aumenta también la dureza de los productos cárnicos cuando se compararon con un control sin adición de las mismas.

Se encontró también correlación ($R^2= 0,97$) entre la cohesividad de las formulaciones con el agregado de HP y su contenido de carne (**Fig. 4.5b**). Pero al igual que para la dureza, la control sin harina presentó un valor de cohesividad muy superior al resto y sin correlación. Esto podría implicar que, si bien la interacción entre las proteínas de la carne y los componentes de la harina, en cierto nivel, podría reforzar la matriz y aumentar la dureza, también reduciría las conexiones entre las partículas de carne, dando lugar a una estructura menos densa y uniforme, disminuyendo su cohesividad (Jiménez-Colmenero, 2000). El agregado de harina, en cualquiera de las proporciones adicionada, siempre resulta en hamburguesas con valores de cohesividad menores al producto control.

Resultados similares fueron observados en sistemas cárnicos con el agregado de fibra de salvado de arroz (Zhuang *et al.*, 2016) y con harina de semillas de quínoa en *nuggets* de carne de cabra (Verma *et al.*, 2019).

Asimismo, Lee y Kim (1986) estudiaron el efecto del agregado de almidón de papa a surimi en sus características reológicas, observando un aumento en la dureza hasta llegar a un máximo para 6 % de almidón, pero a mayores agregados, el valor comenzaba a disminuir. Atribuyeron el refuerzo observado, al aumento de densidad de la matriz proteica asociado a las características elástica de los gránulos de almidón hinchados.

En la **Figura 4.6 (a,b,c)** se presentan las superficies obtenidas para los cambios en masticabilidad, elasticidad y resiliencia de los productos híbridos en función del nivel de HP y de la relación A/HP. Para estos parámetros se obtuvieron modelos lineales (**Tabla 4.2**). Los tres parámetros mostraron una correlación negativa tanto para el nivel de HP como para la relación A/HP, pero entre ellos, la masticabilidad mostró una mayor dependencia de ambos factores.

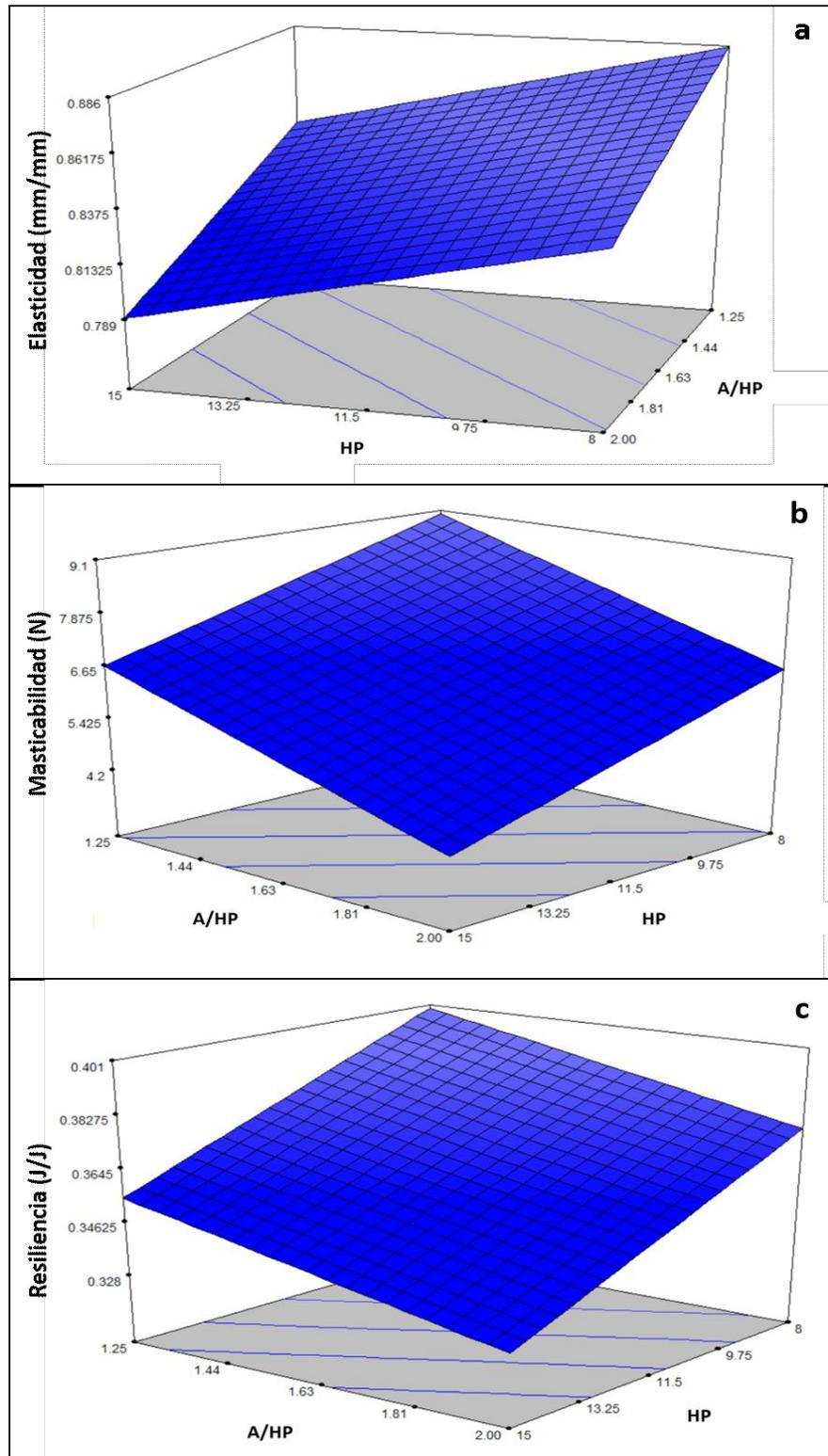


Figura 4.6 Superficie de respuesta para la variación de la (a) elasticidad, (b) masticabilidad y (c) resiliencia, en función del nivel de harina de porotos (HP) y de la relación agua/harina de porotos (A/HP) de hamburguesas híbridas. Colores más claros indican mayores valores para los parámetros modelados.

Respuestas de color

En la **Figura 4.7 (a,b)** se presentan las superficies obtenidas para los cambios en los parámetros de color L^* y b^* de los productos híbridos en función del nivel de HP y de la relación A/HP.

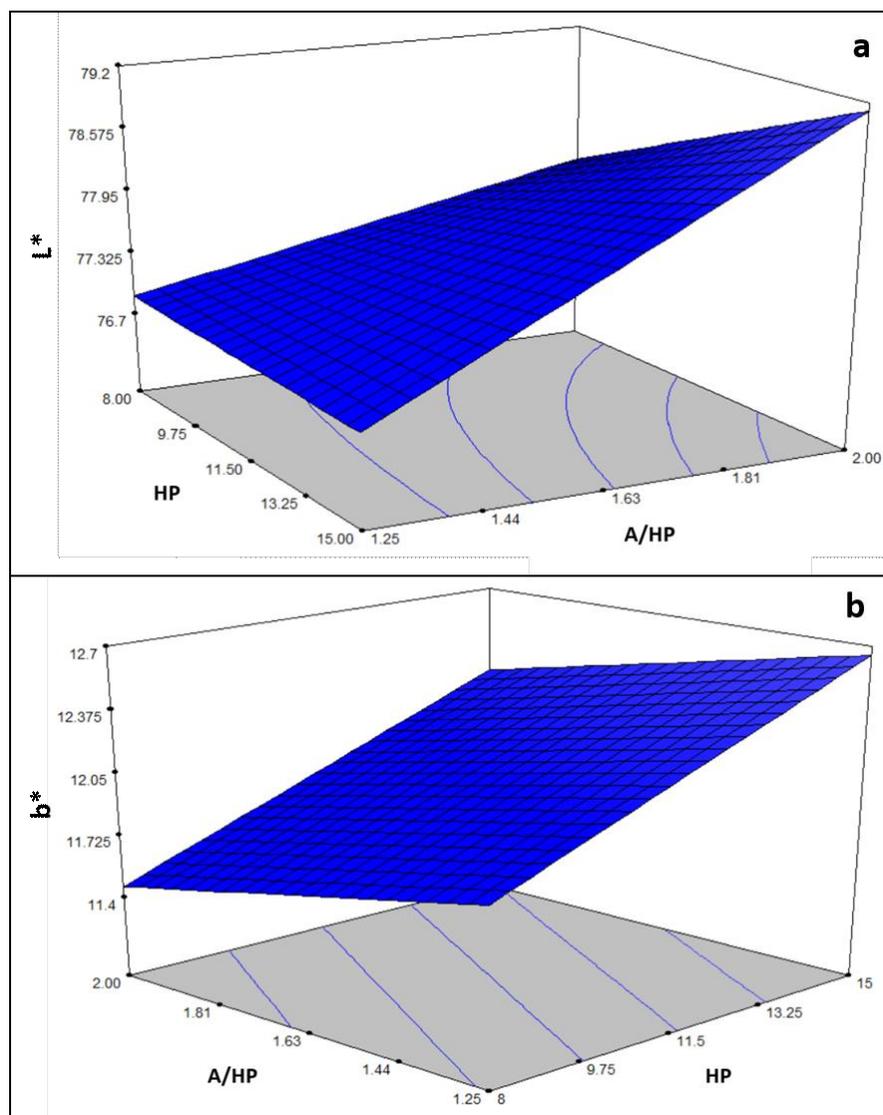


Figura 4.7 Superficie de respuesta para la variación de L^* (a) y b^* (b) en función del nivel de harina de porotos HP (A: Harina) y de la relación agua/harina de porotos A/HP (B: Agua/harina) de hamburguesas híbridas. Colores más claros indican mayores valores para los parámetros modelados.

Cuando se evaluó la respuesta a los parámetros de color, la luminosidad (L^*) fue dominada por el nivel de HP, la relación A/HP, como así también por la interacción entre ellos (**Tabla 4.2**). Como puede observarse en la **Figura 4.7a**, a mayor HP y mayor A/HP,

mayor el valor de L^* obtenido. Este aumento pudo explicarse en términos del color de la harina (blanco), como así también de la mayor cantidad de agua agregada. Resultados similares fueron observados en salchichas de carne de cerdo con la adición de almidón cuando el contenido de agua era incrementado (Beggs *et al.*, 1997; García-García y Totosaus, 2008).

Respecto a b^* , la interacción entre HP y relación A/HP no fue significativa (**Tabla 4.2**) pero se encontró una relación con el contenido de HP positiva y negativa con la relación A/HP.

Como se describió anteriormente, no fue posible establecer un modelo para el parámetro a^* , encontrando un valor promedio para las formulaciones con HP de $a^* = 3,23 \pm 0,08$.

4.4.1.3 Optimización de la formulación

Entre las variables respuesta evaluadas en los productos, se seleccionaron para la optimización simultánea aquellas que resultaron significativas ($P < 0,05$) y mostraron buen ajuste. Por ello, el parámetro de color a^* no fue incluido. Asimismo, tampoco se consideró el parámetro L^* debido a que el valor obtenido para el producto comercial (70,08) (**Capítulo 2**) se encontraba por fuera del rango observado para las hamburguesas con poroto (74,75-81,45),

Respecto a la masticabilidad, no se incluyó en este procedimiento, ya que es una función lineal de la dureza, elasticidad, y cohesividad, y resultaría redundante considerarlo, al igual que la resiliencia por presentar una tendencia similar a la elasticidad.

Por lo tanto, una vez establecidas las ecuaciones predictivas individuales mediante el hallazgo de los coeficientes adecuados (**Tabla 4.2**), se definieron seis funciones objetivo para las variables seleccionadas: contenido de harina, rendimiento, dureza, cohesividad, elasticidad y parámetro b^* .

En la **Tabla 4.3** se muestran los criterios de optimización empleados para cada respuesta. El nivel de harina de porotos y el rendimiento fueron maximizados, los parámetros texturales dureza, cohesividad y elasticidad y el parámetro b^* fueron

establecidos como valores objetivo a partir de los determinados en el producto comercial previamente caracterizado (**Capítulo 2**).

Tabla 4.3. Criterios empleados para obtener las funciones de conveniencia individuales.

Variable respuesta	Criterio de optimización
Harina de poroto	Máximo
Rendimiento (%)	Máximo
Dureza (N)	12
Cohesividad	0,545
Elasticidad	0,81
b*	13

Mediante la optimización en base a estos criterios se encontró que la combinación óptima de harina de porotos (HP) y la relación agua/harina (A/HP) a incorporar en las hamburguesas de cerdo con aceite de girasol alto oleico pre-emulsificada correspondió a:

- **Harina de poroto: 15 g/100 g**
- **Relación agua/harina: 1,36 g/g**

Esta optimización presentó un valor de deseabilidad global (D) de 0,756. Este valor se encontró cercano a la unidad y es un indicador de cuán próxima se halla la formulación optimizada de cumplir de forma simultánea con todos los criterios establecidos. En la **Tabla 4.4** se informan todos los ingredientes y cantidades para elaborar 100 g de hamburguesa híbrida optimizada.

Tabla 4.4. Ingredientes para elaborar 100 g de hamburguesa híbrida con la formulación optimizada. TPP: tripolifosfato de sodio.

Ingrediente	g/100 g hamburguesa
Carne de cerdo	53,1
Harina	15
Agua	20,4
Aceite	10
NaCl	1
TPP	0,5

4.4.1.4 Validación del modelo

Los valores experimentales promedio obtenidos para cada variable respuesta sobre el producto elaborado según la formulación optimizada con harina de porotos NOA y los predichos por los correspondientes modelos se presentan en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5. Valores predichos y experimentales para rendimiento, dureza, cohesividad y elasticidad y parámetro b^* obtenidos para la formulación optimizada con 15 % de harina de porotos NOA y relación agua/harina 1,36.

Variable Respuesta	Valores predichos	Validación experimental	
		Promedio	Intervalo de confianza*
Rendimiento (%)	90,29	90,40 (0,5)	88,40-92,17
Dureza (N)	15,23	12,5 (0,8)	10,49-19,97
Cohesividad	0,536	0,513 (0,004)	0,51-0,55
Elasticidad	0,832	0,76 (0,01)	0,78-0,89
b^*	12,60	12,8 (0,1)	11,30-13,89

*Intervalo de confianza: $\alpha=0,05$

No se encontraron diferencias significativas entre los valores predichos y los experimentales para las variable respuesta analizadas ($P > 0,05$).

Por lo tanto, se pudo concluir que el procedimiento matemático elegido predijo adecuadamente los atributos de calidad de los productos híbridos, y que la utilización de harinas de porotos de variedades NOA mejoradas tuvo el mismo comportamiento respecto a la harina comercial. Esto último podría explicarse debido a las similitudes que presentaron en composición y propiedades funcionales (**Capítulo 3**).

4.4.2 Estudio de las transiciones térmicas

En la **Figura 4.8** se presentan, a modo de ejemplo, los termogramas obtenidos para la harina de porotos alubia Cerrillos (**Sección 3.4.8**), para la mezcla carne de cerdo/sales, y para una hamburguesa híbrida optimizada cruda, y para una muestra tomada del centro de la misma una vez cocida.

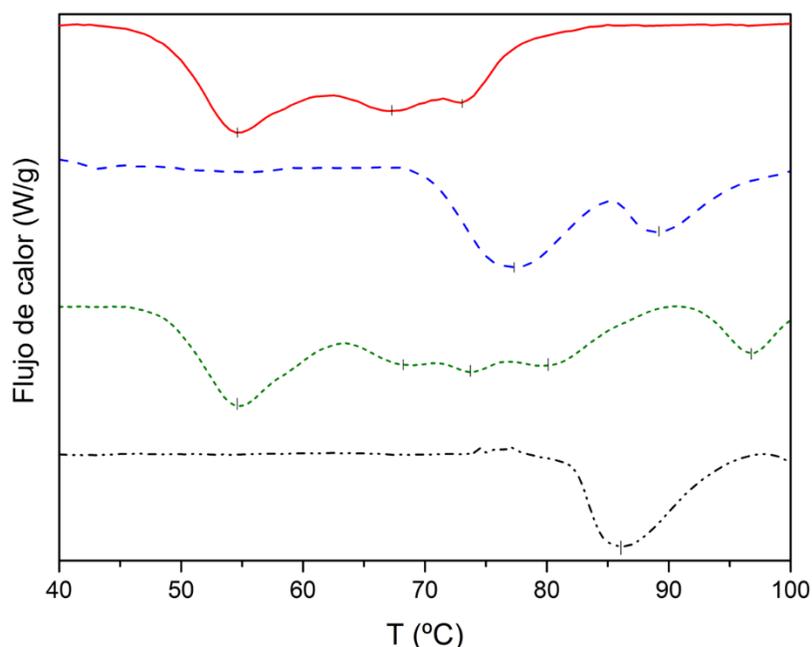


Figura 4.8 Termogramas correspondientes a mezcla carne/sales (—), harina de porotos (---), hamburguesa híbrida optimizada cruda (.....) y zona centro de hamburguesa híbrida optimizada cocida (-.-).

Todas las formulaciones de hamburguesas híbridas (formulaciones 1, 3, 4, 6 según **Tabla 2.1**) y optimizada, al ser analizadas crudas presentaron 5 transiciones endotérmicas a $54,56 \pm 0,08$ °C; $67,3 \pm 0,2$ °C; $73,7 \pm 0,1$ °C; $80,6 \pm 0,2$ °C y $96,4 \pm 0,2$ °C, sin diferencias significativas entre ellas.

Por comparación de estos termogramas con el obtenido para la mezcla de carne/sales, se pudieron asignar las tres primeras transiciones a la desnaturalización de las distintas fracciones de proteínas cárnicas en presencia de sal (Graiver *et al.*, 2006), correspondiendo a miosina ($T_p = 54,14$ °C), proteínas sarcoplasmáticas y colágeno ($T_p = 66,34$ °C), y actina ($T_p = 73,42$ °C). Si bien no se observaron diferencias en las T_p para las tres transiciones entre las formulaciones evaluadas, si hubo diferencias significativas en la entalpía asociada al primer pico. El agregado de harina de poroto ocasionó un aumento significativo ($P < 0,05$) en la energía requerida para la desnaturalización de miosina, que se evidenció al comparar las entalpías asociadas al primer pico para las diferentes formulaciones, mientras que la relación agua/harina de porotos no afectó

significativamente los resultados. Teniendo en cuenta los promedios para las formulaciones con la misma cantidad de harina, los resultados fueron 0,52; 0,64 y 0,95 W/g carne de cerdo para 0, 8 y 15 g harina de poroto/100g, respectivamente. La entalpía asociada al segundo pico no presentó diferencias para las distintas formulaciones, mientras que para el tercer pico no fue posible realizar la medición, debido a un solapamiento de este pico con el asociado a la cuarta transición. Este solapamiento también fue observado por Wu *et al.* (1985), cuando analizaron el efecto del agregado de diferentes almidones a surimi sobre las transiciones térmicas del mismo y por Belibagli (2003) en un sistema similar.

Por otro lado, por comparación entre los termogramas correspondientes a las hamburguesas crudas y el correspondiente a la harina de porotos, la cuarta transición ($76,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,4$) fue atribuida a la gelatinización del almidón y la quinta ($90,1 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$) principalmente a la desnaturalización de proteínas de la harina, tal como se describió en la **Sección 3.4.8.**

Al comparar las transiciones de la harina en las hamburguesas híbridas respecto a las de la harina en agua, se encontró que ambas temperaturas de pico se presentaron desplazadas a temperaturas mayores. Por lo tanto, si bien la presencia de harina no afectó las transiciones de las proteínas de la carne, las transiciones de la harina fueron afectadas por su incorporación en el sistema cárnico. Estas diferencias podrían atribuirse a alteraciones en los cristalitos de almidón por formación de complejos con otras moléculas en el sistema cárnico (Belibagli *et al.*, 2003), o por la presencia de sal, la que podría restringir el hinchamiento de los gránulos (Bello-Perez y Paredes-Lopez, 2009). Además, durante la gelación de la matriz cárnica, que comienza con la desnaturalización de la miosina, el agua resulta atrapada por la red proteica pudiendo reducir la necesaria para la posterior gelatinización del almidón, ocasionando su corrimiento a mayores temperaturas (Wu *et al.*, 1985). Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores, donde la temperatura de gelatinización aumenta, la entalpía asociada disminuye y la endoterma resulta más ancha cuando se aplica calor a un alimento que contiene almidón respecto a las transiciones del almidón aislado (Elgadir *et al.*, 2009). La disminución en la energía

asociada a la gelatinización no pudo ser corroborada, debido al solapamiento con otro pico, como se explicó anteriormente. Los resultados obtenidos en este ensayo coinciden con otros autores (Li y Yeh, 2002; Wu *et al.*, 1985) los cuales sostienen que la gelación de las proteínas cárnicas y la gelatinización del almidón son dos eventos térmicos independientes durante la cocción del producto.

Cuando existen dos componentes en la matriz que son capaces de formar una red continua del gel, los factores más relevantes son la concentración y la temperatura que alcanza el sistema. Generalmente, el componente que tiene menor temperatura de transición es el que forma la red continua. La gelificación de la miosina se produce en dos etapas. La primera etapa de la reacción, entre 30 y 50 °C implica la agregación de las cabezas globulares de la miosina, y la segunda etapa, a temperaturas superiores a 50 °C, está asociada con la desnaturalización de la cola (Sharp y Offer, 1992). La gelación térmica de la miosina generalmente involucra ambos procesos, la desnaturalización y agregación de la misma.

En el caso del sistema estudiando, se forma el gel de miosina. Mientras que el rango de gelatinización de las harinas (74,7 °C - 82,8 °) se encuentra por encima de la temperatura alcanzada en la cocción que fue de 71 °C. Si bien la temperatura fue medida en el centro del producto y pueden existir zonas donde se hayan alcanzado temperaturas que permitan la gelatinización del granulo, no se alcanza la gelatinización completa. Esto se evidenció en el análisis térmico de las hamburguesas cocidas en las cuales no se detectaron transiciones térmicas en las muestras correspondientes a la parte interna de la superficie de los productos, mientras que en las muestras obtenidas de la zona centro se observó sólo una transición a 85 °C (**Figura 4.8**). Dado que el centro del producto alcanzó aproximadamente 71 °C durante el proceso de cocción, es esperable que las proteínas cárnicas se hayan desnaturalizado y que no se observen las transiciones asociadas a ellas. Por lo tanto, la transición observada correspondería principalmente a la gelatinización de alguna fracción de almidón nativo persistente. Probablemente, debido a la posible restricción en la disponibilidad de agua mencionada, agravada por las pérdidas acontecidas durante la cocción como así también, a fuertes interacciones con la matriz,

esta transición ocurre temperaturas aún mayores a las encontradas previamente al analizar la hamburguesa cruda.

4.4.3 Análisis de la microestructura

Las imágenes obtenidas por SEM de hamburguesas correspondientes al control y a la formulación híbrida optimizada pueden observarse en la **Figura 4.9** y **Figura 4.10**, respectivamente, donde se incluyeron, además, micrografías de los productos crudos y cocidos.

Como se puede observar en las **Figuras 4.9 a,c**, y **4.10 a,c,e** la apariencia de las matrices cárnicas de ambos productos difirieron sustancialmente en crudo y en cocido. En la hamburguesa control cruda se observó una matriz proteica escamosa y relativamente homogénea, lo cual fue más notorio con la cocción y que podría relacionarse con las altas pérdidas de líquido de este producto durante el proceso.

Por el contrario, en la formulación híbrida optimizada se observó una matriz granulosa conteniendo componentes de la harina (gránulos de almidón) que luego de la cocción resultó en una red tridimensional estable, y con textura firme, viscoelástica y suave, lo que podría asociarse a los mayores rendimientos (90,40 % para la hamburguesa híbrida optimizada vs 76,4 % para el control) y dureza en observados en este producto (12,5 N para la hamburguesa optimizada vs 10,2 N para el producto control (**Sección 2.4.2**)).

Se pudieron evidenciar algunas gotas de lípidos embebidas dentro de la matriz proteica de la formulación optimizada, tanto en crudo como en cocido, resultado de la pre-emulsificación del aceite de girasol alto oleico, adecuadamente retenidas por la matriz. Sin embargo, en el control, de igual proporción de aceite que la formulación optimizada, solo se observaron algunas pocas gotas lipídicas en crudo, siendo más difícil su observación en cocido.

En la hamburguesa optimizada cruda se observaron además un gran número de gránulos de almidón integrados a la matriz proteica (**Figura 4.10 a,b**). Algunos de estos gránulos fueron observados también en el producto cocido, manteniendo su apariencia en las micrografías que corresponden al centro del producto (**Figura 4.10 c,d**). Estos

resultados coinciden con lo observado en las transiciones térmicas de los productos cocidos donde se evidenció el pico asociado a la gelatinización del almidón, resultante del remanente de gránulos sin gelatinizar durante la cocción.

En las micrografías correspondientes a la superficie interna de la hamburguesa híbrida cocida, los gránulos de almidón presentaron un aspecto distorsionado (**Figura 4.10 e,f**). Esto puede deberse a que si bien los gránulos son insolubles en agua fría, pueden embeber agua de manera reversible, es decir, pueden hincharse ligeramente con el agua, y luego producirse el proceso inverso. En este caso, probablemente debido una deshidratación rápida como consecuencia de las elevadas temperaturas de la superficie de contacto de la plancha en la cual se cocinó el producto.

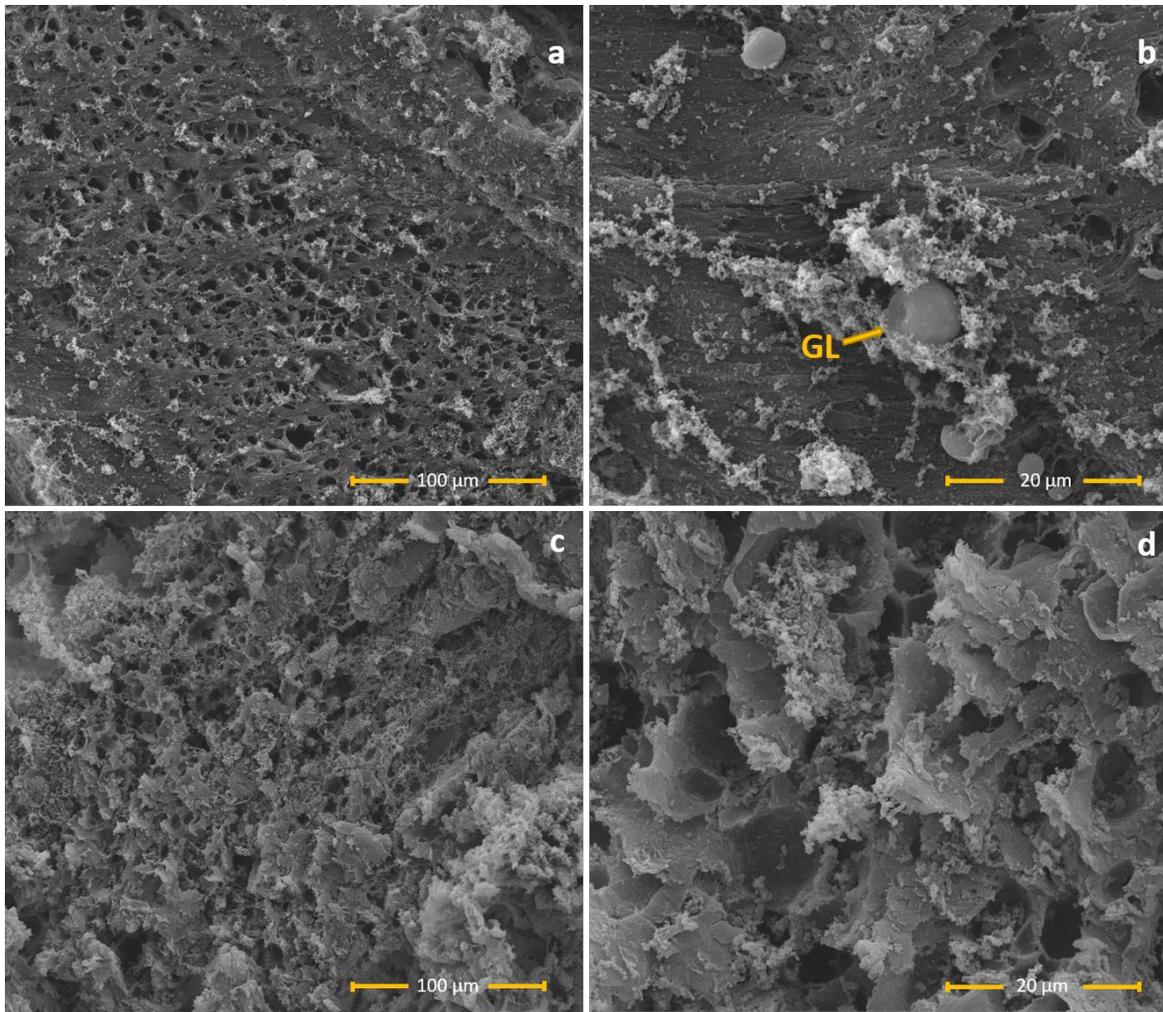


Figura 4.9. Micrografías de hamburguesa control: cruda (a, b) y cocida (c, d). GL: gotas de lípidos.

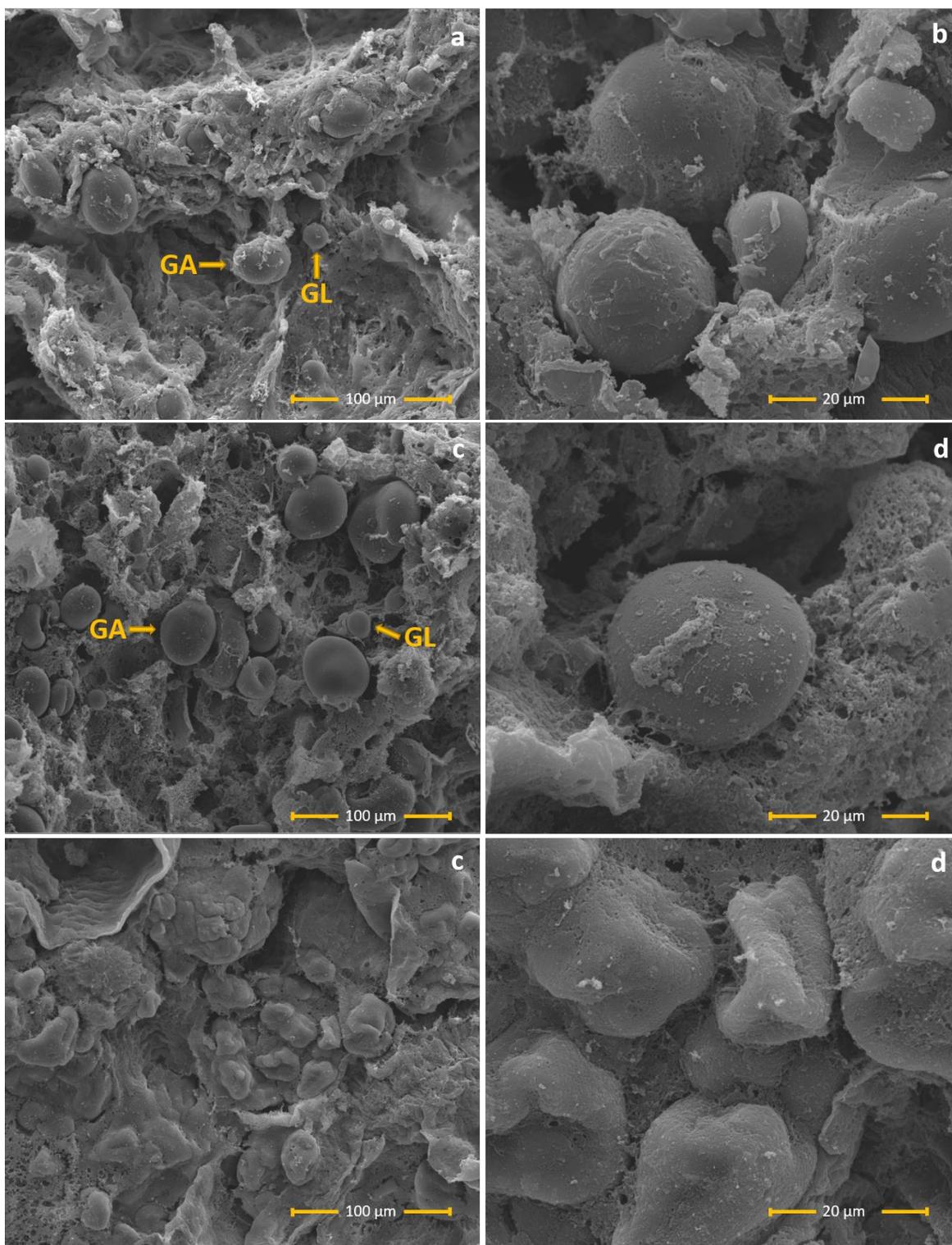


Figura 4.10. Micrografías de hamburguesa híbrida optimizada: cruda (a, b), cocida centro (c, d) y cocida superficie (e, f). GL: gotas de lípidos; GA: gránulos de almidón.

4.5 CONCLUSIONES

Mediante el modelado matemático de la respuesta para las variables estudiadas se pudo analizar el efecto del agregado de harina de porotos y de la relación agua/harina de porotos sobre las propiedades tecnológicas de los productos híbridos obtenidos.

Fue posible encontrar mediante la metodología de función deseabilidad en función de sus principales parámetros de calidad, la formulación híbrida optimizada (15 g harina de porotos/100 g y 1,36 g agua/g harina de porotos) y validarla experimentalmente, obteniendo un producto con adecuadas características físicas y similares a un producto comercial tradicional sin reemplazo de carne.

El producto híbrido optimizado crudo presentó cinco transiciones endotérmicas, las tres primeras correspondientes a la desnaturalización de las distintas fracciones de proteínas cárnicas en presencia de sal, la cuarta a la gelatinización del almidón y la quinta a la desnaturalización de proteínas de la harina, éstas dos últimas algo desplazadas a temperaturas mayores respecto a las obtenidas en la harina. En el centro del producto cocido se observó una única transición asociada a la gelatinización de alguna fracción de almidón nativo persistente, lo cual se confirmó mediante micrografías.

Por lo tanto, fue posible obtener una hamburguesa de cerdo híbrida mediante el reemplazo parcial de carne por 15 g de harina y 20,4 g de agua que demostró optimizar sus parámetros tecnológicos de calidad.

CAPÍTULO 5

Hamburguesas híbridas optimizadas. Evaluación nutricional y estabilidad durante el almacenamiento congelado

RESUMEN

Al elaborarse un alimento cárnico híbrido la fuente vegetal adicionada puede afectar tanto parámetros de calidad y como nutricionales. Si bien el agregado de ésta aporta fibra y diversos compuestos bioactivos, también las legumbres presentan en su composición compuestos considerados antinutricionales que deben ser evaluados para poder obtener un producto seguro.

Adicionalmente, si el producto se almacena congelado, es necesario evaluar la estabilidad de los distintos parámetros de calidad durante su vida útil.

En este Capítulo se evaluó la calidad nutricional de las hamburguesas optimizadas en el **Capítulo 4** por el agregado de harina de porotos y agua, incluyendo además el estudio de la persistencia del inhibidor de tripsina en el producto cocido. Asimismo, se estudió el efecto del reemplazo de carne sobre la estabilidad de los principales parámetros de calidad de las hamburguesas híbridas optimizadas durante 6 meses de almacenamiento congelado respecto a un producto control.

El producto híbrido optimizado presentó alto contenido de fibra y de minerales. El contenido de inhibidor de tripsina detectado en el producto crudo se redujo en un 50 % por la cocción. Durante el almacenamiento congelado, el producto híbrido optimizado demostró cambios menores en rendimiento, parámetros de textura y color. Se evidencio un leve aumento de la oxidación lipídica hacia el mes 3 con disminución posterior, pero manteniendo niveles sensorialmente aceptables. En cuanto al estudio de la capacidad antioxidante, el producto híbrido presentó valores algo superiores respecto al control, atribuido al aporte de los biocompuestos de la harina de porotos.

Por lo tanto, el producto híbrido optimizado presentó una composición en la que se destacó el aporte de minerales y de fibra, que lo distingue de la hamburguesa convencional, con adecuadas propiedades físicas y estabilidad durante su almacenamiento.

5.1 Introducción

5.1.1 Efecto de la incorporación de harina de porotos en la calidad nutricional de hamburguesas

Una gran parte de la carne consumida en países industrializados previamente es procesada. Su versatilidad, productos más atractivos, mayor costo-efectividad, y elevada vida útil son algunas de las principales características que distinguen a los derivados cárnicos de la carne fresca. Sin embargo, como ya se mencionó, en un intento por reducir el consumo de carne, una emergente aproximación es diversificar los tipos de alimentos en la dieta para contribuir a un uso de la carne y hábitos de consumo más sustentables, pero al mismo tiempo logrando un alto valor nutricional.

Las emisiones de gases de efecto invernadero de la producción ganadera tienen un gran impacto en el medio ambiente. La evaluación del ciclo de vida es un método aceptado para evaluar el impacto ambiental potencial a lo largo de todo el ciclo de vida de un producto o de una actividad. Esta representa un indicador ambiental para evaluar la sostenibilidad de los productos del sector ganadero. A partir de los estudios publicados que evaluaron el impacto de la producción la carne, se concluyó que la carne vacuna presenta un impacto ambiental mucho mayor que la de cerdo (McAuliffe *et al.*, 2016; Zervas y Tsiplakou, 2016), incluso al comparar productos finales como hamburguesas de ambos tipos de carne (Saerens *et al.*, 2021). Distintas investigaciones plantean que la sustitución de consumo de ganado rumiante de carne roja por otros animales monogástricos como los cerdos reduciría significativamente la producción de metano, con la consecuente menor generación de gases de efecto invernadero, a mediano-largo plazo, y menor impacto ambiental (Brieva y Costa, 2014).

Desde el punto de vista nutricional, la carne de cerdo es rica en minerales esenciales y vitaminas (Fe, Zn, Se, vitaminas D, B1, B2, B6, B12), presentando alta biodisponibilidad (Higgs y Pratt, 1998). Respecto al contenido de proteínas (18 - 22 % en músculo fresco) su composición aminoacídica es balanceada. En cuanto al contenido lipídico y la composición de los mismos, estos difieren de acuerdo al tipo de músculo y/o partes comestibles de la canal, y además la variabilidad entre animales. En términos de la composición lipídica, se incluyen ácidos grasos saturados (35 - 45 %), monoinsaturados (42 - 52 %) y poliinsaturados (5 - 20 %), destacándose la presencia de ácidos grasos n-3 y n-6 (Poklukar *et al.*, 2020). En los cerdos, la grasa intramuscular

varía entre 1 a 10 %, y esos lípidos están representados por triglicéridos (0,5 a 5%), fosfolípidos (0,5 a 1 %) y colesterol (0,05 a 0,1 %) (Schwob *et al.*, 2020). El contenido de triglicéridos y su composición es muy variable, y depende del músculo y de otros factores, como el genotipo, sexo, y especialmente la dieta administrada al animal (Lebret, 2008; Wood *et al.*, 2008).

Como ya se dijo, debido a su elevado contenido proteico, con alta funcionalidad y valor biológico, las harinas de legumbres tienen un alto potencial para ser usadas como reemplazantes de carne. En legumbres, la fracción de las globulinas son las principales responsables de la funcionalidad, por ejemplo, retención de agua, emulsificación, formación de gel (Farooq y Boye, 2011; aJarpa-Parra, 2018; Shevkani *et al.*, 2019; Toews y Wang, 2013). Su desempeño funcional es comparable o aun mayor a las proteínas de soja, las que son frecuentemente empleadas en la industria cárnica.

Un problema relevante derivado de la utilización de las harinas de legumbres como ingredientes en alimentos procesados es que contienen una elevada cantidad de compuestos considerados antinutrientes naturales (Paterson *et al.*, 2017).

Respecto a los inhibidores de proteasas en legumbres, se encuentran exclusivamente en sus semillas, ya que no se han detectado en hojas, raíces u otras partes de las plantas. Por ello, sus harinas los poseen. Particularmente en el poroto, los antinutrientes tipo inhibidores de proteasas encontrados pertenecen a la familia Bowman Birk (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018), como se describió anteriormente, caracterizados por ser proteínas pequeñas (4-8 kDa aproximadamente) con 14 residuos de cisteína formando 7 puentes disulfuro intracatenarios y dos sitios activos (Qi *et al.*, 2005). Los inhibidores de proteasas presentan características distintivas como poseer extraordinarias estabilidades fisicoquímicas tales como resistencia a temperaturas extremas, valores extremos de pH y/o altas fuerzas salinas, entre otras. Debido a esto, es importante evaluar la eficacia del tratamiento térmico aplicado sobre el producto al que la harina de legumbres es incorporada, determinando los niveles de inhibidores residuales y si éstos se hallan dentro de márgenes seguros.

5.1.2 Almacenamiento congelado de productos cárnicos

Las hamburguesas, en general, son rápidamente congeladas tras su elaboración y almacenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante varios meses en la industria o freezers hogareños por su conveniente y fácil preparación y flavor (Choi *et al.*, 2012). Como método de conservación, la congelación puede prolongar eficientemente el período de almacenamiento y mantener la calidad de productos cárnicos (Barraza *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

Sin embargo, durante este largo período pueden ocurrir fluctuaciones de temperatura con la consecuente formación de grandes cristales de hielo extracelulares que provocan serios daños mecánicos (Zhang *et al.*, 2017). Existe la posibilidad de que el congelado ocasione deterioros inevitable en la calidad de la carne como en su contenido de humedad, pérdidas por descongelado, y pérdida de frescura (Bertram *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2019). Además, la oxidación es también uno de las principales causas de deterioro de calidad de carne y productos cárnicos (Carballo *et al.*, 2018) debido a que uno de los factores que promueven la oxidación, como lo son las enzimas (lipooxigenasas, lipasas), mantienen su actividad aún en temperaturas de congelación (Hernández *et al.*, 1999). El deterioro, especialmente de flavor y textura, es inducido por oxidación, remoción osmótica de agua y desnaturalización proteica (Huang *et al.*, 2013; Utrera *et al.*, 2014).

El punto de congelación de la carne magra es de aproximadamente $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la composición. A temperaturas menores a los $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, más del 80 % del agua está congelada. Las consecuencias de esta crioconcentración (cambios en la viscosidad, en la presión osmótica, pH, etc.), pueden causar la desnaturalización de las proteínas. Estos cambios en las propiedades funcionales de las mismas pueden ocasionar cambios de color, textura y sabor (Pérez Chabela y Mateo-Oyague, 2006).

Además, durante el almacenamiento del producto congelado, existen pérdidas de agua por evaporación, sublimación y exudación. De acuerdo a la magnitud de estas pérdidas pueden o no afectar la calidad del producto luego de la cocción.

Por lo tanto, la congelación y el almacenamiento congelado pueden producir efectos profundos en las propiedades estructurales y químicas de la carne, incluidos cambios en las fibras musculares, lípidos y proteínas, todos los cuales tienen el

potencial de influir en los atributos de calidad tanto de la carne como de los productos derivados de ésta.

5.1.2.1 Cambios en textura

Han sido ampliamente estudiados los cambios de calidad durante la congelación y el almacenamiento congelado de hamburguesas de carne (Bertram *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2006; Utrera *et al.*, 2015).

Por lo tanto, uno de los principales parámetros que puede verse afectado por el almacenamiento congelado es la textura. La textura es un atributo clave utilizado en la industria de alimentos frescos y procesados para evaluar la calidad y aceptabilidad del producto. Los atributos de calidad textural de los alimentos pueden evaluarse mediante pruebas descriptivas sensoriales o análisis instrumentales. La combinación de tiempo/alto costo asociado a las pruebas sensoriales ha motivado el desarrollo y el uso generalizado de pruebas mecánicas empíricas que se correlacionan con las percepciones sensoriales de la textura de los alimentos (Costa *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2007). A lo largo de los años, una amplia gama de pruebas instrumentales se han utilizado tanto en la investigación como en la industria para evaluar la textura de los alimentos.

La formulación de un alimento está fuertemente influenciada por los cambios deseados o no deseados de la textura (Foegeding *et al.*, 2010), por lo tanto resulta de suma relevancia poder evaluar y considerar los atributos de textura para la elaboración de un alimento.

5.1.2.2 Oxidación lipídica como parámetro de calidad

La oxidación es un fenómeno común en tanto en la carne, como en los productos cárnicos durante el almacenamiento congelado (Huang *et al.*, 2013). La oxidación induce modificaciones de los lípidos y las proteínas del músculo, afectando las propiedades organolépticas (decoloración, textura inadecuada, desarrollo de olores y sabores desagradables, reducción de su vida útil) (Estévez, 2011; Soyer *et al.*, 2010), la calidad nutricional, así como la aparición de compuestos potencialmente tóxicos (Insani *et al.*, 2008; Morrissey *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1996; Vestergaard y Parolari, 1999 y Sampels, 2013).

Por su composición, la carne es muy susceptible a la oxidación (Wood *et al.*, 2008), y su estabilidad oxidativa depende del equilibrio e interacción entre sustancias antioxidantes y prooxidantes endógenas, y la presencia de sustancias propensas a la oxidación, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, proteínas y pigmentos (Bertelsen *et al.*, 2000; Decker y Xu, 1998). El sistema antioxidante endógeno de la carne está compuesto por diversas sustancias tanto hidrófilas como lipofílicas, como la vitamina E, vitamina C, carotenoides, polifenoles, y enzimas como el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Chan y Decker, 1994; Decker *et al.*, 2000). Además depende de factores extrínsecos como condiciones de procesamiento y concentración de oxígeno (Choe y Min, 2006).

La oxidación lipídica es un fenómeno complejo inducido por el oxígeno en presencia de iniciadores tales como calor, radicales libres, luz, fotosensibilización, pigmentos y iones metálicos. Puede ocurrir mediante tres procesos principales: auto-oxidación no enzimática mediada por radicales libres (reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos), fotooxidación no enzimática y no radical, y oxidación enzimática. Entre ellos, la auto-oxidación es el proceso más frecuente que provoca el deterioro oxidativo (Laguerre *et al.*, 2007). Genera principalmente hidroperóxidos y compuestos volátiles, generalmente a través de tres fases: i) iniciación, en la cual se produce el rompimiento homolítico de un hidrógeno en posición α relativo al doble enlace (RH) de la cadena del ácido graso formando radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) a partir de las moléculas lipídicas, ii) *propagación*: reacción del radical lipídico ($R\bullet$) con el oxígeno molecular formando un radical lipídico peroxi ($ROO\bullet$), capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado y, por tanto, propagar la reacción en cadena, iii) *terminación*: radicales libres e hidroperóxidos (productos primarios de la oxidación lipídica) se descomponen generando moléculas estables de bajo peso molecular (productos secundarios) tales como aldehídos, cetonas, ácidos y una larga variedad de compuestos que contienen nitrógeno y sulfuro, que imparten malos olores y sabores a los alimentos (Esteves, 2005).

Durante la producción de derivados cárnicos, la carne magra y el tejido adiposo son finamente picados alterando la integridad de membranas y exponiendo a los fosfolípidos al oxígeno molecular, enzimas oxidativas, hemopigmentos, iones metálicos, entre otros, aumentando el desarrollo de reacciones de oxidación durante

su posterior almacenamiento. En el caso del producto cárnico estudiado en este trabajo, la incorporación de aceite pre-emulsificado a carne magra picada podría influir en su susceptibilidad a la oxidación, pero además, debido a la posible presencia de lipooxigenasas en la harina de porotos, enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos insaturados a peróxidos (o compuestos relacionados) así como de la mioglobina (Verma *et al.*, 1984), la oxidación lipídica de las hamburguesas híbridas debe ser evaluada.

5.2 Objetivos

Sobre hamburguesas de carne de cerdo con reemplazo parcial por harina de porotos con una formulación optimizada en el **Capítulo 4**, se plantearon los siguientes objetivos:

- analizar la calidad nutricional de los productos obtenidos evaluando su composición, aporte calórico y contenido de inhibidor de tripsina
- evaluar los cambios en los parámetros de calidad durante el almacenamiento congelado.
- evaluar la estabilidad oxidativa y la capacidad antioxidante de las muestras durante el almacenamiento congelado

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Elaboración de hamburguesas control y optimizadas

Se elaboraron hamburguesas siguiendo la formulación control (**Tabla 2.1**) y la formulación optimizada en el **Capítulo 4 (Sección 4.1.1.3)** mediante el empleo de harina de porotos NOA Cerrillos y Paloma en igual proporción. Cada formulación fue obtenida por duplicado a partir de dos lotes independientes de carne, cada uno compuesto por 2 piezas de diferentes de animales.

Se siguió el protocolo de elaboración descrito en la sección **2.3.3**. Se obtuvieron 9 hamburguesas para cada formulación y lote, que se dispusieron interfoliadas en bandejas de aluminio, se envasaron en bolsas de polietileno (PO_2 : $0,2 \text{ cm}^3\text{m}^{-2}\text{día}^{-1}\text{kPa}^{-1}$ a 23 °C , Maraflex, Bemis, Buenos Aires, Argentina), se congelaron y almacenaron a -20 °C durante 6 meses.

5.3.2 Caracterización nutricional

5.3.2.1 Composición y valor calórico

Sobre las hamburguesas control y las híbridas optimizadas se determinaron por duplicado el contenido de humedad, lípidos, cenizas y proteínas según metodología descrita en la **Sección 1.3.3.2**. Para las hamburguesas híbridas optimizadas, el contenido de hidratos de carbono totales fue calculado por diferencia, mientras que el contenido de fibra dietaria total fue estimado mediante el cálculo del aporte de la harina adicionada.

Se evaluó el valor calórico de las hamburguesas híbridas y control, asociado a la energía contenida en sus macronutrientes: carbohidratos, lípidos y proteínas, como las calorías totales (kCal) aportadas por 100 g de cada producto cocido utilizando los factores de Atwater (4 kcal/g proteína, 9 kcal/g lípidos y 4 kcal/g carbohidratos totales) (Cáceres *et al.*, 2006). Si bien los resultados obtenidos no son totalmente exactos debido a que la energía bruta de los macronutrientes no es constante (diferencias en estructura química de sus diferentes fuentes podría alterar la energía que el organismo obtiene de ellas, afectando así su disponibilidad (Buchholz y Schoeller, 2004), se utilizaron para comparar el aporte calórico entre ambas formulaciones.

5.3.2.2 Contenido de inhibidor de tripsina

Se evaluó la presencia del inhibidor de tripsina en las hamburguesas de cerdo con harina de porotos optimizada y en las hamburguesas control, tanto en crudo y en cocido, siguiendo el protocolo descrito en las secciones **3.3.6.1** y **3.3.6.2** respectivamente. Se calculó además la reducción de su contenido, en porcentaje, debida al tratamiento térmico como la ***Inactivación del Factor Antinutricional*** (IFA). Para ello, el producto crudo (sin tratamiento térmico) fue tomado como referencia (REF) y a los valores que le correspondieron se les atribuyó un 100 % de actividad (FA):

$$FA (\%) = (\% \text{ Inhibición de tripsina en la muestra} / \text{REF}) \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

A partir de estos resultados se calculó la reducción según la expresión:

$$IFA (\%) = 100 - FA \quad \text{Ec. 5.2}$$

5.3.3 Estabilidad durante el almacenamiento congelado

Durante el almacenamiento, periódicamente se tomaron muestras de forma aleatoria de cada formulación, se sometieron al proceso de cocción como se describió en la **Sección 2.3.4** y se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

5.3.3.1 Rendimiento

La evaluación del rendimiento se realizó según lo descrito en la sección **2.3.5.1**.

5.3.3.2 Color

Las mediciones colorimétricas se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección **2.3.5.5**.

5.3.3.3 Textura

El análisis de perfil de textura se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección **2.3.5.6**.

5.3.3.4 Oxidación lipídica

El método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, por su sigla en inglés) como indicador de la oxidación lipídica fue descrito por primera vez Kohn y Liversedge (1944) es su estudio de los productos de oxidación en tejidos animales. Patton y Kutz (1951) fueron los que establecieron que el malonaldehído (MDA) era el responsable de formar un complejo cromógeno color rosa con el TBA con un máximo de absorbancia a 532 nm. El MDA es el principal producto de la oxidación lipídica, sirviendo de indicador del avance de las reacciones de oxidación en carne y productos cárnicos (Raharjo y Sofos, 1993). Sin embargo, la reacción entre el TBA y el MDA no es específica, y otros compuestos carbonilos resultantes del proceso de oxidación pueden reaccionar con el TBA, sobrestimando los resultados (Rey *et al.*, 2005).

Para la determinación de la oxidación lipídica de los productos durante su almacenamiento congelado se utilizó entonces el método TBA, el cual reporta las sustancias reactivas al TBA (TBARS), según Pennisi Forell *et al.* (2010). Este análisis se realizó por triplicado sobre 2 g de muestra. Para precipitar la proteína presente y solubilizar las TBARS se usó ácido tricloroacético (TCA) 12 % y se colocó en baño de

agua-hielo. Luego se realizó una filtración por papel y posteriormente se centrifugó (13500 g, 10 min), para precipitar las posibles partículas en suspensión que hubieran atravesado el papel de filtro. Se tomaron 2 ml del sobrenadante y se colocaron en un tubo con 2 ml de reactivo TBA 0,5 % (preparado en agua el día de uso y sonicado previamente), dejando reaccionar en baño termostático a 70 °C durante 30 min. Luego, se enfrió bajo canilla y se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro (T-60 Vis Spectrophotometer, PG Instrument, Reino Unido). Las TBARS se expresaron como mg de malonaldehído (MDA)/kg producto.

Como control de las posibles interferencias se realizó el ensayo sobre la harina de porotos de acuerdo al protocolo previamente descrito.

5.3.3.5 Capacidad antioxidante

Debido a la complejidad que presenta la estructura física y la composición de la carne, se han aplicado diversas técnicas de extracción con solventes (agua, soluciones *buffers*, alcoholes, cloroformo, etc) para determinar la capacidad antioxidante sobre estas muestras (Descalzo *et al.*, 2007; Sacchetti *et al.*, 2008). Desafortunadamente, los métodos extractivos solo pueden medir la capacidad antioxidante de las fracciones solubles y extraíbles en el solvente utilizado. Debido a que la carne contiene una fracción insoluble significativa, y que existen varios fenómenos que pueden intervenir en el proceso (interacciones con el solvente, fenómenos de agregación, desnaturalización y oxidación proteica), los métodos extractivos conducen a una subestimación de la capacidad antioxidante. Por este motivo, surge el método QUENCHER (QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible, por su sigla en inglés) que se presenta como una alternativa práctica para salvar este inconveniente.

La capacidad antioxidante de los productos fue evaluada siguiendo dos tipos de metodologías, el método dependiente de extracción, tradicionalmente más usado, y el método de medida de la capacidad antioxidante total (no extractivo) o QUENCHER, y para ambos, aplicando los ensayos de ABTS y de DPPH.

Método dependiente de extracción: el protocolo de extracción y medida se realizó según Mancini *et al.* (2015). Para ello se tomaron 5 g de hamburguesa cocida y triturada, se agregaron 10 ml de etanol, se agitó 2 min en vortex, protegiendo el tubo de la luz con papel de aluminio. El material sólido fue separado mediante

centrifugación a 10000 rpm (Centrífuga CM2036, Rolco, Buenos Aires, Argentina), 10 min. El sobrenadante fue filtrado con papel de filtro, y el filtrado utilizado para las determinaciones de la capacidad antioxidante mediante las técnicas de DPPH y ABTS, reactivos preparados según lo descrito en la sección **1.3.3.3**. De acuerdo a las recomendaciones del Mancini *et al.* (2015) las medidas fueron realizadas a los 90 min para el método de DPPH y a los 6 min para el de ABTS.

Método QUENCHER: este método se basa en la medición directa de la capacidad antioxidante sobre muestras sólidas, sin requerir extracción y/o hidrólisis previa, a través del agregado del reactivo y la posterior lectura espectrofotométrica (Gökmen *et al.*, 2009). En este ensayo se pone en contacto directo el alimento sólido y la solución de reactivo radicalario. De esta forma, la fracción soluble de la muestra ejerce su capacidad antioxidante según la reacción habitual de tipo líquido-líquido, y al mismo tiempo, la parte insoluble ejerce su capacidad antioxidante por medio de la reacción superficial que ocurre en la interfase sólido-líquido.

Para llevar a cabo este método, las hamburguesas cocidas fueron procesadas, congeladas a -80 °C, liofilizadas (liofilizador Heto FD 4 conectado a una bomba rotativa a paletas Vacuubrand RZ 6, Alemania) y molidas hasta obtener partículas en un rango entre 140 a 60 mesh (0.1- 0.3 mm) (Serpen *et al.*, 2008).

Sobre las muestras así preparadas se determinó la capacidad antioxidante total mediante las técnicas de DPPH y ABTS. Las soluciones de trabajo fueron preparados de la siguiente manera:

Solución de trabajo de ABTS: dilución de solución stock de ABTS con mezcla agua:etanol 50:50 (v/v) hasta ajustar su absorbancia a 734 nm de la solución de trabajo entre 0,750 – 0,800.

Solución de trabajo de DPPH: se preparó una solución de DPPH 40 mg/L en etanol, y luego se diluyó con agua utilizando el mismo volumen de etanol, de manera de tener una solución final en agua:etanol 50:50 (v/v) y ajustando su absorbancia a 525 nm entre 0,750 – 0,800.

Para cada determinación, se pesaron 10 (\pm 1,0) mg de muestra liofilizada y se agregó 10 ml de las soluciones de trabajo de ABTS o DPPH, respectivamente. Luego se agitó en oscuridad por 30 min para la técnica de ABTS y 120 min para la técnica de

DPPH. Se centrifugó (9200 g, 2 min), y se midió la absorbancia al sobrenadante a la longitud de onda correspondiente.

Para el análisis de resultados obtenidos por ambas metodologías, se realizó una curva de calibración con Trolox (100 – 1000 μ M, concentración final) y los resultados fueron expresados como μ moles equivalente de Trolox (ET) por gramo de hamburguesa cocida.

5.3.4 Análisis estadístico

Procedimientos estadísticos tales como análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones pareadas de medias se llevaron a cabo mediante el software Infostat v2009 (Infostat 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó el ensayo de Tukey para estudiar las comparaciones pareadas de medias. Las diferencias entre medias y ensayos F se consideraron significativas cuando las probabilidades estimadas fueron inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Los resultados experimentales se informaron como valor medio y error estándar de la media entre paréntesis.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Composición y valor calórico

En la **Tabla 5.1** se presentan los resultados obtenidos para la composición proximal y valor calórico de las hamburguesas híbridas optimizadas y control cocidas.

Tabla 5.1. Composición proximal y valor calórico de hamburguesas de carne de cerdo cocidas elaboradas con la formulación híbrida optimizada (**Tabla 4.4**) y control (**Tabla 2.1**).

	Control	Optimizada
Agua (g/100g)	61,0 ^a (0,1)	55,36 ^b (0,02)
Lípidos (g/100g)	13,80 ^a (0,02)	11,2 ^b (0,2)
Proteínas (g/100g)	22,7 ^a (0,4)	16,98 ^b (0,04)
Cenizas (g/100 g)	2,58 ^b (0,03)	2,88 ^a (0,03)
Hidratos de Carbono + Fibra (por diferencia) (g/100 g)	-	13,58
Según cálculos:		
Fibra dietaria total (g/100 g)	-	3,73
Hidratos de Carbono disponibles (g/100 g)	-	9,85
kCal/100 g	215	223

Medias con distinto superíndice en una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Cuando se comparó el contenido de humedad en los productos, se encontró que el optimizado presentaba un valor inferior al control (**Tabla 5.1**). La hamburguesa híbrida optimizada, con un 32 % menos de carne y el agregado de harina, resultó en un producto de menor humedad respecto al control y un mayor contenido de sólidos (44,6 g/100 g hamburguesa para la optimizada; 36,48 g/100 g de hamburguesa para el control).

Respecto al contenido lipídico, el optimizado presentó un valor algo menor respecto al control (**Tabla 5.1**). Las legumbres, en general contienen bajos niveles de lípidos, especialmente los porotos, como se determinó en la **Sección 3.4.2** para la harina de porotos NOA (contenido lipídico medio 1,17 g/100 g de harina), por lo cual no sería representaría un aporte significativo al contenido lipídico del producto ni a su perfil de ácidos grasos. Al reemplazar parcialmente la carne por la harina y el agua, se redujo ligeramente el contenido en lípidos.

Ambos productos presentaron un contenido lipídico inferior al de las hamburguesas de cerdo tradicionales (de un 15 - 25 %, Picouet *et al.*, 2007). Asimismo, debido al empleo de aceite de girasol alto oleico en su elaboración, su perfil de ácidos grasos sería mejorado respecto a los productos tradicionales. De acuerdo al elaborador (Granix S.A.; Buenos Aires, Argentina), el aceite estaría compuesto por un 85 % de Omega 9, 7 % de Omega 6, y el resto por ácidos grasos saturados. Por lo tanto, el contenido lipídico y perfil de ácidos grasos en el producto optimizado estaría determinado por las dos principales fuentes de lípidos, la carne de cerdo magra y el aceite de girasol alto oleico.

El contenido de cenizas fue mayor para las hamburguesas optimizadas respecto a las control (**Tabla 5.1**), lo que pudo ser atribuido al aporte de minerales por parte de la harina de porotos agregada, con un contenido promedio de cenizas de 4,5 g/100 g de harina.

Cuando se analizó el contenido proteico de los productos se encontró que el producto híbrido optimizado presentó un valor inferior al de la formulación control (**Tabla 5.1**). Si bien el contenido de proteínas de la carne de cerdo (aproximadamente 20 %, Kim *et al.*, 2008) y de la harina de porotos (promedio entre ambas harinas de porotos NOA 21,2 g/100 g, **Sección 3.4.2**) resultó similar, parte del reemplazo de carne se realizó por agua, lo que provocaría un efecto de dilución de sus componentes.

Sin embargo, ambos productos resultaron con elevado contenido proteico y constituirían adecuadas opciones de aporte proteico. Baune *et al.* (2021) han determinado que el reemplazo parcial del 30 % de carne de cerdo por legumbres en productos tipo albóndiga para dietas dirigidas a niños presentaba una leve disminución en la Puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica (PDCAAS, del inglés *Protein digestibility-corrected amino acid score*) (de 0,9 vs 1,02 según USDA (2019) para carne de cerdo), afectado por el bajo contenido de valina y leucina en las proteínas de origen vegetal, pero siendo mayor al de una dieta estrictamente a base de plantas (PDCAAS teórico 0,6-0,7).

Mediante el cálculo por diferencia se pudo obtener la proporción correspondiente a hidratos de carbono totales (carbohidratos+fibra) en el producto híbrido, y conociendo la composición respecto a la fibra de la harina de porotos (**Sección 3.4.2**, media 24,6 g/100 g de harina) se pudo estimar el contenido de fibra dietaria total en el producto final (**Tabla 5.1**). Este contenido permite clasificar a la hamburguesa híbrida optimizada como "Fuente de Fibra" según Resolución GMC Mercado Común Nº 01/12, Reglamento Técnico MERCOSUR (Código Alimentario Argentino, Capítulo V), por contener "*al menos 3 g de fibra por cada 100 gramos de producto cocido*". Un adecuado aporte de fibra resulta fundamental para la salud gastrointestinal, como así también para el control de diversas enfermedades metabólicas. Un excesivo consumo de productos de base animal, comunes en las dietas occidentales, está asociado a deficiencias en la ingesta de fibra (Deehan y Walter, 2016). Por lo tanto, el producto híbrido desarrollado y optimizado en este trabajo podría contribuir a aumentar la ingesta de fibra en consumidores habituales de productos cárnicos.

Asimismo, en la fracción correspondiente a los hidratos de carbono en el producto híbrido, se podría destacar cierto contenido de almidón resistente, ya que representaría aproximadamente el 70 % del almidón total en porotos, y que también podría contribuir al control de enfermedades como diabetes e hiperglucemia (Du *et al.*, 2014).

Respecto al aporte calórico de las hamburguesas, y a consecuencia de las similitudes y diferencias descriptas asociadas a sus componentes, los valores obtenidos fueron similares para ambos productos (**Tabla 5.1**). Como fue descripto originalmente por Atwater (Atwater, 1902), el contenido de carbohidratos era determinado por

diferencia entre la masa total y el contenido de proteínas, lípidos, agua y cenizas, por lo tanto el contenido de fibra está incluido en ese valor. Teniendo en cuenta que no todos los hidratos de carbono aportan la misma cantidad de energía metabolizable, se estableció el llamado Sistema Extendido de Atwater, donde se asignaron valores especiales a algunos grupos de hidratos de carbono. Para la fibra no fermentable el valor asignado es de 0 kJ/g (0 kcal/g); 0 a 17 kJ/g (0 a 4,0 kcal/g) para la fermentable y de 0 a 8 kJ/g (0 a 1,9 kcal/g) para los alimentos comunes que contienen ambos tipos de fibra, asumiendo que en promedio los alimentos contienen un 70 % de aporte de fibra fermentable (FAO, 1998). Si bien se encuentran establecidos estos factores, no están ampliamente implementados. Aplicando estos factores en el cálculo del valor calórico de la hamburguesa optimizada, diferenciando el aporte de los hidratos de carbono de la fibra, que se consideró con 70 % de fermentable, el resultado es de 216 kCal/100 g, valor prácticamente igual al del producto control. Por lo tanto, la utilización de los factores de Atwater tradicionales, en donde se considera la fracción de fibra dentro de los hidratos de carbono para realizar el cálculo, sobreestima el valor calórico del producto.

De acuerdo a todo lo analizado relacionado a la composición, el producto optimizado híbrido se destacó principalmente por su alto contenido de fibra y minerales, respecto al producto tradicional.

Cabe mencionar que los productos híbridos, al reemplazar parte de la carne por un ingrediente más sustentable como son las legumbres, tendrían un menor impacto ambiental en comparación con un producto tradicional. Para analizar el efecto de estos reemplazos en la sustentabilidad de un producto se emplea como herramienta el Análisis del Ciclo de Vida (LCA, por su sigla en inglés), técnica que estudia los aspectos ambientales y el impacto potencial a lo largo del ciclo de vida de un producto o actividad, incluyendo el análisis desde la materia prima hasta su consumo, disposición o reciclado (ISO 14040, 2006). Diversos estudios utilizando el análisis LCA han demostrado los beneficios ambientales de la transición a una dieta basada en legumbres, debido a que éstas generan menor impacto en el clima y son más eficientes en el uso de los recursos, en comparación con una dieta basada en proteínas animales (Detzel *et al.*, 2018; Harwatt *et al.*, 2017). Específicamente, Baune *et al.* (2021) realizó este análisis para diversos productos cárnicos híbridos, entre los que se encontraba el

agregado de texturizado proteico de arvejas, encontrando en todas las formulaciones híbridas entre un 10 y 20 % de reducción del impacto ambiental respecto al producto convencional 100 % carne. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta la bibliografía existente sobre el tema, se podría inferir que el producto desarrollado en esta Tesis presentaría un menor impacto ambiental a partir del reemplazo de carne por harina de porotos, de similares características nutricionales respecto al tradicional pero mejorada respecto a los análogos elaborados solo con fuentes vegetales.

5.4.2 Inhibidor de tripsina

Los resultados para la determinación del contenido del inhibidor de tripsina se presentan en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2 Contenido de inhibidor de tripsina (UIT/mg) en hamburguesas control y en híbridas optimizadas con harina de porotos NOA.

Inhibidor de Tripsina (UIT/mg)	Control		Híbrida Optimizada	
	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido
	0,20 ^c (0,04)	0,02 ^d (0,02)	3,90 ^a (0,3)	2,0 ^b (0,3)

Los niveles de inhibidor obtenidos para la hamburguesa híbrida optimizada cruda resultaron los esperados teniendo en cuenta el valor medio obtenido en las harinas de porotos NOA (**Capítulo 3**) y la proporción en que fue incorporada en el producto final (15 %). Por otro lado, cuando se realizó la determinación sobre el producto híbrido cocido los niveles fueron menores (**Tabla 5.2**). Si bien la cantidad detectada en la hamburguesa optimizada luego de la cocción fue relativamente baja (2,0 TIU /mg muestra), excedió ligeramente los niveles asociados a estas recomendaciones de un producto de soja seguro, que serían de 1 a 1,5 TIU/mg.

Asimismo, para la hamburguesa control se obtuvieron valores bajos (**Tabla 5.2**). Esto estuvo de acuerdo a lo descrito por Doell *et al.* (1981), quienes analizaron diversos alimentos y detectaron inhibidores de tripsina en leche, huevos y carne de diversos orígenes, siendo para carne de cerdo cruda de 0,2 mg UIT/g. Estos resultados podrían atribuirse a la presencia de sustancias inhibidoras de tripsina no específicas *in vitro*, como los ácidos grasos libres, que interferirían en su determinación (Smith *et al.*, 1980).

En cuanto a la reducción del inhibidor de tripsina por la cocción para la formulación optimizada, el IFA resultó de 50,2 %, por lo tanto, el tratamiento térmico sólo logró inactivarlo en forma parcial. Tromp *et al.* (1995) y Osella *et al.* (1997) informaron que porcentajes de inactivación mayores al 80% son suficientes para garantizar la seguridad alimentaria de soja para el consumo humano, ya que los niveles residuales del inhibidor no interferirían en la digestión proteica ni ejercerían efectos adversos. La historia térmica del proceso de cocción de las hamburguesas congeladas se presentó en la **Figura 2.4** del **Capítulo 2**. Pudo observarse que recién al minuto 2 de cocción el centro comenzó a calentarse por arriba de 0 °C, aumentando su temperatura por encima de los 70 °C en un minuto aproximadamente. Como se mencionó, en los porotos se encuentran inhibidores de la familia Bowman-Birk. Éstos presentan una gran resistencia al tratamiento térmico, por lo que probablemente el corto tiempo de calentamiento en determinadas zonas del producto resulte en que una proporción del inhibidor permanezca sin inactivar. Un calentamiento previo de la harina antes de su incorporación podría reducir estos niveles, aunque se ha encontrado actividad inhibitoria en harina incluso aun después de haber sido calentadas (Chan *et al.*, 2013; Jourdan *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008).

5.4.3 Estabilidad durante el almacenamiento congelado

5.4.3.1 Rendimiento

Al analizar las variables, se encontró que el tipo de formulación influyó en los resultados del rendimiento, pero no el tiempo, ni la interacción entre ambos. La formulación optimizada presentó un rendimiento superior al control para todos los tiempos ensayados (valores promedios 89,1 % y 76,9 %, respectivamente).

A consecuencia del ASPO 2020 debido al Covid-19, un lote de cada formulación resultó con un almacenamiento extendido, de más de 10 meses (datos no mostrados) en donde pudo observarse que este parámetro permaneció con similares valores para la formulación optimizada pero se incrementó ligeramente para la formulación control (81,2 %). Por lo tanto, las hamburguesas híbridas optimizadas mantuvieron rendimientos más altos que el control durante los 6 meses de vida útil esperada, atribuido a la adecuada estabilidad de la matriz cárnica junto a componentes de la

harina que resultaron eficientes para retener los líquidos durante la cocción, incluso con la mayor proporción de agua incorporada en este producto.

5.4.3.3 Textura

En las **Figuras 5.1 y 5.2** se presentan los cambios en los parámetros de textura evaluados en las hamburguesas híbrida optimizada y control cocidas, a diferentes tiempo de almacenamiento congelado.

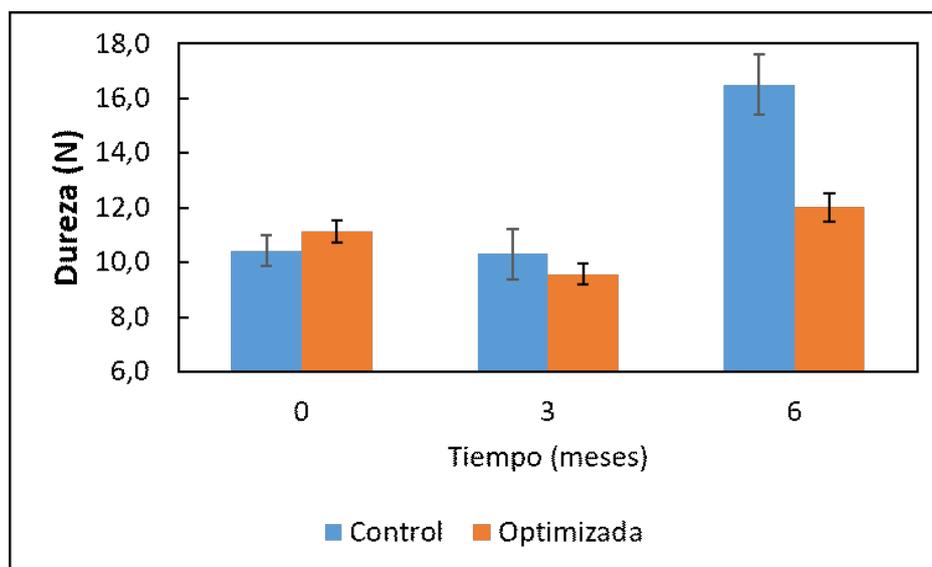


Figura 5.1. Variación de dureza en función del tiempo de almacenamiento congelado de hamburguesas híbrida optimizada y control.

Respecto a la dureza (**Figura 5.1**), tanto el tipo de formulación como el tiempo de almacenamiento, y la interacción entre ambos factores resultaron significativos ($P < 0,05$).

Al comparar las formulaciones, ambas presentaron valores de dureza inicial sin diferencias significativas ($P > 0,05$) (valor promedio, 11,05 N). Luego la tendencia observada para ambos productos fue que la dureza se mantuvo constante desde el tiempo 0 hasta el mes 3, sin diferencias significativas ($P > 0,05$) (valor promedio, 10,33 N), para luego producirse un aumento al mes 6, el cual fue más importante para la formulación control (16,47 N) en comparación con la optimizada (12,21 N) ($P < 0,05$).

Estos cambios podrían ser atribuidos en parte a la desnaturalización de las proteínas, principalmente las miofibrilares, durante el almacenamiento congelado, que

podrían agregarse y aumentar la dureza (Andrés *et al.*, 2011). Wagner y Añón (1985) han reportado que la fracción de miosina es la más afectada durante el almacenamiento congelado. Por otro lado, también podrían ser asociado con las pérdidas de líquidos durante el almacenamiento congelado como consecuencia de la recristalización por fluctuaciones en la temperatura y el daño causado por los cristales de hielo a la integridad estructural (Estévez *et al.*, 2005; Hassaballa *et al.*, 2009; Marchetti, 2014; Wang *et al.*, 2020).

Sin embargo, los resultados indicarían que la adición de harina de porotos estabilizaría la matriz lo suficiente como para que los cambios en la dureza durante el almacenamiento sean menos pronunciados en el producto híbrido respecto al control. Resultados similares fueron descritos por Sayas-Barberá *et al.* (2021) con el agregado de una fracción de la molienda de la quínoa, rica en fibra, en hamburguesas de carne bovina.

En la **Figura 5.2** se observan las variaciones en los parámetros cohesividad y elasticidad en función del tiempo de almacenamiento para las dos formulaciones ensayadas.

En las hamburguesas híbridas optimizadas no se observaron cambios en los parámetros de cohesividad, elasticidad, masticabilidad y resiliencia en función del tiempo de almacenamiento congelado ($P > 0,05$), lo que indicaría una adecuada estabilidad de la matriz obtenida. Los valores promedios fueron 0,515 J/J, 0,751 mm/mm, 4,4 N y 0,321 (J/J), respectivamente. Sin embargo, aunque para el producto control los parámetros masticabilidad y resiliencia también permanecieron constantes en función del tiempo ($P > 0,05$) (valores promedios, 4,7 N y 0,340 J/J, respectivamente), la resiliencia fue siempre mayor a del producto híbrido optimizado, y los valores de cohesividad y elasticidad disminuyeron para el mes 3 y luego permanecieron constantes, reflejando una matriz menos estable en durante el almacenamiento congelado.

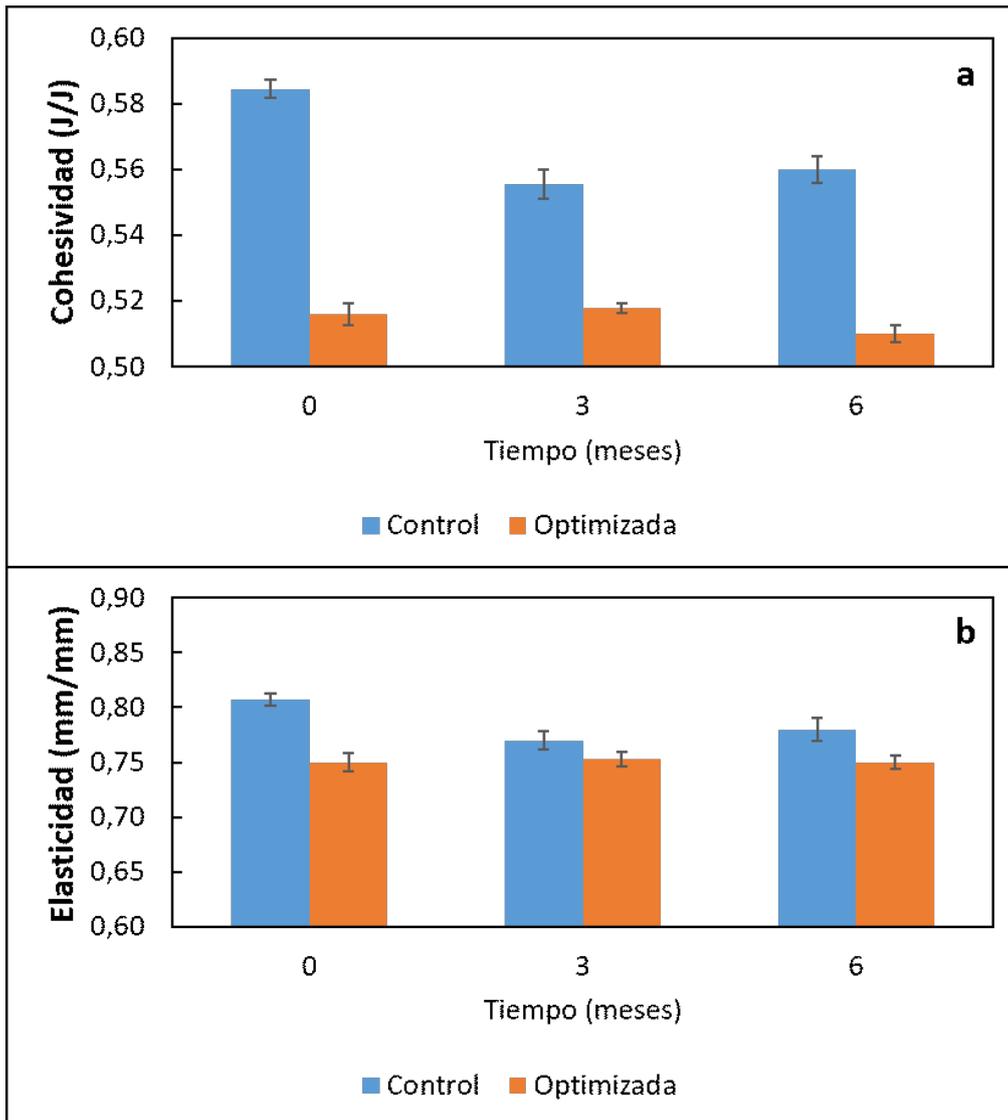


Figura 5.2. Variación de: **a)** cohesividad y **b)** elasticidad, en función del tiempo de almacenamiento congelado de hamburguesas híbrida optimizada y control.

Respecto a la comparación entre formulaciones, el control presentó valores de cohesividad significativamente más altos respecto al producto híbrido optimizado durante todo el almacenamiento. Esto estaría relacionado una estructura menos densa y uniforme en el producto híbrido optimizado, como fue descrito previamente en el **Capítulo 4** de esta Tesis.

Para la elasticidad, a tiempo cero el control presentó valores significativamente más altos respecto al producto híbrido, a los 3 meses ambas formulaciones presentaron valores similares ($P > 0,05$), mientras que al final del almacenamiento la elasticidad del fue levemente superior ($P < 0,05$) a la observada para la hamburguesa híbrida. El descenso en elasticidad presentado por el producto control en función del tiempo

también fue observado en hamburguesas de cerdo por Li *et al.* (2020) quienes lo atribuyeron a la desnaturalización proteica acontecida durante el almacenamiento congelado, que conlleva a que luego, el gel formado durante la cocción resulte con menos estructura, resultados que se traducen también en una menor cohesividad hacia los 3 meses del almacenamiento. En la hamburguesa híbrida optimizada, el agregado de harina, permitiría la formación de una estructura gelificada estable aún con una desnaturalización avanzada de proteínas cárnicas.

5.4.3.2 Color

En las **Figura 5.3** se observan los cambios de los parámetros de color L^* , a^* y b^* para las hamburguesas elaboradas con la formulación híbrida optimizada y el control durante su almacenamiento congelado. Tanto el parámetro tiempo de almacenamiento como la formulación, al igual que las interacciones entre las variables, afectaron significativamente todos los parámetros ($P < 0,05$).

Al analizar los resultados se encontró que la formulación optimizada presentó mayor luminosidad (L^*) (aunque esta diferencia fue menor a 3 y 6 meses) y menor a^* (menos rojo) respecto al control a todos los tiempos evaluados. Para el parámetro b^* , la formulación control presentó un valor mayor (más amarillo) al tiempo inicial pero a partir de los 3 meses se invirtió la tendencia.

Para las hamburguesas híbridas optimizadas se observó una disminución de L^* entre el tiempo 0 y 3 meses, para luego mantenerse constante, mientras que para la formulación control el comportamiento fue inverso, observándose un aumento del parámetro L^* hacia los 3 meses para luego permanecer invariable.

Una mayor luminosidad (L^*) para la formulación optimizada podría atribuirse a la presencia de almidón, principal componente de la harina (**Tabla 3.2**) y a la emulsificación previa del aceite, que imparte al producto una apariencia "lechosa" (Pennisi Forell *et al.*, 2010).

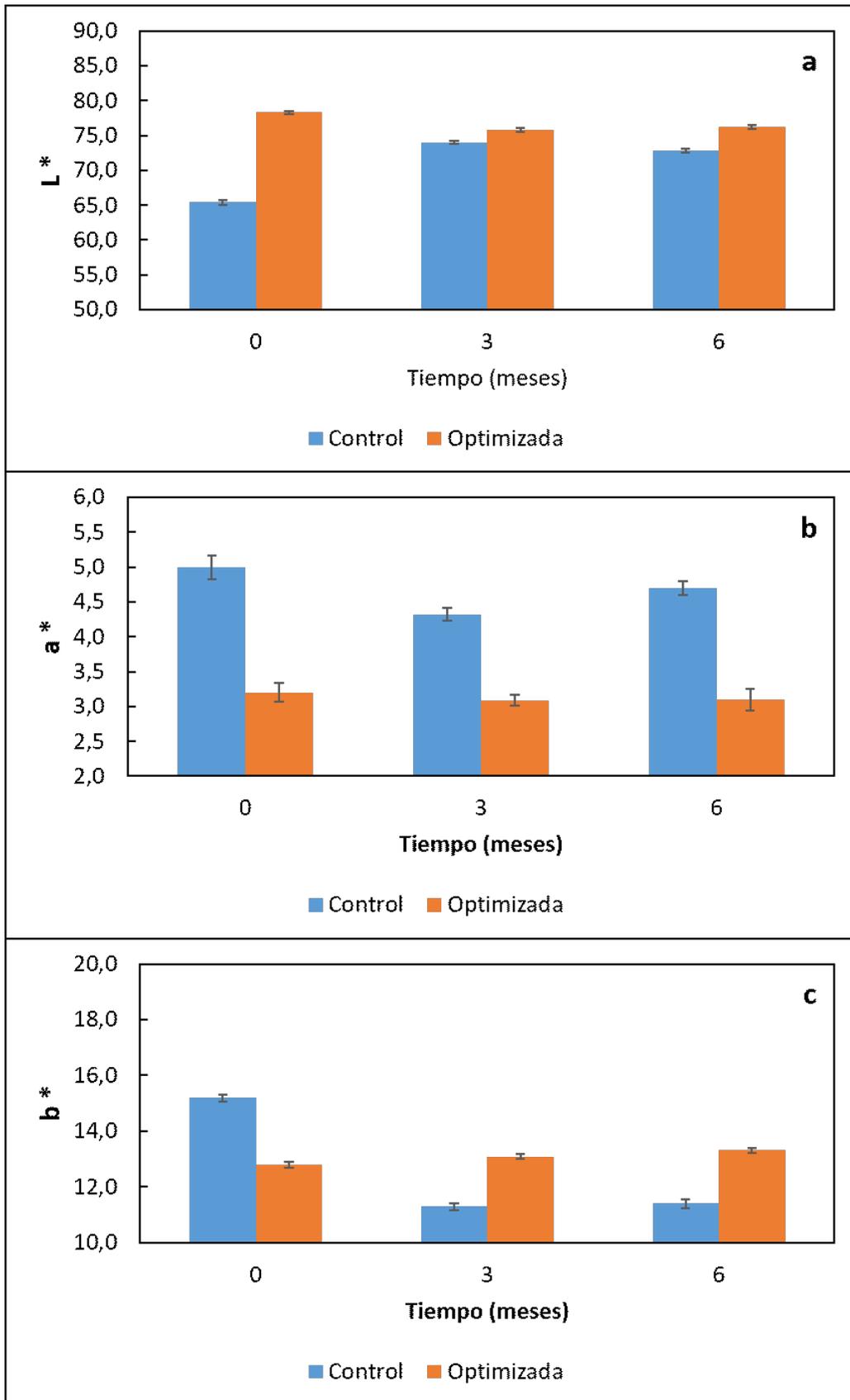


Figura 5.3. Variación de parámetros de color: **a)** L*, **b)** a* y **c)** b* en función del tiempo de almacenamiento congelado de hamburguesas híbrida optimizada y control.

Al analizar el comportamiento de la formulación control para los parámetros a^* y b^* los cambios también se produjeron entre el mes 0 y el 3, con una disminución de ambos parámetros. Para la formulación optimizada, el parámetro a^* permaneció constante en el tiempo, mientras que el parámetro b^* aumentó ligeramente hacia los 3 meses, para luego mantenerse constante hasta el final del almacenamiento.

El mayor valor inicial de a^* (más rojo) para el producto control podría deberse a la mayor proporción de carne. Este resultado fue similar a lo encontrado en otros estudios que indicaron que la incorporación de diferentes harinas en matrices cárnicas producen un efecto de dilución de los pigmentos cárnicos (Özer y Secen, 2018). Durante el almacenamiento congelado, la disminución del parámetro a^* en el producto control podría explicarse por la oxidación de la mioglobina y/o oximioglobina, y a la formación de metamioglobina (Hashemi Gahrue *et al.*, 2017; Özer y Secen, 2018; Utrera *et al.*, 2014), cambios que serían imperceptibles en el producto optimizado, o por cierta protección por parte de la harina de porotos (Sayas-Barberá *et al.*, 2021).

El parámetro b^* , relacionado con los ingredientes y proporción de los mismos en las formulaciones, la matriz formada en cada caso y la oxidación de los pigmentos (Sayas-Barberá *et al.*, 2021), estaría principalmente relacionado con las principales diferencias entre ambos productos por sus diferentes contenidos de hidratos de carbono, fibra y minerales.

Las variaciones en los parámetros de color de la formulación control fue observado también por Georgantelis *et al.* (2007) en hamburguesas de carne vacuna, donde los principales cambios se observaron en los primeros meses de almacenamiento para luego permanecer invariantes. Mientras que Rojas y Brewer (2008), también observaron la misma tendencia para b^* y L^* en hamburguesas de cerdo, mientras que el valor de a^* se mantuvo constante.

En resumen, los parámetros de color para el producto híbrido optimizado mostraron pequeñas variaciones en función del tiempo, a diferencia del producto control, demostrando que el agregado de harina de porotos resultó en un producto con parámetros de color estables durante su almacenamiento.

5.4.3.4 Oxidación lipídica

En la **Figura 5.4** se presentan los resultados obtenidos para la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en función del tiempo de almacenamiento congelado para las hamburguesas híbridas optimizadas y las hamburguesas control.

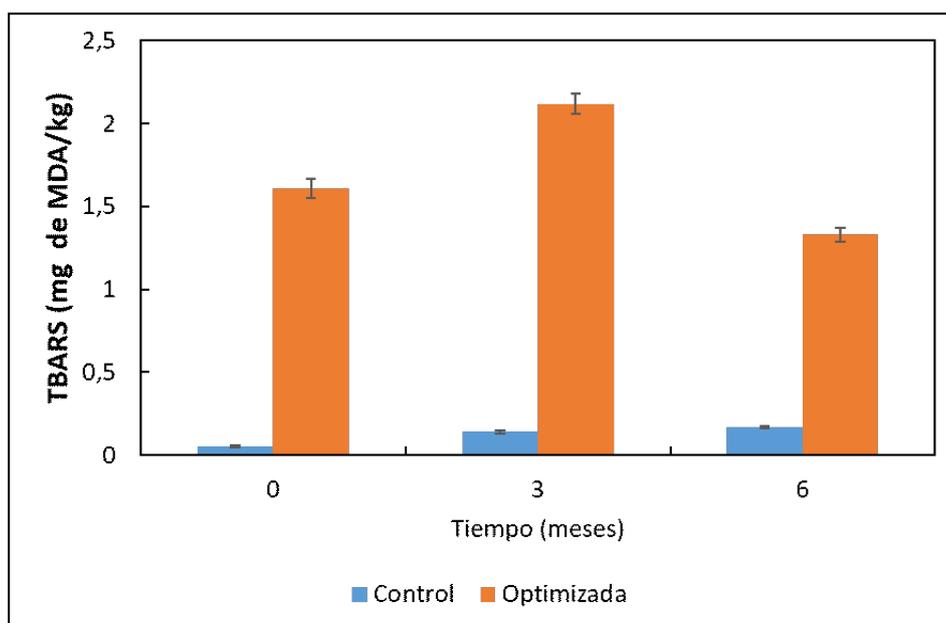


Figura 5.4 Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para hamburguesas híbrida optimizada y control en función del tiempo de almacenamiento congelado.

Es importante tener en cuenta algunos aspectos al interpretar estos resultados. En primer lugar, al realizar la determinación en las hamburguesas híbridas se evidenció la tendencia del almidón presente a formar una pasta viscosa (Papastergiadi *et al.*, 2012) durante la etapa de extracción con TCA, lo que dificultó la filtración de la muestra. Luego, en la reacción con MDA, la coloración resultante fue algo diferente a la esperada (**Figura 5 a, b**). Esto se atribuyó a interferencias de componentes de la harina que formarían un cromógeno amarillo-naranja (**Figura 5c**) principalmente por reacción de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), proteínas solubles, péptidos o aminoácidos libres, como lisina y arginina con el MDA (Diaz *et al.*, 2014), y a algunos pigmentos que pueden presentar absorbancia a 532 nm, lo que puede causar una sobreestimación de la oxidación (Shahidi, 1998). Asimismo, componentes derivados de reacciones de pardeamiento o degradación de azúcares y proteínas a consecuencia de la cocción de

los productos cárnicos pueden interactuar con el MDA formando complejos coloreados que se superponen con el complejo MDA-TBA (Guillen-Sans y Guzman-Chozas, 1998; Du y Bramlage, 1992), sobreestimando aún más el resultado en el caso de la hamburguesa híbrida (**Figura 5a**). Por todo esto, cada formulación de hamburguesa presentó un valor de TBARS basal característico, diferentes entre ellas (**Figura 5.4**).

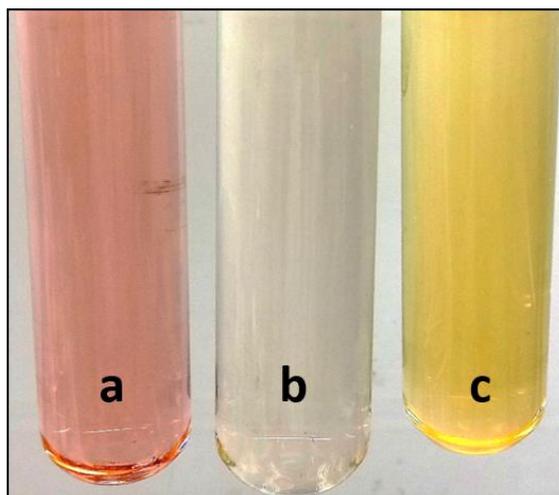


Figura 5.5 Tubos de reacción del método TBARS correspondientes a la determinación realizada en **a)** hamburguesas híbridas optimizadas, **b)** hamburguesas control y **c)** harina de porotos.

Independientemente del valor relativo de TBARS en cada formulación, éstas presentaron diferentes comportamientos en función del tiempo de almacenamiento. Para ambas formulaciones, las TBARS aumentaron entre el inicio y el mes 3, luego se mantuvieron constantes para la formulación control mientras que para la formulación híbrida optimizada disminuyeron hacia los 6 meses. Li *et al.* (2020) observaron un aumento sostenido en las TBARS en hamburguesas de carne aviar, siendo mayor entre el inicio y el mes 1, lo que indicaría que los principales cambios ocurrirían al principio del almacenamiento. Estos resultados serían indicativos del efecto del almacenamiento congelado en la formación de productos secundarios derivados de la oxidación en las hamburguesas. La progresiva destrucción de la integridad de las células musculares podría conducir a la liberación de ciertas enzimas como lipasas, proteasas y nucleasas, que aceleran la reacción oxidativa, aumentando las TBARS

(Maqsood *et al.*, 2015). Sin embargo, de acuerdo con Shahidi (1992), los valores de TBARS en alimentos cárnicos tienden a aumentar durante el período de almacenamiento, llegar a un valor máximo y luego disminuir debido a una reacción adicional de MDA con grupos amino, comportamiento observado en las hamburguesas optimizadas. Como se ha descrito anteriormente, la evolución del número de TBARS está relacionada con la formación de malonaldehído (MDA) como un producto intermedio en la oxidación. En una primera etapa, la tasa de formación del MDA es mayor que la velocidad de desaparición del mismo, y después de este punto ocurre lo contrario. Del mismo modo, Jamora y Rhee (2002) informaron que el MDA formado durante el almacenamiento de los productos cárnicos podría sufrir reacciones intermoleculares (polimerización) o reacciones con otros constituyentes, especialmente aminoácidos/proteínas y consecuentemente la tasa de desaparición del MDA durante el almacenamiento podría exceder la tasa de producción a través de la oxidación lipídica. Otros estudios también han reportado una evolución similar del número de TBARS: Bhattacharya *et al.* (1988) en hamburguesas y Marchetti *et al.* (2017) y Kavuşan *et al.* (2020) en salchichas de carne vacuna, Nardoia *et al.* (2018) en hamburguesas de pollo y Delgado-Pando *et al.* (2011) el salchichas tipo *frankfurters*.

Sin embargo, el aumento observado para la hamburguesa híbrida fue aproximadamente de 0,5 mg MDA/kg, mientras que el correspondiente al control sólo de 0,1 mg de MDA/kg. Otros autores han encontrado también que el agregado de harina de lentejas (Baugret *et al.*, 2016 y 2017), arvejas (Purohit *et al.*, 2016) o garbanzos (Verma *et al.*, 1984) en productos cárnicos incrementaba su oxidación al compararlos con los controles sin agregado. Esto ha sido relacionado con varios factores: una mayor retención de agua en el sistema con harina, lo que permitiría una mayor movilidad de los peróxidos de bajo peso molecular y sustancias radicalarias solubles en agua (Baugret *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2010), un mayor contenido de sustancias prooxidantes en el producto a consecuencia del aporte de minerales por parte de la harina (Purohit *et al.*, 2016), y a las lipooxigenasas de la harina, que podrían promover la hidroperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Chedea y Jisaka, 2013).

No obstante, es importante destacar que los valores observados de TBARS se encontrarían dentro de los límites en donde no se detectarían aromas rancios en el

producto. Según Domínguez *et al.* (2019), valores por debajo de 2 – 2,5 mg/kg muestra no implicarían la rancidez del producto. Campo *et al.* (2006) evaluaron la relación entre los valores de TBARS y la percepción organoléptica en diferentes condiciones experimentales en carne vacuna, y encontró que un valor aproximadamente de 2 mg MDA/kg producto, puede ser considerado como el límite para su aceptabilidad. Si bien la formulación optimizada presentó valores cercanos a ese límite a los 3 meses de almacenamiento, esto estuvo relacionado a las interferencias mencionadas anteriormente, dado que ambas formulaciones de hamburguesas fueron elaboradas con los mismos lotes de carne y en las mismas condiciones, y que la formulación control presentó valores bajos, por lo que ambos productos serían considerados como sensorialmente aceptables.

5.4.3.5 Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de las hamburguesas para las dos metodologías ensayadas (extractiva y QUENCHER) mostraron que el tiempo no fue una variable significativa para ninguna de las formulaciones, tanto para los evaluados mediante la técnica de DPPH como la de ABTS ($P > 0,05$).

En la **Tabla 5.3** se presentan los resultados obtenidos según los diferentes métodos para la capacidad antioxidante de hamburguesas híbrida optimizada y control cocidas.

Tabla 5.3 Capacidad antioxidante de hamburguesas híbrida optimizada y control cocidas evaluada mediante diferentes métodos.

	Método extractivo		Método QUENCHER	
	Control	Optimizada	Control	Optimizada
DPPH (μ moles Trolox/g)	0,29 ^a (0,03)	0,27 ^a (0,02)	41 ^b (2)	51 ^a (4)
ABTS (μ moles Trolox/g)	0,5 ^a (0,1)	0,5 ^a (0,1)	106 ^b (8)	146 ^a (4)

Medias con distinto superíndice en una misma fila para cada tipo de método (extractivo o QUENCHER) presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

Al comparar los resultados para la capacidad antioxidante de los productos obtenidos mediante las metodologías con y sin extracción se observó una gran diferencia entre los valores obtenidos para los dos métodos (**Tabla 5.3**), resultando en valores más altos mediante el método no extractivo o QUENCHER. Estos resultados se atribuyeron principalmente a la evaluación mediante esta metodología de compuestos

que no se solubilizaron con el solvente utilizado en las condiciones ensayadas para el método extractivo (Serpen *et al.*, 2011).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos mediante el método extractivo (**Tabla 5.3**), la variable formulación no resultó significativa ($P > 0,05$), obteniéndose valores medios de 0,28 $\mu\text{moles Trolox/g}$ hamburguesa cocida para la determinación por método de DPPH y 0,45 $\mu\text{moles Trolox/g}$ hamburguesa cocida para la del ABTS. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de ambos productos fue similar, pudiendo atribuirse básicamente a los sistemas de defensa antioxidante de la carne, mencionados anteriormente, y quizá a la acción antioxidante de proteínas y péptidos (Diaz y Decker, 2004; Elias *et al.*, 2007 y 2008) como la carnosina, dipéptido de los aminoácidos beta-alanina e histidina de la carne, que han sido reportado como efectivos antioxidante hidrofílico (Antonini *et al.*, 2002), que en el caso de la formulación híbrida estarían en menor proporción pero se compensarían por los compuestos antioxidantes aportados por la harina de porotos. Las diferencias entre los resultados con ambas metodologías, como se mencionó, están asociadas a los diferentes fundamentos y diferentes compuestos detectados que pueden reaccionar en cada una de ellas.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos mediante el método QUENCHER, se observó que la formulación fue una variable significativa ($P < 0,05$). Por ambas metodologías, DPPH y ABTS, la capacidad antioxidante resultó mayor para el producto híbrido optimizado, con mayores diferencias para el método de ABTS, probablemente debido a que el DPPH^{*} presenta una selectividad mayor que el ABTS^{**†}, tal como se explicó previamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método QUENCHER permitiría evaluar la capacidad antioxidante total de productos cárnicos, considerando tanto compuestos solubles como insolubles, y detectar diferencias atribuidas a sus diferentes ingredientes.

5.5 CONCLUSIONES

Los productos cárnicos híbridos cocidos resultaron de similar aporte energético y de proteínas respecto al control, pero fuentes de fibra dietética, constituyendo un valioso aporte a cualquier dieta que no se alcanzaría mediante los productos cárnicos tradicionales. La cocción redujo al 50 % su contenido de inhibidor de tripsina.

El producto híbrido optimizado fue estable durante su almacenamiento congelado, presentando cambios menores en rendimiento, textura, color y oxidación lipídica, pero demostrando una capacidad antioxidante algo superior al control mediante su evaluación con método QUENCHER.

El desarrollo y la comercialización de productos cárnicos híbridos conteniendo harina de porotos con mejorado aporte de fibra y minerales, manteniendo su calidad pero logrando mejorar su sustentabilidad, podrían ofrecer beneficios económicos a la industria cárnica. Dadas las tendencias actuales, la demanda en la utilización de legumbres seguirá creciendo, seguirán desempeñando un papel clave en la nutrición humana, la salud y en el potencial cada vez más reconocido para mejorar la sostenibilidad ambiental de diferentes productos donde puedan incluirse como ingredientes.

| CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- Mediante el estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de diferentes harinas de legumbres comerciales se pudo establecer que todas presentaron buen potencial como ingredientes al constituir productos de alto valor nutricional, ricos en fibra y proteínas, debido a su composición en macro y microcompuestos destacada y sus adecuadas propiedades funcionales, y que podrían ser incluidas dentro de una matriz alimentaria como ingredientes funcionales.

- A través del desarrollo y caracterización de hamburguesas con reemplazo parcial de carne por harinas de legumbres se pudo concluir que es posible reemplazar parcialmente la carne de cerdo por harina de diferentes legumbres y agua en hamburguesas formuladas con aceite de girasol alto oleico obteniendo productos con elevados rendimientos, y adecuadas características tecnológicas y aceptabilidad sensorial.

- El estudio de variedades de porotos alubia del NOA mejoradas agronómicamente Cerrillos y Paloma presentaron parámetros de tamaño, morfología y color similares, mientras que las harinas obtenidas a partir de los mismos presentaron composiciones similares, con alto contenido de fibra y proteínas, propiedades funcionales similares, almidón con patrón tipo C y similar grado de cristalinidad, observándose en la correspondiente a la variedad Cerrillos mayores contenidos de estigmasterol, γ -tocoferol, y compuestos polifenólicos totales, y mayor capacidad antioxidante.

- A través de la metodología de superficie de respuesta se logró la optimización del contenido de harina de porotos y relación agua/harina en la formulación de hamburguesas de cerdo con aceite de girasol alto oleico pre-emulsificado en base a sus propiedades tecnológicas. La formulación híbrida optimizada (15 g harina de poroto/100g y 1,36 g agua/g harina de porotos) pudo ser validada experimentalmente, obteniendo un producto con adecuadas características físicas y similares a un producto comercial tradicional sin reemplazo de carne.

- El producto cárnico híbrido optimizado cocido resultó de similar aporte energético y de proteínas respecto al control, pero fuente de fibra dietética, constituyendo un valioso aporte a cualquier dieta que no se alcanza mediante los

productos cárnicos tradicionales. La cocción redujo al 50 % su contenido de inhibidor de tripsina. El producto fue estable durante su almacenamiento congelado, presentando cambios menores en rendimiento, textura, color y oxidación lipídica, pero demostrando una capacidad antioxidante algo superior al control mediante su evaluación con método QUENCHER.

Por lo tanto, esta Tesis permitió desarrollar exitosamente una hamburguesa híbrida a través del reemplazo de carne de cerdo por harina de legumbres, logrando un producto con una calidad nutricional distintiva, debido principalmente a su elevado contenido de fibra, empleando como ingrediente una fuente más sustentable como lo son las legumbres, específicamente los porotos del NOA, que mantiene sus parámetros de calidad durante su almacenamiento congelado.

El desarrollo y la comercialización de productos cárnicos híbridos conteniendo harina de porotos con mejorado aporte de fibra y minerales, manteniendo su calidad pero logrando mejorar su sustentabilidad, podrían ofrecer beneficios económicos a la industria cárnica, además de incrementar el valor de la cadena de las legumbres y aumentar el consumo de ellas. Dadas las tendencias actuales, la demanda en la utilización de legumbres seguirá creciendo y seguirán desempeñando un papel clave en la nutrición humana, la salud y en el potencial cada vez más reconocido para mejorar la sostenibilidad ambiental de diferentes productos donde puedan incluirse como ingredientes.

REFERENCIAS

- Abdulwaliyu, I., Arekemase, S.O., Adudu, J.A., Batari, M.L., Egbule, M.N., & Okoduwa, S.I.R. (2019) Investigation of the medicinal significance of phytic acid as an indispensable antinutrient in diseases. *Clinical nutrition experimental*, 28:42–61.
- Abete, I., Romaguera, D., Vieira, A.R., Lopez de Munain, A., & Norat, T. (2014). Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies. *British Journal of Nutrition*, 112 (5):762–75.
- Abu, J.O., Duodu, K.G., & Minnaar, A. (2006). Effect of γ -irradiation on some physicochemical and thermal properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) starch. *Food Chemistry*, 95(3), 386-393.
- Afandi, F.A., Wijaya, C.H., Faridah, D.N., Suyatma, N.E., & Jayanegara, A. (2021). Evaluation of various starchy foods: A systematic review and meta-analysis on chemical properties affecting the glycemic index values based on in vitro and in vivo experiments. *Foods*, 10(2), 364.
- Aguilera Gutiérrez, Y. (2010). Harinas de leguminosas deshidratadas: caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Departamento de Química Agrícola.
- Ahmed, J., Taher, A., Mulla, M.Z., Al-Hazza, A., & Luciano, G. (2016). Effect of sieve particle size on functional, thermal, rheological and pasting properties of Indian and Turkish lentil flour. *Journal of Food Engineering*, 186, 34-41.
- Aiking, H., & de Boer, J. (2018). The next protein transition. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 515-522
- Akwetey, W.Y., & Knipe, C.L. (2012). Sensory attributes and texture profile of beef burgers with gari. *Meat science*, 92(4), 745-748.
- Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambardoust, S.H., & Lorenzo, J.M. (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 100, 292–306.
- Almeida, M.M.B., de Sousa, P.H.M., Arriaga, Â.M.C., do Prado, G.M., de Carvalho Magalhães, C.E., Maia, G.A., & de Lemos, T.L.G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159.
- Al-Shaar, L., Satija, A., Wang, D.D., Rimm, E.B., Smith-Warner, S.A., Stampfer, M.J., Hu, F.B., & Willett, W. C. (2020). Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study. *BMJ* 2020;371:m4141.

- Alves, J. S., Rodrigues, A. S., Moro, K. I. B., Boeira, C. P., Londero, P. M. G., & Rosa, C. S. (2019). Chemical characterization, bioactive compounds, and functional technological properties of flour from two cultivars of landrace common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Food Research Journal*, 26(2), 565-572.
- Amarowicz, R., Troszynska, A., Baryłko-Pikielna, N., & Shahidi, F. (2005). Polyphenolics extracts from legume seeds: correlation between total antioxidant capacity, total phenolic content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11(4), 278-286.
- Ambigaipalan, P., Hoover, R., Donner, E., Liu, Q., Jaiswal, S., Chibbar, R., Nantanga, K.K.M., & Seetharaman, K. (2011). Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. *Food Research International*, 44(9), 2962–2974.
- Andrés, S.C., Pennisi Forell, S.C., Ranalli, N., Zaritzky, N.E., & Califano, A.N. (2012). Healthier functional beef burgers. En: “Agricultural research updates”. Vol 2. Ed. BP Hendriks; Nova Science Publishers Inc, NY, USA, Cap. 7, 265-288.
- Andrés, S.C., Pennisi Forell, S.C., Ranalli, N., Zaritzky, N.E., & Califano, A.N. (2011). Healthier functional beef burgers. *Agricultural Research Updates*, 2, 185-211.
- Andrés, S.C., Zaritzky, N.E., & Califano, A.N. (2006). The effect of whey protein concentrates and hydrocolloids on the texture and colour characteristics of chicken sausages. *International Journal of Food Science and Technology* 41 (8), 954-961.
- Antonini, F.M., Petruzzi, E., Pinzani, P., Orlando, C., Poggesi, M., Serio, M., Pazzagli, M., & Masotti, G. (2002). The meat in the diet of aged subjects and the antioxidant effects of carnosine. *Archives of Gerontology and Geriatrics Supplement*, 8, 7-14.
- AOAC (1984). Official methods of analysis of AOAC international. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC
- Appiah, F., Asibuo, J.Y., & Kumah, P. (2011). Physicochemical and functional properties of bean flours of three cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties in Ghana. *African Journal of Food Science*, 5(2), 100-104.
- Aremu, M., Olaofe, O., & Akintayo, E. (2007). Functional properties of some Nigerian varieties of legume seed flours and flour concentration effect on foaming and gelation properties. *Journal of Food Technology*, 5, 109-115.

- Arts, M.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, *88*(4), 567-570.
- Aslinah, L.N.F., Yusoff, M.M., & Ismail-Fitry, M.R. (2018). Simultaneous use of adzuki beans (*Vigna angularis*) flour as meat extender and fat replacer in reduced-fat beef meatballs (bebola daging). *Journal of food science and technology*, *55*(8), 3241-3248.
- Atwater, W.O. (1902). Experiments on the metabolism of matter and energy in the human body, 1898-1900 (No. 109). US Government Printing Office.
- Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna Saldívar, S.O. (2018). Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review. *Journal of Food Science*, *83*(1), 17-29.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191-203.
- Barać, M.B., Pešić, M.B., Stanojević, S.P., Kostić, A. Ž., & Čabrilo, S.B. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates: A review. *Acta periodica technologica*, (46), 1-18.
- Barraza, F. A. A., León, R. A. Q., & Álvarez, P. X. L. (2015). Kinetics of protein and textural changes in Atlantic salmon under frozen storage. *Food Chemistry*, *182*, 120-127.
- Barrón-Ayala, C.G., Valenzuela-Melendres, M., Camou, J.P., Sebranek, J.G., Dávila-Ramírez, J.L., Cumplido-Barbeitia, G. (2020). Pork frankfurters prepared with hydrolyzed whey: Preliminary product quality aspects and inhibitory activity of the resulting peptides on angiotensin-converting enzyme. *Meat Science*, *166*, 108111.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1767*(9), 1073-1101.
- Bauerfeind, J.C. (1980). Tocopherols in foods. In *Vitamin E: A Comprehensive Treatise* (L.J. Machin, ed.) 91–169, Marcel Dekker, New York.
- Baugreet, S., Kerry, J.P., Allen, P., & Hamill, R.M. (2017). Optimisation of protein-fortified beef patties targeted to the needs of older adults: a mixture design approach. *Meat science*, *134*, 111-118.
- Baugreet, S., Kerry, J.P., Botineştean, C., Allen, P., & Hamill, R.M. (2016). Development of novel fortified beef patties with added functional protein ingredients for the elderly. *Meat Science*, *122*, 40-47.
- Baune, M. C., Jeske, A. L., Profeta, A., Smetana, S., Broucke, K., Van Royen, G., Gibis, M., Weiss, J., & Terjung, N. (2021). Effect of plant protein extrudates on hybrid meatballs—Changes in nutritional composition and sustainability. *Future Foods*, *4*, 100081.

- Bayomy, H., & Alamri, E. (2022). Technological and nutritional properties of instant noodles enriched with chickpea or lentil flour. *Journal of King Saud University-Science*, 101833.
- Bede, D., & Zaixiang, L. (2021). Recent developments in resistant starch as a functional food. *Starch-Stärke*, 73(3-4), 2000139.
- Beggs, K.L., Bowers, J.A., & Brown, D. (1997). Sensory and physical characteristics of reduced-fat turkey frankfurters with modified corn starch and water. *Journal of Food Science*, 62(6), 1240-1244.
- Belibagli, K.B., Speers, R.A., & Paulson, A.T. (2003). Thermophysical properties of silver hake and mackerel surimi at cooking temperatures. *Journal of Food Engineering*, 60:439–448.
- Bello-Perez, L.A., & Paredes-López, O. (2009). Starches of some food crops, changes during processing and their nutraceutical potential. *Food Engineering Reviews*, 1(1), 50-65.
- Belmiro, R.H., Tribst, A.A.L., & Cristianini, M. (2020). Effects of high pressure processing on common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): Cotyledon structure, starch characteristics, and phytates and tannins contents. *Starch-Stärke*, 72(3-4), 1900212
- Bendre, A.D., Ramasamy, S., & Suresh, C.G. (2018). Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *International journal of biological macromolecules*, 113, 933-943.
- Beninger, C.W., & Hosfield, G.L. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 51(27), 7879-7883.
- Benveniste, P. (1986). Sterol biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 275–308.
- Bernal-Lugo, I., Parra, C., Portilla, M., Peña-Valdivia, C.B., & Moreno, E. (1997). Cotyledon thermal behaviour and pectic solubility as related to cooking quality in common beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(2), 141–150.
- Bernardi, S., Del Bo', C., Marino, M., Gargari, G., Cherubini, A., Andrés-Lacueva, C., Kroon, P., Kirkup, B., Porrini, M., Guglielmetti, S., & Riso, P. (2019). Polyphenols and intestinal permeability: rationale and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1816-1829.
- Bertelsen, G., Jakobsen, M., Juncher, D., Moller, J., Kroger-Ohlsen, M., Weber, C., & Skibsted, L.H. (2000). Oxidation, shelf-life and stability of meat and meat products. En *Proceedings of the 46th international congress of meat science and technology* (4.II-L2, pp. 516–524). Buenos Aires, Argentina.
- Bertoft, E., Manelius, R., & Qin, Z. (1993). Studies on the Structure of Pea Starches. Part 2: α -Amylolysis of Granular Wrinkled Pea Starch. *Starch-Stärke*, 45(8), 258-263.

- Bertram, H.C., Karlsson, A.H., Rasmussen, M., Pedersen, O.D., Dønstrup, S., & Andersen, H.J. (2001). Origin of multiexponential T₂ relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3092-3100.
- Bessada, S.M., Barreira, J.C., & Oliveira, M.B.P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 53-68.
- Bhattacharya, M., Hanna, M.A., & Mandigo, R.W. (1988). Lipid oxidation in ground beef patties as affected by time-temperature and product packaging parameters. *Journal of Food Science*, 53(3), 714-717.
- Blanchart, E., Villenave, C., Viallatoux, A., Barthès, B., Girardin, C., Azontonde, A., & Feller, C. (2005). Long-term effect of a legume crop cover (*Mucuna pruriens* var *utilis*) on the communities of soil macrofauna and nematofauna under maize cultivation in southern Benin. *European Journal of Soil Biology* 42(S1): 136-144
- Blazek, J., & Copeland, L. (2008). Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. *Carbohydrate polymers*, 71(3), 380-387.
- Borsuk, Y., Arntfield, S., Lukow, O.M., Swallow, K., & Malcolmson, L. (2012). Incorporation of pulse flours of different particle size in relation to pita bread quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2055-2061.
- Boschin, G., & Arnoldi, A. (2011). Legumes are valuable sources of tocopherols. *Food Chemistry*, 127(3), 1199-1203.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., & Starif, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16(16), 1599-1600.
- Box, G.E.P., & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. Wiley, Nueva York.
- Box, G.E.P., & Wilson, K.B. (1951). Royal Statistical Society. *Series B*, 13(1).
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S.H. (2010)**a**. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010)**b**. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food research international*, 43(2), 414-431.

- Braeckman, L., Ronsse, F., Hidalgo, P.C., & Pieters, J. (2009). Influence of combined IR-grilling and hot air cooking conditions on moisture and fat content, texture and colour attributes of meat patties. *Journal of food engineering*, 93(4), 437-443.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brieva, S. & Costa, A. (2014). *Visión prospectiva de la cadena de carne porcina al 2030*. Buenos Aires: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva
- Brouns, F. (2021). Phytic Acid and Whole Grains for Health Controversy. *Nutrients*, 14(1), 25.
- Brussaard, L., De Ruiter, P.C., & Brown, G.G. (2007). Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, ecosystems & environment*, 121(3), 233-244.
- Buchholz, A.C., & Schoeller, D.A. (2004). Is a calorie a calorie?. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 899S-906S.
- CAA, Código Alimentario Argentino (2021). Capítulo XI Alimentos vegetales. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>. Acceso: mayo 2022
- Cáceres, E., García, M.L., & Selgas, M.D. (2006). Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat Science*, 7, 368-377
- Cai, S., & Singh, B.R. (2004). A distinct utility of the amide III infrared band for secondary structure estimation of aqueous protein solutions using partial least squares methods. *Biochemistry*, 43(9), 2541-2549.
- CAICHA. (2017). Cámara Argentina de la Industria de los Chacinados y Afines. Disponible en: <https://www.caicha.org.ar/>. Acceso: mayo 2022
- Calles, T., Xipsiti, M., & del Castillo, R. (2019). Legacy of the international year of pulses. *Environmental earth sciences*, 78(5), 1-8.
- Câmara, A.K.F.I.; Vidal, V.A.S.; Santos, M.; Bernardinelli, O.D.; Sabadini, E.; Pollonio, M.A.R. (2020) Reducing phosphate in emulsified meat products by adding chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage in poder or gel format: A clean label technological strategy. *Meat Science*, 163, 108085.
- Campbell, B.M., Vermeulen, S.J., Aggarwal, P.K., Corner-Dolloff, C., Girvetz, E., Loboguerrero, A.M., Ramirez-Villegas, J., Rosenstock, T., Sebastián, L., Thornton, P.K., & Wollenberg, E. (2016). Reducing risks to food security from climate change. *Global Food Security*, 11, 34-43.

- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., & Richardson, R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72(2), 303-311.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Oomah, B.D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43(2), 461-482.
- Candoğan, K., Altuntas, E.G., & İğci, N. (2021). Authentication and quality assessment of meat products by fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Food Engineering Reviews*, 13(1), 66-91.
- Cao, Y., Strate, L.L., Keeley, B.R., Tam, I., Wu, K., Giovannucci, E.L., & Chan, A.T. (2018). Meat intake and risk of diverticulitis among men. *Gut*, 67(3), 466-472.
- Carballo, D.E., Caro, I., Andrés, S., Giráldez, F.J., & Mateo, J. (2018). Assessment of the antioxidant effect of astaxanthin in fresh, frozen and cooked lamb patties. *Food Research International*, 111, 342-350.
- Carballo, J., Barreto, G., & Colmenero, F.J. (1996). Starch and egg white influence on properties of bologna sausage as related to fat content. *Journal of Food Science*, 60(4), 673-677.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino acids*, 38(3), 679-690.
- Carr, P.R., Walter, V., Brenner, H., & Hoffmeister, M. (2016). Meat subtypes and their association with colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 138(2):293–302.
- Chaieb, N., González, J.L., López-Mesas, M., Bouslama, M., & Valiente, M. (2011). Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. *Food Research International*, 44(4), 970-977.
- Chan, K.M., & Decker, E.A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 403–426.
- Chan, Y.S., Zhang, Y., & Ng, T.B. (2013). Brown kidney bean Bowman–Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(4), 1306-1314.
- Chandler, S.L., & McSweeney, M.B. (2022). Characterizing the properties of hybrid meat burgers made with pulses and chicken. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 100492.
- Chang, H.C., & Carpenter, J.A. (1997). Optimizing quality of frankfurters containing oat bran and added water. *Journal of Food Science*, 62(1), 194-197.

- Chávez-Murillo, C.E., Veyna-Torres, J.I., Cavazos-Tamez, L.M., de la Rosa-Millán, J., & Serna-Saldívar, S.O. (2018). Physicochemical characteristics, ATR-FTIR molecular interactions and in vitro starch and protein digestion of thermally-treated whole pulse flours. *Food Research International*, 105, 371–383
- Chedea, V.S., & Jisaka, M. (2013). Lipoxygenase and carotenoids: A co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology*, 12(20).
- Chen, P.X., Tang, Y., Marcone, M.F., Pauls, P.K., Zhang, B., Liu, R., & Tsao, R. (2015). Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 185:298-308.
- Chen, Y., She, Y., Kaur, R., Guo, N., Zhang, X., Zhang, R., & Gou, X. (2019). Is plant sterols a good strategy to lower cholesterol?. *Journal of Oleo Science*, ess19116.
- Chen, Y.W., Huang, S.C., Lin-Shiau, S.Y., & Lin, J.K. (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, 26: 1296–1306
- Cheng, S., Wang, X., Li, R., Yang, H., Wang, H., Wang, H., & Tan, M. (2019). Influence of multiple freeze-thaw cycles on quality characteristics of beef semimembranous muscle: With emphasis on water status and distribution by LF-NMR and MRI. *Meat Science*, 147, 44-52.
- Chiavaroli, L., Lee, D., Ahmed, A., Cheung, A., Khan, T. A., Blanco, S., Mirrahimi, A., Jenkins, D.J.A., Livesey, G., Wolever, T.M.S., Rahelić, D., Kahleová, H., Salas-Salvadó, J., Kendall, C.W.C, & Sievenpiper, J. L. (2021). Effect of low glycaemic index or load dietary patterns on glycaemic control and cardiometabolic risk factors in diabetes: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj* 2021, 374.
- Choe, E., & Min, D.B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.
- Choi, J., Kim, D.H., & Lee, J.W. (2012). Radiation preservation of pork patties with additive *undaria* polysaccharides. *Italian Journal of Food Science*, 24(4).
- Choi, Y.S., Choi, J.H., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, H.W., Lee, J.W., Chung, H.J., & Kim, C.J. (2010). Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems. *Meat Science*, 84(1), 212-218.
- Choudhary, N., Khatik, G.L., & Suttee, A. (2021). The possible role of saponin in type-II diabetes-a review. *Current diabetes reviews*, 17(2), 107-121.

- Choung, M.G., Choi, B.R., An, Y.N., Chu, Y.H., & Cho, Y.S. (2003). Anthocyanin profile of Korean Cultivated kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7040–7043
- Chung, H.J., Liu, Q., Donner, E., Hoover, R., Warkentin, T.D., & Vandenberg, B. (2008)a. Composition, molecular structure, properties, and in vitro digestibility of starches from newly released Canadian pulse cultivars. *Cereal Chemistry*, 85(4), 471-479.
- Chung, H.J., Liu, Q., Peter Pauls, K., Fan, M. Z., & Yada, R. (2008)b. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Research International*, 41(9), 869-875.
- Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107-110.
- Clark, M., & Tilman, D. (2017). Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. *Environmental Research Letters*, 12(6), 064016.
- Clark, S., & Duncan, A.M. (2017). The role of pulses in satiety, food intake and body weight management. *Journal of Functional Foods*, 38, 612-623.
- Cocking, C., Walton, J., Kehoe, L., Cashman, K.D., & Flynn, A. (2020). The role of meat in the European diet: current state of knowledge on dietary recommendations, intakes and contribution to energy and nutrient intakes and status. *Nutrition Research Reviews*, 33(2), 181-189.
- Codex Alimentarius (2007) – Norma del Codex para determinadas legumbres. CODEX STAN 171-1989 (Rev. 1-1995) En: Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/a016272e-5539-5309-a1dd-f4f9bba9c13f/>. Acceso: Marzo 2022
- Colonna, P., Buleon, A., Lemaguer, M., & Mercier, C. (1982). Pisum sativum and vicia faba carbohydrates: Part IV—Granular structure of wrinkled pea starch. *Carbohydrate Polymers*, 2(1), 43-59.
- Conde, D. (2016). Año Internacional de las Legumbres, 2016
- Cooke, D., & Gidley, M.J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate research*, 227, 103-112.
- Cornell, J.A. (2002). Experiments with Mixtures. 3a. ed., John Wiley, Nueva York.

- Costa, F., Cappellin, L., Longhi, S., Guerra, W., Magnago, P., Porro, D., Soukoulis, C., Salvi, S., Velasco, R., Biasoli, F., & Gasperi, F. (2011). Assessment of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit texture by a combined acoustic mechanical profiling strategy. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 21–28.
- Cozzolino, D. (2014). An overview of the use of infrared spectroscopy and chemometrics in authenticity and traceability of cereals. *Food Research International*, 60, 262-265.
- Cozzolino, D., Roumeliotis, S., & Eglinton, J. (2014). Evaluation of the use of attenuated total reflectance mid infrared spectroscopy to determine fatty acids in intact seeds of barley (*Hordeum vulgare*). *LWT- Food Science and Technology*, 56(2), 478–483
- Dahl, W.J., & Stewart, M.L. (2015). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: health implications of dietary fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(11), 1861-1870.
- de la Rosa-Millán, J., Orona-Padilla, J.L., Flores-Moreno, V.M., & Serna-Saldívar, S.O. (2018). Physicochemical, functional and ATR-FTIR molecular analysis of protein extracts derived from starchy pulses. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(6), 1414-1424.
- De Mejia, E.G., Valadez-Vega, M.D.C., Reynoso-Camacho, R., & Loarca-Pina, G. (2005). Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 137-145.
- De Simone, M.E., & Failde de Calvo, V. (2002). *El cultivo del poroto en la República Argentina* (No. 635.652). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina).
- de Souza Paglarini, C., de Figueiredo Furtado, G., Honório, A.R., Mokarzel, L., da Silva Vidal, V.A., Ribeiro, A.P.B., Lopes Cunha, R., & Pollonio, M.A.R. (2019). Functional emulsion gels as pork back fat replacers in Bologna sausage. *Food structure*, 20, 100105.
- Decker, E.A., & Xu, Z. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technology*, 52, 54–59.
- Decker, E.A., Livisay, S.A., & Zhou, S. (2000). Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and physical aspects. In E. Decker, C. Faustman, & C.J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (pp. 39–47). New York: John Wiley & Sons Inc.
- Deehan, E.C., & Walter, J. (2016). The fiber gap and the disappearing gut microbiome: implications for human nutrition. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 239-242.
- Delgado-Andrade, C., Olías, R., Jiménez-López, J. C., & Clemente, A. (2016). Aspectos de las legumbres nutricionales y beneficiosos para la salud humana. *arbor*, 192(779), a313-a313.

- Delgado-Pando, G., Allen, P., Kerry, J.P., O'Sullivan, M.G., & Hamill, R.M. (2019). Optimising the acceptability of reduced-salt ham with flavourings using a mixture design. *Meat Science*, 156, 1–10.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science*, 89(1), 65-71.
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219.
- Derringer, G.C. (1994). A balancing act-optimizing a products properties. *Quality progress*, 27(6), 51-58.
- Descalzo, A.M., Rossetti, L., Grigioni, G., Irurueta, M., Sancho, A.M., Carrete, J., & Pensel, N.A. (2007). Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science*, 75(2), 299-307.
- Detzel, A., Krüger, M., Busch, M., Drescher, A., Wriessnegger, C.L., & Köppen, S. (2018). Deliverable 5.3 – Part I: Report on the Life Cycle Assessment Results. Protein 2 Food project report. 2018.
- Diaz, M., & Decker, E.A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8208–8213.
- Díaz, P., Linares, M.B., Egea, M., Auqui, S.M., & Garrido, M.D. (2014). TBARs distillation method: Revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *Meat science*, 98(4), 569-573.
- Do Amaral, D.S., Cardelle-Cobas, A., Do Nascimento, B.M.S., Monteiro, M.J., Madruga, M.S., & Pintado, M.M.E. (2015). Development of a low fat fresh pork sausage based on chitosan with health claims: Impact on the quality, functionality and shelf-life. *Food and Function*, 6, 2768–2778
- Doell, B.H., Ebden, C.J., & Smith, C.A. (1981). Trypsin inhibitor activity of conventional foods which are part of the British diet and some soya products. *Plant foods for human nutrition*, 31(2), 139-150.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W., & Lorenzo, J.M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8, 429.
- Dong, Y., Shi, S., Li, Q., Zhang, L., & Yu, X. (2020). An indirect analytical approach based on ATR-FTIR spectroscopy for determining the FFA content in vegetable oils. *RSC Advances*, 10(40), 24073-24078.

- Dos Santos, J.M., Ignácio, E.O., Bis-Souza, C.V., & da Silva-Barretto, A.C. (2021). Performance of reduced fat-reduced salt fermented sausage with added microcrystalline cellulose, resistant starch and oat fiber using the simplex design. *Meat Science*, *175*, 108433.
- Du, S. K., Jiang, H., Ai, Y., & Jane, J. L. (2014). Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. *Carbohydrate Polymers*, *108*, 200-205.
- Du, S. K., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT-Food Science and Technology*, *55*(1), 308-313.
- Du, S.K., Jiang, H., Ai, Y., & Jane, J.L. (2014). Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. *Carbohydrate Polymers*, *108*, 200-205.
- Du, Z. & Bramlage, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *40* (9), 1566–1570.
- Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2002). Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research and Technology*, *215*, 478–483
- Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology*, *219*, 116–123.
- Dueñas, M., Sun, B.A., Hernández, T., Estrella, I., & Spranger, I. (2003). Proanthocyanidins composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*: 27, 7999–8004
- Duong, S., Strobel, N., Buddhadasa, S., Stockham, K., Auldist, M., Wales, B., Orbell, J., & Cran, M. (2016). Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection. *Food Chemistry*, *211*, 570-576.
- Dwivedi, A.K., Dubey, P., Reddy, S.Y., & Clegg, D.J. (2022). Associations of Glycemic Index and Glycemic Load with Cardiovascular Disease: Updated Evidence from Meta-analysis and Cohort Studies. *Current Cardiology Reports*, 1-21.
- Dzudie, T., Scher, J., & Hardy, J. (2002). Common bean flour as an extender in beef sausages. *Journal of food engineering*, *52*(2), 143-147.
- Edwards, C.H., Warren, F.J., Campbell, G.M., Gaisford, S., Royall, P.G., Butterworth, P.J., & Ellis, P.R. (2015). A study of starch gelatinisation behaviour in hydrothermally processed plant food tissues and implications for in vitro digestibility. *Food and Function*, *6*(12), 3634–3641.

- El Tinay, A.H., Mahgoub, S.O., Mohamed, B.E., & Hamad, M.A. (1989). Proximate composition and mineral and phytate contents of legumes grown in Sudan. *Journal of food Composition and Analysis*, 2(1), 69-78.
- Elgadir, M.A., Bakar, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, R.A., Abbas, K.A., Hashim, D.M., & Karim, R. (2009). Thermal behavior of selected starches in presence of other food ingredients studied by differential scanning calorimetry (DSC)–Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 195-201.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., & Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 1–13.
- Elias, R.J., McClements, D.J., & Decker, E.A. (2007). Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 104, 1402–1409.
- Erbersdobler, H.F., Barth, C.A., & Jah-reis, G. (2017). Legumes in human nutrition. Nutrient content and protein quality of pulses. *Ernahrungs Umschau*, 64(9), 134-139.
- Estévez, M. (2005). Development of novel cooked products using livers, muscles and adipose tissues from Iberian pigs with natural antioxidants. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura, España.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, 89(3), 259–279.
- Estévez, M., Ventanas, S. y Cava R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver paté as affected by fat content. *Journal of Food Chemistry*, 92, 449-457.
- Etemadi, A., Sinha, R., Ward, M.H., Graubard, B.I., Inoue-Choi, M., Dawsey, S., & Abnet, C. (2017). Mortality from different causes associated with meat, heme iron, nitrates, and nitrites in the NIH-AARP diet and health study: population based cohort study. *BMJ* 357:j1957.
- FAO. (1998). Carbohydrates in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation (FAO Food and Nutrition Paper 66) Food and Agriculture Organization: Rome.
- FAO. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO expert consultation. *FAO Food and Nutrition*, N92. Roma
- FAO. (2013)a. Ahorrar para crecer: Guía para los responsables de las políticas de intensificación sostenible de la producción agrícola en pequeña escala. Roma (Italia). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2215s.pdf>. Acceso en: mayo 2022
- FAO. (2016)a. Disponible en: <https://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/es/c/337279/>

- FAO. (2016)b. El Año Internacional de las Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible. COAG/2016/3
- Farooq, Z., & Boye, J. I. (2011). Novel food and industrial applications of pulse flours and fractions. In B. K. Tiwari, A. Gowen & B. McKenna (Eds.), *Pulse Foods* (pp. 283-323). San Diego: Academic Press.
- Farvid, M.S., Cho, E., Chen, W.Y., Eliassen, A.H., & Willett, C.W. (2015). Adolescent meat intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* 136 (8):1909–20.
- Felker, F.C., Kenar, J.A., Byars, J.A., Singh, M., & Liu, S.X. (2018). Comparison of properties of raw pulse flours with those of jet-cooked, drum-dried flours. *LWT- Food Science and Technology*, 96, 648-656.
- Fernández-López, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Haros, C.M., & Pérez-Álvarez, J.A. (2019). Chia (*Salvia hispanica* L.) products as ingredients for reformulating frankfurters: Effects on quality properties and shelf-life. *Meat science*, 156, 139-145.
- Ferreira, C., Ziegler, V., da Silva Lindemann, I., Hoffmann, J.F., Vanier, N.L., & de Oliveira, M. (2018). Quality of black beans as a function of long-term storage and moldy development: Chemical and functional properties of flour and isolated protein. *Food Chemistry*, 246:473-80
- Fiorentini, M., Kinchla, A.J., & Nolden, A.A. (2020). Role of sensory evaluation in consumer acceptance of plant-based meat analogs and meat extenders: A scoping review. *Foods*, 9(9), 1334.
- Folch, J. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *International journal of biological chemistry*, 226, 497-509.
- Fraga, C.G., Croft, K.D., Kennedy, D.O., & Tomás-Barberán, F.A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and function*, 10(2), 514-528.
- Franco, D., Martins, A.J., López-Pedrouso, M., Cerqueira, M.A., Purriños, L., Pastrana, L. M., Vicente, A.A., Zapata, C., & Lorenzo, J.M. (2020). Evaluation of linseed oil oleogels to partially replace pork backfat in fermented sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 218-224.
- Fraser-Reid, B.O., Tatsuta, K. & Thiem, J. (2008). *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*. En: Robyt, J. F. (editor), *Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology*. 2nd ed., Berlin: Springer, 1437–1472.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E., & Szczesniak, A.S. (1963). The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food science*, 28(4), 390-396.

- Gan, R.Y., Deng, Z.Q., Yan, A.X., Shah, N.P., Lui, W.Y., Chan, C.L., & Corke, H. (2016). Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 168–177.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2331.
- García Medina, S. (1993). Nuevos cultivares de poroto. Un avance para mejorar la competitividad de la producción. Primer curso taller de actualización sobre legumbres.
- García, T. (2015). Hacia una mejora de la calidad de los alimentos para una nutrición sustentable. I Congreso Latinoamericano del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (FANUS)
- García-Esteba, R.M., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (1999). Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*, 32 (3), 217-221.
- García-García, E., & Totosaus, A. (2008). Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and κ -carrageenan by a mixture design approach. *Meat science*, 78(4), 406-413.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S.A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat science*, 76(1), 172-181.
- Gerbens-Leenes, P., Mekonnen, M., & Hoekstra, A. (2011) A comparative study on the water footprint of poultry, pork and beef in different countries and production systems. *Water resources and Industry*, 1-2; 25-36.
- Ghribi, A.M., Amira, A.B., Gafsi, I.M., Lahiani, M., Bejar, M., Triki, M., Zouari, A., Attia, H., & Besbes, S. (2018). Toward the enhancement of sensory profile of sausage “Merguez” with chickpea protein concentrate. *Meat science*, 143, 74-80.
- Giller, K.E., & Wilson, K.J. (1991). *Nitrogen fixation in tropical cropping systems* (No. 631.84 G481n). Oxon, GB: CAB International, 1991.
- Gitlin-Domagalska, A., Maciejewska, A., & Dębowski, D. (2020). Bowman-Birk inhibitors: Insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications. *Pharmaceuticals*, 13(12), 421.
- Gnanasambandam, R., & Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68(3), 327–332.

- Gökmen, V., Serpen, A., & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6-7), 278-288.
- Gołabek, K.D., & Regulska-Ilow, B. (2019). Dietary support in insulin resistance: An overview of current scientific reports. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(11), 1577-1585.
- Gomez-Candela, C., Bermejo-Lopez, L.M., & Loria-Kohen, V. (2011). Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*, 26, 323–329.
- Goñi, S.M., & Salvadori, V.O. (2017). Color measurement: comparison of colorimeter vs. computer vision system. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 538-547.
- González, Y., Casas, Y. & Vidal, G. (2020). Huella del agua. Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería Universidad de Concepción. Disponible en: <https://www.crhiam.cl/wp-content/uploads/2020/05/serie-comunicacionalhuella-del-agua.pdf>. Acceso en: mayo 2022.
- Gordon, R., Chapman, J., Power, A., Chandra, S., Roberts, J., & Cozzolino, D. (2019). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics to identify spectral variability in Australian barley samples from different production regions. *Journal of Cereal Science*, 85, 41–47.
- Górnaś, P. (2015). Unique variability of tocopherol composition in various seed oils recovered from by-products of apple industry: Rapid and simple determination of all four homologues (α , β , γ and δ) by RP-HPLC/FLD. *Food chemistry*, 172, 129-134.
- Gouveia, C.S., Freitas, G., Brito, J.H.D., Slaski, J.J., & Carvalho, M.Â. (2014). Nutritional and mineral variability in 52 accessions of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) from Madeira Island. *Agricultural Sciences*, 5(04), 317-329
- Graiver, N.; Pinotti, A.; Califano, A.N.; & Zaritzky, N.E. (2006). Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 910-918.
- Grami, B. (2000) Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists 10th ed. St Paul, MN American Association of Cereal Chemists.
- Grasso, S., & Jaworska, S. (2020). Part meat and part plant: are hybrid meat products fad or future?. *Foods*, 9(12), 1888.
- Grasso, S., Brunton, N.P., Lyng, J.G., Lalor, F., & Monahan, F.J. (2014). Healthy processed meat products—Regulatory, reformulation and consumer challenges. *Trends in food science & technology*, 39(1), 4-17.

- Gray, J.I., Gomma, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, 111-123.
- Grela, E.R., & Günter, K.D. (1995). Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Animal feed science and technology*, 52(3-4), 325-331.
- Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., de Gaetano, G., Violi, F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22 (3), 201-211.
- Guillen-Sans, R.; Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 315-330.
- Guillon, F., & Champ, M.J. (2002). Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 293-306.
- Gujral, H.S., Kaur, A., Singh, N., & Sodhi, N.S. (2002). Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat. *Journal of Food Engineering*, 53(4), 377-385.
- Gujjska, E., Reinhard, W., & Khan, K. (1994). Physicochemical properties of field pea, pinto and navy bean starches. *Journal of Food Science*, 59(3), 634-636.
- Gupta, S., Chhabra, G.S., Liu, C., Bakshi, J.S., & Sathe, S.K. (2018). Functional properties of select dry bean seeds and flours. *Journal of food science*, 83(8), 2052-2061.
- Gutiérrez Pulido, H., De la Vara Salazar, R., González, P.G., Martínez, C.T., & Pérez, M.D.C.T. (2012). Análisis y diseño de experimentos. New York, NY, USA. McGraw-Hill.
- Halajzadeh, J., Milajerdi, A., Reiner, Ž., Amirani, E., Kolahdooz, F., Barekat, M., Mirzaei, H., Mirhashemi, S.M., & Asemi, Z. (2020). Effects of resistant starch on glycemic control, serum lipoproteins and systemic inflammation in patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3172-3184.
- Harguess, J.M., Crespo, N.C., & Hong, M.Y. (2020). Strategies to reduce meat consumption: a systematic literature review of experimental studies. *Appetite*, 144, 104478.
- Haron, M.Y. (2005). Manual teknologi pemrosesan produk daging. Kuala Lumpur: Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian, Malaysia.
- Harrington, E. (1965). The desirability function. *Industrial Quality Control*, 21, 494-498.

- Harwatt, H., Sabaté, J., Eshel, G., Soret, S., & Ripple, W. Substituting beans for beef as a contribution toward US climate change targets. *Climatic Change*, 143:261–270 (2017).
- Hassaballa, A.Z., Mohamed, G.F., Ibrahim, H.M., & Abdelmageed, M.A. (2009). Frozen cooked catfish burger: Effect of different cooking methods and storage on its quality. *Global Veterinaria*, 3, 216-226.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 580-592.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., & Romani, A. (2005). Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3053-3056.
- Hermans, P.H., & Weidinger, A. (1948). Quantitative x-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis. *Journal of Applied Physics*, 19(5), 491–506.
- Hernández, P., Navarro, J.L., & Toldrá, F. (1999). Effect of frozen storage on lipids and lipolytic activities in the longissimus dorsi muscle of the pig. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208(2), 110-115.
- Herrero, A.M., & Ruiz-Capillas, C. (2021). Novel lipid materials based on gelling procedures as fat analogues in the development of healthier meat products. *Current Opinion in Food Science*, 39, 1-6.
- Hidvegi, M., & Lasztity, R. (2002). Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica Polytechnica Series in Chemical Engineering*, 46, 59-64.
- Higgs, J., & Pratt, J. (1998). Meat, poultry and meat products. *Encyclopedia of human nutrition*, 1275.
- Hoekstra, A.Y. & Chapagain, A.K. (2008). Water footprints of nations: water use by people as a function of their consumption pattern. *Sustainable Water Resource Management*, 21(1), 35–48.
- Hoekstra, A.Y. (2003): “Virtual water trade: Proceedings of the International Expert Meeting on Virtual Water Trade”. Value of Water Research Report Series, 12. Netherlands, UNESCO-IHE, Delft. Disponible en: www.waterfootprint.org/Reports/Report12.pdf. Acceso en: mayo 2022.
- Holliday, D.L., Sandlin, C., Schott, A., Malekian, F., & Finley, J.W. (2011). Characteristics of meat or sausage patties using pulses as extenders. *Journal of culinary science & technology*, 9(3), 158-176.
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate polymers*, 45(3), 253-267.

- Hoover, R., & Manuel, H. (1995). A comparative study of the physicochemical properties of starches from two lentil cultivars. *Food Chemistry*, 53(3), 275-284.
- Hoover, R., & Sosulski, F. (1985). Studies on the functional characteristics and digestibility of starches from *Phaseolus vulgaris* biotypes. *Starch-Stärke*, 37(6), 181-191.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H.J., & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food research international*, 43(2), 399-413.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H.J., & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*, 43(2), 399-413.
- Hoover, R., & Ratnayake, W.S. (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry*, 78(4), 489-498.
- Huang H., Yu H., Xu H., Ying Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 303-313.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, L., Xiong, Y.L., Kong, B., Huang, X., & Li, J. (2013). Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour changes in frozen pork dumpling filler. *Meat Science*, 95(2), 295-301.
- Huang, W., Han, Y., Xu, J., Zhu, W., & Li, Z. (2013). Red and processed meat intake and risk of esophageal adenocarcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes & Control* 24 (1):193-201
- IDEP. (2021). Instituto de Desarrollo Productivo. Disponible en: <https://idep.gov.ar/webidep/wp-content/uploads/2021/07/sf-lenteja.pdf>. Acceso en : mayo 2022.
- Ijarotimi, O.S., & Keshinro, O.O. (2021). Formulation and nutritional quality of infant formula produced from germinated popcorn, Bambara groundnut and African locust bean flour. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 1358-1388.
- Imberty, A., & Pérez, S. (1998). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers* 27: 1205-1221.
- Insani, E.M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A.M., Pensel, N.A., & Descalzo, A.M. (2008). Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 444-452.

- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Khan, M.S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food chemistry*, 97(2), 331-335.
- ISO 14040. (2006). ISO 14040:2006 - Environmental management — life cycle assessment — Principles and framework.
- Iwanaga, S., Yamasaki, N., Kimura, M., & Kouzuma, Y. (2005). Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(1), 220-223.
- Jamora, J.J., & Rhee, K.S. (2002). Storage stability of extruded products from blends of meat and nonmeat ingredients: Evaluation methods and antioxidative effects of onion, carrot, and oat ingredients. *Journal of food science*, 67(5), 1654-1659.
- Jane, J.L. (2006). Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience*, 53(3), 205-213.
- Jane, J.L., Chen, Y.Y., Lee, L.F., McPherson, A.E., Wong, K.S., Radosavljevic, M., & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal chemistry*, 76(5), 629-637.
- Jarpa-Parra, M. (2018). Lentil protein: A review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(4), 892-903.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A.C., Newman, H.C., & Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American journal of clinical nutrition*, 34(3), 362-366.
- Jenkins, D.J., Dehghan, M., Mente, A., Bangdiwala, S.I., Rangarajan, S., Srichaikul, K., et al. (2021). Glycemic index, glycemic load, and cardiovascular disease and mortality. *New England Journal of Medicine*, 384(14), 1312-1322.
- Jiang, J., & Xiong, Y.L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat science*, 120, 107-117.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 56–66.
- Jiménez-Colmenero, F., & Delgado Pando, G. (2013). Fibre-enriched meat products. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. En: Fibre-rich and wholegrain food.
- Johnson, I. . (2017). The cancer risk related to meat and meat products. *British medical bulletin*, 121(1).

- Johnson, J.B., Collins, T., Skylas, D., Quail, K., Blanchard, C., & Naiker, M. (2020). Profiling the varietal antioxidative contents and macrochemical composition in Australian faba beans (*Vicia faba* L.). *Legume Science*, 2(2), e28.
- Jourdan, G.A., Noreña, C. P., & Brandelli, A. (2007). Inactivation of trypsin inhibitor activity from Brazilian varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food science and technology international*, 13(3), 195-198.
- Jourdan, G.A., Noreña, C.P., & Brandelli, A. (2007). Inactivation of trypsin inhibitor activity from Brazilian varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food science and technology international*, 13(3), 195-198.
- Jovanovich, G. (1997). Estudio de las interacciones entre almidón y lípidos en harina de trigo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Juárez-López, B.A., Aparicio-Fernández, X. (2012). Polyphenolics concentration and antiradical capacity of common bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) after thermal treatment. En *Food Science and Food Biotechnology Essentials: A Contemporary Perspective*, 1st ed.; Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos, Mexico.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2), 213-217.
- Kabagambe, E.K., Baylin, A., & Ruiz-Narvarez, E. (2005). Decreased consumption of dried mature beans is positively associated with urbanization and non fatal acute myocardial infarction. *Journal of Nutrition*, 135, 1770–1775.
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Cui, S. W., Li, Y., Xu, S., Wu, Y., Wang, J., Bai, Z., & Xie, M. (2017). Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 467-477.
- Kaur, M., & Singh, N. (2005). Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 91, 403e411.
- Kaur, S., Singh, N., Sodhi, N. S., & Rana, J.C. (2009). Diversity in properties of seed and flour of kidney bean germplasm. *Food Chemistry*, 117(2), 282-289.
- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 59–68.

- Kavuşan, H. S., Serdaroglu, M., Nacak, B., & İpek, G. (2020). An approach to manufacture of fresh chicken sausages incorporated with black cumin and flaxseed oil in water gelled emulsion. *Food Science of Animal Resources*, 40(3), 426.
- Keenan, D.F., Resconi, V.C., Kerry, J.P., & Hamill, R.M. (2014). Modelling the influence of inulin as a fat substitute in comminuted meat products on their physico-chemical characteristics and eating quality using a mixture design approach. *Meat Science*, 96(3), 1384-1394.
- Key, T.J., Appleby, P. N., Bradbury, K. E., Sweeting, M., Wood, A., Johansson, I., et al. (2019). Consumption of meat, fish, dairy products, and eggs and risk of ischemic heart disease: A prospective study of 7198 incident cases among 409 885 participants in the Pan-European EPIC Cohort. *Circulation*, 139(25), 2835-2845.
- Khrisanapant, P., Kebede, B., Leong, S.Y., & Oey, I. (2019). A comprehensive characterisation of volatile and fatty acid profiles of legume seeds. *Foods*, 8(12), 651.
- Khuri, A.I. y Cornell, J.A. (1987). Response surfaces: design and analyses. Nueva York: Marcel Dekker.
- Kikunaga, S., Takahashi, M., Huzisige, H. (1985). Accurate and Simple Measurement of Phytic Acid Contents in Cereal Grains. *Plant and Cell Physiology*, 26 (7), 1323-1330.
- Kim, E.H.J., Corrigan, V.K., Wilson, A.J., Waters, I.R., Hedderley, D.I., & Morgenstern, M.P. (2012). Fundamental fracture properties associated with sensory hardness of brittle solid foods. *Journal of Texture Studies*, 43, 49–62.
- Kim, J.H., Seong, P.N., Cho, S.H., Park, B.Y., Hah, K.H., Yu, L.H., Lim, D.G., Hwang, I.J., Lee, J.M., & Ahn, C. N. (2008). Characterization of nutritional value for twenty-one pork muscles. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(1), 138-143.
- Kim, J.Y., Park, S.C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.W., Hahm, K.S., & Park, Y. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Science*, 10: 2860-2872.
- Kim, Y., & Je, Y. (2018). Meat consumption and risk of metabolic syndrome: results from the korean population and a Meta-analysis of observational studies. *Nutrients* 10 (4):390.
- Kinsella, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part1), 242-258.
- Kohn, H.I., & Liversedge, M. (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *Journal of Pharmacology*, 82, 292–300.

- Kotsiou, K., Sacharidis, D.D., Matsakidou, A., Biliaderis, C.G., & Lazaridou, A. (2022). Physicochemical and functional aspects of composite wheat-roasted chickpea flours in relation to dough rheology, bread quality and staling phenomena. *Food Hydrocolloids*, 124, 107322.
- Kumar, A., Kumar, V., Krishnan, V., Hada, A., Marathe, A., Jolly, M., & Sachdev, A. (2019). Seed targeted RNAi-mediated silencing of GmMIPS1 limits phytate accumulation and improves mineral bioavailability in soybean. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
- Kumar, A., Singh, B., Raigond, P., Sahu, C., Mishra, U.N., Sharma, S., & Lal, M. K. (2021). Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition. *Food Research International*, 142, 110193.
- Kumar, B., Sharma, V., & Pathak, K. (2013). Effect of melt sonocrystallization on pharmacotechnical properties of paracetamol, indomethacin and mefenamic acid characterized by dynamic laser scattering and its impact on solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(5), 687-695.
- Ladjal, E.Y., & Mohamed, C. (2015). Some physicochemical and functional properties of pea, chickpea and lentil whole flours. *International Food Research Journal*, 22(3), 987-996
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., & Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 323–329.
- Lajolo, F.M., & Genovese, M.I. (2002). Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6592-6598.
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, R.T., & Nickerson, M.T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food reviews international*, 34(2), 126-147.
- Lam, R.S., & Nickerson, M.T. (2013). Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food chemistry*, 141(2), 975-984.
- Lang, M. (2020). Consumer acceptance of blending plant-based ingredients into traditional meat-based foods: Evidence from the meat-mushroom blend. *Food Quality and Preference*, 79, 103758.
- Larsson, S.C., & Orsini, N. (2014). Red meat and processed meat consumption and all-cause mortality: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 179 (3):282–9.

- Laskowski Jr, M., & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry*, 49(1), 593-626.
- Latta, M., & Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1313-1315.
- Lazou, A., & Krokida, M. (2010). Functional properties of corn and corn–lentil extrudates. *Food research international*, 43(2), 609-616.
- Lebret, B. (2008). Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal*, 2(10), 1548-1558.
- Lee, C.M., & Kim, J.M. (1986). The relationship of composite characteristics to rheological properties of surimi sol and gel. *Food engineering and process applications*, 1, 63-79.
- Lee, S.Y., Yeo, Y.S., Park, S.Y., Lee, S.G., Lee, S.M., Cho, H.S., Chung, N.J., & Oh, S. W. (2017). Compositional analysis of lentil (*Lens culinaris*) cultivars related to colors and their antioxidative activity. *Plant Breeding and Biotechnology*, 5(3), 192-203.
- Ley 26905 (2013). Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-26905-223771/texto>. Acceso: marzo 2022
- Li, F., Zhong, Q., Kong, B., Wang, B., Pan, N., & Xia, X. (2020). Deterioration in quality of quick-frozen pork patties induced by changes in protein structure and lipid and protein oxidation during frozen storage. *Food Research International*, 133, 109142.
- Li, J., Ye, L., Cook, D.R., Wang, X., Liu, J., Kolson, D.L. (2011) Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages. *Journal of Neuroinflammation*, 8: 1
- Li, J., Zhang, C., Xu, X., Wang, J., Yu, H., Lai, R., & Gong, W. (2007) Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *Journal of official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*, 21: 2466–2473.
- Li, J.Y., & Yeh, A.I. (2002). Functions of starch in formation of starch/meat composite during heating. *Journal of Texture Studies*, 33(4), 341-366.
- Li, L., Yuan, T.Z., Setia, R., Raja, R.B., Zhang, B., & Ai, Y. (2019). Characteristics of pea, lentil and faba bean starches isolated from air-classified flours in comparison with commercial starches. *Food Chemistry*, 276, 599-607.
- Liang, H. N., & Tang, C. H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea (*Pisum sativum* (L.)) proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309-319.

- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lin, L.Z., Harnly, J.M., Pastor-Corrales, M.S., Luthria, D.L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1):399-410.
- Lin, T., & Fernández-Fraguas, C. (2020). Effect of thermal and high-pressure processing on the rheological and functional properties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT- Food Science and Technology*, 127, 109325.
- Liu, H., Xiong, Y.L., Jiang, L., & Kong, B. (2008). Fat reduction in emulsion sausage using an enzyme-modified potato starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1632-1637.
- Liu, H., Zhang, M., Ma, Q., Tian, B., Nie, C., Chen, Z., & Li, J. (2020). Health beneficial effects of resistant starch on diabetes and obesity via regulation of gut microbiota: a review. *Food and Function*, 11(7), 5749-5767.
- Liu, K., Seegers, S., Cao, W., Wanasundara, J., Chen, J., da Silva, A. E., et al. (2021). An International Collaborative Study on Trypsin Inhibitor Assay for Legumes, Cereals, and Related Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 98(4), 375-390.
- López-López I., Cofrades, S., Yakan, A., Solas, M.T., Jiménez-Colmenero, F. (2010). Frozen storage characteristics of low-salt and low-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Research International*, 43, 1244–1254
- Los, F.G.B., Zielinski, A.A.F., Wojcickowski, J.P., Nogueira, A., & Demiate, I.M. (2018). Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19, 63-71.
- Lynch, H., Johnston, C., & Wharton, C. (2018). Plant-based diets: Considerations for environmental impact, protein quality, and exercise performance. *Nutrients*, 10(12), 1841.
- Lyon, B.G. & Lyon, C.E. 1990. Texture profile of broiler pectoralis major as influenced by post-mortem deboning time and heat method. *Poultry Science*, 69, 329–340
- Ma, Z., Boye, J.I., Simpson, B.K., Prasher, S.O., Monpetit, D., & Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Research International*, 44(8), 2534-2544.
- Machado, F.P.P., Queiróz, J.H., Oliveira, M.G.A., Piovesan, N.D., Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., & Moreira, M.A. (2008). Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chemistry*, 107(2), 649-655.

- Madhujith, T., Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 11(3), 220-233.
- Magallanes-Cruz, P.A., Flores-Silva, P.C., & Bello-Perez, L.A. (2017). Starch structure influences its digestibility: a review. *Journal of food science*, 82(9), 2016-2023.
- MAGyP. (2021). Producción de legumbres en Argentina. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/magyp_informe_legumbres_julio_2021.pdf. Acceso en: mayo 2022.
- Mancini, S., Preziuso, G., Dal Bosco, A., Roscini, V., Szendrő, Z., Fratini, F., & Paci, G. (2015). Effect of turmeric powder (*Curcuma longa* L.) and ascorbic acid on physical characteristics and oxidative status of fresh and stored rabbit burgers. *Meat Science*, 110, 93-100.
- Maninder, K., Sandhu, K.S., & Singh, N. (2007). Comparative study of the functional, thermal and pasting properties of flours from different field pea (*Pisum sativum* L.) and pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) cultivars. *Food chemistry*, 104(1), 259-267.
- Maphosa, Y., & Jideani, V.A. (2017). The role of legumes in human nutrition. *Functional food-improve health through adequate food*, 1, 13.
- Maqsood, S., Abushelaibi, A., Manheem, K., & Kadim, I.T. (2015). Characterisation of the lipid and protein fraction of fresh camel meat and the associated changes during refrigerated storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 212-220.
- Marchetti, L. (2014). Alternativas tecnológicas para el desarrollo de productos cárnicos emulsionados saludables. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Marchetti, L., Andrés, S.C., & Califano, A.N. (2014). Low-fat meat sausages with fish oil: Optimization of milk proteins and carrageenan contents using response surface methodology. *Meat Science*, 96(3), 1297-1303.
- Marchetti, L., Andrés, S.C., & Califano, A.N. (2017). Physicochemical, microbiological and oxidative changes during refrigerated storage of n-3 PUFA enriched cooked meat sausages with partial NaCl substitution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12920.
- Marchetti, L., Andrés, S.C., Califano, A.N. (2014). Low-fat meat sausages with fish oil: Optimization of milk proteins and carrageenan contents using response surface methodology. *Meat Science*, 96, 1297–1303.

- Marchetti, L., Andrés, S.C., Califano, A.N. (2016). Physicochemical, microbiological, and oxidative changes during refrigerated storage of n-3 pufa enriched cooked meat sausages with partial NaCl substitution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (3).
- Marchetti, L., Argel, N., Andrés, S. C, & Califano, A. N. (2015). Sodium-reduced lean sausages with fish oil optimized by a mixture design approach. *Meat Science*, 104, 67-77.
- Marchetti, L., Muzzio, B., Cerrutti, P., Andrés S.C., Califano A.N. (2017). Bacterial nanocellulose as novel additive in low-lipid low-sodium meat sausages. Effect on quality and stability. *Food Structure*, 14, 52-59.
- Marchini, M., Carini, E., Cataldi, N., Boukid, F., Blandino, M., Ganino, T., Vittadini, E., & Pellegrini, N. (2021). The use of red lentil flour in bakery products: How do particle size and substitution level affect rheological properties of wheat bread dough?. *LWT-Food science and Technology*, 136, 110299.
- Márquez, A.L., Salvatore, G.N., Otero, R.G., Wagner, J.R., & Palazolo, G.G. (2015). Impact of freeze-thaw treatment on the stability of calcium-fortified soy beverages. *LWT-Food science and Technology*, 62(1), 474-481.
- Martínez, M.M., Rosell, C.M., & Gómez, M. (2014). Modification of wheat flour functionality and digestibility through different extrusion conditions. *Journal of Food Engineering*, 143, 74-79.
- Mateo, J., Caro, I., Kasiayan, S., Salvá, B.K., Carhuallanqui, A., & Ramos, D.D. (2021). Potential of Pulse Flours as Partial Meat Replacers in Heat-Treated Emulsion-Type Meat Sausages. *Frontiers in Animal Science*, vol 2.
- Mattioli, A.V., Farinetti, A., & Gelmini, R. (2019). Polyphenols, Mediterranean diet, and colon cancer. *Supportive Care in Cancer*, 27(11), 4035-4036.
- McAuliffe, G.A., Chapman, D.V., & Sage, C.L. (2016). A thematic review of life cycle assessment (LCA) applied to pig production. *Environmental Impact Assessment Review*, 56, 12-22.
- McCarthy, N.A., Murphy, K.M., & Fenelon, M. (2016). *Infant Follow-On Foods*. En: Reference Module in Food Science. Elsevier. Inc.
- Meenu, M., & Xu, B. (2019). A critical review on anti-diabetic and anti-obesity effects of dietary resistant starch. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(18), 3019-3031.
- Mehdad, A., Brumana, G., Souza, A.A., Barbosa, J.A.R.G., Ventura, M.M., & De Freitas, S. (2016). A Bowman–Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell death discovery*, 2(1), 1-10.

- Melendres, M.V., Camou, J.P., Olivera, N.T., Almora, E.Á., Mendoza, D.G., Reyes, L.A., & Ríos, H.G. (2014). Response surface methodology for predicting quality characteristics of beef patties added with flaxseed and tomato paste. *Meat science*, 97(1), 54-61.
- Meng, G.T., & Ma, C.Y. (2001). Thermal properties of Phaseolus angularis (red bean) globulin. *Food Chemistry*, 73(4), 453-460.
- Miles, C., Atterberry, K.A., Brouwer, B. (2015). Performance of northwest Washington heirloom dry bean varieties in organic production. *Agronomy*, 4, 491-505.
- Millar, K.A., Barry-Ryan, C., Burke, R., McCarthy, S., & Gallagher, E. (2019)b. Dough properties and baking characteristics of white bread, as affected by addition of raw, germinated and toasted pea flour. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 56, 102189.
- Millar, K.A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., & Barry-Ryan, C. (2019)a. Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103233.
- Ministerio de Economía, 2021. Salta, informe productivo Provincial. Disponible en https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_productivo_salta_oct2021.pdf. Acceso en: mayo 2022
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Modi, V.K., Mahendrakar, N.S., Rao, D.N., & Sachindra, N.M. (2003). Quality of buffalo meat burger containing legume flours as binders. *Meat science*, 66(1), 143-149.
- Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M.A., & de Mejía, E.G. (2015). Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International*, 69, 38-48.
- Mokrzycki, W.S., & Tatol, M. (2012). Colour difference Δ EA survey Mach. *Machine Graphics and Vision*, 8.
- Momchilova, M., Gradinarska, D., Petrova, T., Zsivanovits, G., Bakalov, I., Penov, N., & Yordanov, D. (2019). Inulin and lentil flour as fat replacers in meat-vegetable pâté-a mixture design approach. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 11(3).
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galvin, K., Kerry, J.P., & Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, 73-86.
- Mortensen, M., Andersen, H.J., Engelsen, S.B., & Bertram, H.C. (2006). Effect of freezing temperature, thawing and cooking rate on water distribution in two pork qualities. *Meat Science*, 72(1), 34-42.

- Motamedi, A., Vahdani, M., Baghaei, H., & Borghei, M.A. (2015). Considering the physicochemical and sensorial properties of momtaze hamburgers containing lentil and chickpea seed flour. *Nutrition and Food Sciences Research*, 2(3), 55-62.
- Moussou, N., Corzo-Martínez, M., Sanz, M.L., Zaidi, F., Montilla, A., & Villamiel, M. (2017). Assessment of Maillard reaction evolution, prebiotic carbohydrates, antioxidant activity and α -amylase inhibition in pulse flours. *Journal of food science and technology*, 54(4), 890-900.
- Munteanu, I.G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Mwove, J.K., Gogo, L.A., Chikamai, B.N., Omwamba, M., & Mahungu, S.M. (2018). Principal component analysis of physicochemical and sensory characteristics of beef rounds extended with gum arabic from *Acacia senegal* var. *kerensis*. *Food Science and Nutrition*, 6(2), 474-482.
- Myers, R.H., & Montgomery, D.C. (1995). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley, Nueva York.
- Nagai, N. (2018). Estudio de harinas de algas marinas comestibles y su incorporación en productos cárnicos. Trabajo final de Grado. Universidad Nacional de La Plata. Argentina
- Nagai, N.F., Argel, N.S., & Andrés, S.C. (2022). Physicochemical characterization and functional properties of flours from North - western Argentina bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Cereal Chemistry*, 1-10.
- Nardoia, M., Ruiz-Capillas, C., Casamassima, D., Herrero, A.M., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Chamorro, S., & Brenes, A. (2018). Effect of polyphenols dietary grape by-products on chicken patties. *European Food Research and Technology*, 244(2), 367-377.
- Neacsu, M., McBey, D., & Johnstone, A.M. (2017). Meat reduction and plant-based food: replacement of meat: nutritional, health, and social aspects. *Sustainable protein sources*, 359-375.
- Norgaard, R., Sikor, T.O., Altieri, M.A., Magdoff, F., Hecht, S., & Liebman, M. (1999). *Agroecología "Bases científicas para una agricultura sustentable"*. Nordan–Comunidad.
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M.D., & Veneklaas, E.J. (2005). Phosphorus benefits of different legume crops to subsequent wheat grown in different soils of Western Australia. *Plant and Soil*, 271(1), 175-187.
- OECD (2022), Meat consumption indicator. Disponible en: [10.1787/fa290fd0-en](https://doi.org/10.1787/fa290fd0-en). Acceso en: mayo 2022.
- OECD. (2020). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029*. OECD Publishing.

- Oehlke, K., Heins, A., Stöckmann, H., Sönnichsen, F., & Schwarz, K. (2011). New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry*, 124(3), 781-787.
- Ojinnaka, M.C., Ebinyasi, C.S., Ihemeje, A., & Okorie, S.U. (2013). Nutritional evaluation of complementary food gruels formulated from blends of soybean flour and ginger modified cocoyam starch. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(10), 1325-1330.
- Oliveira de Lima, V.C, Piuvezam, G., Leal Lima Maciel, B., & Heloneida de Araújo Morais, A. (2019). Trypsin inhibitors: promising candidate satietogenic proteins as complementary treatment for obesity and metabolic disorders?. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 405-419.
- Ombra, M.N., d'Acierno, A., Nazzaro, F., Riccardi, R., Spigno, P., Zaccardelli, M., Pane, C., Maione, M., & Fratianni, F. (2016). Phenolic composition and antioxidant and antiproliferative activities of the extracts of twelve common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) endemic ecotypes of Southern Italy before and after cooking. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016: 1398298.
- Omobuwajo, T.O., Akande, E.A., & Sanni, L.A. (1999). Selected physical, mechanical and aerodynamic properties of African breadfruit (*Treculia africana*) seeds. *Journal of Food Engineering*, 40(4), 241-244.
- OMS. (2020). Healthy diet. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>. Acceso: marzo 2022.
- Osella, C.A., Gordo, N.A., González, R.J., Tosi, E., & Ré, E. (1997). Soybean heat-treated using a fluidized bed. *LWT-Food Science and Technology*, 30(7), 676-680.
- Ovando-Martínez, M., Bello-Pérez, L.A., Whitney, K., Osorio-Díaz, P., & Simsek, S. (2011). Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities. *Carbohydrate polymers*, 85(1), 54-64.
- Ozer C.O., & Secen, S. M. (2018). Effects of quinoa flour on lipid and protein oxidation in raw and cooked beef burger during long term frozen storage. *Food Science and Technology*, Campinas, 38 (1): 221-227.
- Özer, C. O., & Secen, S. M. (2018). Effects of quinoa flour on lipid and protein oxidation in raw and cooked beef burger during long term frozen storage. *Food Science and Technology*, 38, 221-227.
- Özer, C.O., & Çelegen, S. (2020). Evaluation of quality and emulsion stability of a fat-reduced beef burger prepared with an olive oil oleogel-based emulsion. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), e14547.

- Padhi, E.M.T., & Ramdath, D.D. (2017). A review of the relationship between pulse consumption and reduction of cardiovascular disease risk factors. *Journal of Functional Foods*, 38, 635-643.
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A.M., Schulze, M.B., Manson, J.E., Willett, W.C., & Hu, F.B. (2011). Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (4):1088–96.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., & De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), 9589-9594.
- Patel, Y., & Joseph, J. (2020). Sodium intake and heart failure. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9474.
- Pathera, A.K., Riar, C.S., Yadav, S., Sharma, D.P., Yadav, Y.S., & Kumar, M. (2017). Optimization of dietary fiber enriched chicken nuggets for different cooking methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1386-1397.
- Patterson, C.A., Curran, J., & Der, T. (2017). Effect of processing on antinutrient compounds in pulses. *Cereal Chemistry*, 94(1), 2-10.
- Patton, S., & Kutz, G. W. (1951). 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*, 34, 669–674.
- Pelgrom, P.J., Vissers, A.M., Boom, R.M., & Schutyser, M.A. (2013). Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. *Food Research International*, 53(1), 232-239.
- Pennisi Forell, S.C. (2007). Alternativas tecnológicas que permitan la elaboración de productos conformados ricos en ácidos grasos poli-insaturados, a partir de una especie marina grasa sub-explotada (SARACA, *Brevoortia aurea*). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Pennisi Forell, S.C., Ranalli, N., Zaritzky, N.E., Andrés, S.C., & Califano, A.N. (2010). Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. *Meat Science*, 86(2), 364-370.
- Pérez Chabela y Mateo-Oyague. (2006). Frozen Meat: Quality and Shelf Life. In: *Handbook of food science, technology, and engineering* (Vol. 149). CRC press.
- Petracci, M., Bianchi, M., Mudalal, S., & Cavani, C. (2013). Functional ingredients for poultry meat products. *Trends in food science & technology*, 33(1), 27-39.

- Picouet, P.A., Fernández, A., Serra, X., Sunol, J.J., & Arnau, J. (2007). Microwave heating of cooked pork patties as a function of fat content. *Journal of food science*, 72(2), E57-E63.
- Pintado, T.; Herrero, A.M.; Jiménez-Colmenero, F.; Ruiz-Capillas, C. Strategies for incorporation of chia (*Salvia hispanica* L.) in frankfurters as a health-promoting ingredient. *Meat Science*, 114, 75–84.
- Poklukar, K., Čandek-Potokar, M., Batorek Lukač, N., Tomažin, U., & Škrlep, M. (2020). Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: A review. *Animals*, 10(3), 424.
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987–992.
- Popper, R. (2014). Use of just-about-right scales in consumer research. Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling.
- Purohit, A.S., Reed, C., & Mohan, A. (2016). Development and evaluation of quail breakfast sausage. *LWT-food science and technology*, 69, 447-453.
- Qi, R.F., Song, Z.W., & Chi, C.W. (2005). Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37 (5): 283-292.
- Raharjo, S., & Sofos, J. N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*, 35, 145–169.
- Rana, Z.H., Alam, M.K., & Akhtaruzzaman, M. (2019). Nutritional composition, total phenolic content, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of different fractions of selected wild edible plants. *Antioxidants*, 8(7), 203.
- Ranalli, N. (2009). Desarrollo y caracterización de medallones de carne magros enriquecidos con ácidos grasos poli-insaturados y fitoesteroles. Trabajo final de Grado. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Raphaely, T. (Ed.). (2015). Impact of meat consumption on health and environmental sustainability. IGI Global.
- Ratnawati, L., Desnilasari, D., Surahman, D.N., & Kumalasari, R. (2019). Evaluation of physicochemical, functional and pasting properties of soybean, mung bean and red kidney bean flour as ingredient in biscuit. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 251, No. 1, p. 012026). IOP Publishing.
- Rawlings, N.D., Barrett, A. J., & Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 44(D1), D343-D350.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rebello, C.J., Greenway, F.L., & Finley, J.W. (2014). Whole grains and pulses: A comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7029–7049.
- Reddy, N.R., & Pierson, M.D. (1987). Isolation and partial characterization of phytic acid-rich particles from Great Northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 52(1), 109-112.
- Reginatto, J. (2018). Análisis económico-financiero del poroto como alternativa en la rotación de cultivos para la zona norte de la provincia de Córdoba. Tesis Doctoral. Universidad Católica de Córdoba. Argentina.
- Ren, Y., Yuan, T.Z., Chigwedere, C.M., & Ai, Y. (2021). A current review of structure, functional properties, and industrial applications of pulse starches for value-added utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 3061-3092.
- Rengel, A. (2015). Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 397–409.
- Rey, A.I., Hopia, A., Kivikari, R., & Kahkonen, M. (2005). Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubuschamaemorus*), beetroot (*Beta vulgaris* "Vulgaris") or willow herb (*Epilobiumangustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 363–370.
- Rocha, M.G.P., Genovese, M.I., & Lajolo, F.M. (2002). Albumins from the bean *Phaseolus vulgaris*: Effects of heat treatment. *Journal of Food Biochemistry*, 26(3), 191–208.
- Rocha-Guzmán, N.E., Herzog, A., González-Laredo, R.F., Ibarra-Pérez, F.J., Zambrano-Galván, G., & Gallegos-Infante, J.A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food chemistry*, 103(2), 521-527.
- Rodríguez Madrera, R., Campa Negrillo, A., Suárez Valles, B., & Ferreira Fernández, J.J. (2021). Phenolic content and antioxidant activity in seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods*, 10(4), 864.
- Roginsky, V., & Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.

- Rojas, M.C., & Brewer, M.S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of Food quality*, 31(2), 173-188.
- Romero, E.A.R., Martínez, L. A. O., & Castro, J. M. (2016). Efecto del tratamiento con ultrasonido sobre las propiedades funcionales y estructurales de almidón procedente de diversas fuentes, *Biotechnia*, 18(2), 16-23.
- Röös, E., Bajželj, B., Smith, P., Patel, M., Little, D., & Garnett, T. (2017). Protein futures for Western Europe: potential land use and climate impacts in 2050. *Regional Environmental Change*, 17(2), 367-377.
- Rose, T.J., Hardiputra, B., & Rengel, Z. (2010). Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant and Soil*, 326(1), 159-170.
- Rothman, L., & Parker, M. (2009). Just-about-right (JAR) scales. *West Conshohocken, PA: ASTM International*.
- Rovalino-Córdova, A.M., Fogliano, V., & Capuano, E. (2019). The effect of cell wall encapsulation on macronutrients digestion: A case study in kidney beans. *Food Chemistry*, 286, 557–566.
- Rui, X., Boye, J. I., Ribereau, S., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Research International*, 44(8): 2497-2504.
- Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., & Martino, G. (2008). Application of a radical scavenging activity test to measure the total antioxidant activity of poultry meat. *Meat Science*, 80(4), 1081-1085.
- Saerens, W., Smetana, S., Van Campenhout, L., Lammers, V., & Heinz, V. (2021). Life cycle assessment of burger patties produced with extruded meat substitutes. *Journal of Cleaner Production*, 306, 127177.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Pérez, C.R.C., Solas, M.T., & Jiménez-Colmenero, F. (2013). Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n- 3 PUFA enriched frankfurters. *Meat Science*, 93(3), 757-766.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2015). Konjac-based oil bulking system for development of improved-lipid pork patties: technological, microbiological and sensory assessment. *Meat science*, 101, 95-102.
- Sampels, S. (2013). Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. I. Muzzalupo (Ed.), *Food industry* (pp. 114– 144). Croatia: InTech Publishing.

- Sánchez-Arteaga, H.M., Urías-Silvas, J.E., Espinosa-Andrews, H., & García-Márquez, E. (2015). Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 385-391.
- Sandberg, A.S., & Svanberg, U. (1991). Phytate hydrolysis by phytase in cereals; effects on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*, 56(5), 1330-1333.
- Sandhu, K.S., & Lim, S.T. (2008). Digestibility of legume starches as influenced by their physical and structural properties. *Carbohydrate polymers*, 71(2), 245-252.
- Sanhueza Catalán, J., Durán Agüero, S., & Torres García, J. (2015). Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 32(3), 1362-1375.
- Sanjeewa, W.T., Wanasundara, J.P., Pietrasik, Z., & Shand, P.J. (2010). Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours and application in low-fat pork bologna as a model system. *Food Research International*, 43(2), 617-626.
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Véles-Medina, J.J., & Salazar, R. (2018). Physicochemical properties of nixtamalized black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food Chemistry*, 240, 456-462.
- Sarıçoban, C., Yılmaz, M.T., & Karakaya, M. (2009). Response surface methodology study on the optimisation of effects of fat, wheat bran and salt on chemical, textural and sensory properties of patties. *Meat Science*, 83(4), 610-619.
- Sathe, S.K., Deshpande S.S., & Salunkhe, D.K. (1982). Functional Properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein Concentrates. *Journal of Food Science*, 47, 491-497.
- Sathe, S.K., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., & Rackis, J.J. (1984). Dry beans of phaseolus. A review. Part 1. Chemical composition: Proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 20(1), 1-46.
- Savage, G.P., & Morrison S.C. (2003). Trypsin inhibitor. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Elsevier Science B.V.
- Sayas-Barberá, E., Valero-Asencio, M.M., Navarro Rodríguez-Vera, C., Fernández-López, J., Haros, C.M., Pérez-Álvarez, J.Á., & Viuda-Martos, M. (2021). Effect of Different Black Quinoa Fractions (Seed, Flour and Wet-Milling Coproducts) upon Quality of Meat Patties during Freezing Storage. *Foods*, 10(12), 3080.
- Schwob, S., Le Bret, B., & Louveau, I. (2020). Genetics and adiposity in pigs: state of the art and new challenges for meat product quality. *INRAE Productions Animales*, 33, 17-30.

- Serdaroğlu, M., Yıldız-Turp, G., & Abrodímov, K. (2005). Quality of low-fat meatballs containing legume flours as extenders. *Meat Science*, 70(1), 99-105.
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., & Fogliano, V. (2008). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science*, 48, 816e820.
- Shahidi, F. (1992). Current and novel methods for stability testing of canola oil. *Inform*, 3, 543.
- Shahidi, F. (1998). Assessment of lipid oxidation and off-flavour development in meat, meat products and seafoods. In *Flavor of Meat, Meat Products, and Seafoods*; Shahidi, F., Ed.; Blackie Academic & Professional: London, UK.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*: CRC press.
- Shahidi, F., Chavan, U.D., Naczk, M., & Amarowicz, R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 926–933.
- Shariati-levari, S., Ryland, D., Edel, A., Nicholson, T., Suh, M., & Aliani, M. (2016). Sensory and physicochemical studies of thermally micronized chickpea (*Cicer arietinum*) and green lentil (*Lens culinaris*) flours as binders in low-fat beef burgers. *Journal of Food Science*, 81(5), S1230-S1242.
- Sharma, P., & Gujral, H.S. (2010). Milling behavior of hulled barley and its thermal and pasting properties. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 329-334.
- Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., & Yu, L. (2019). Pulse proteins: Secondary structure, functionality and applications. *Journal of food science and technology*, 56(6), 2787-2798.
- Shoaib, A., Sahar, A., Sameen, A., Saleem, A., & Tahir, A.T. (2018). Use of pea and rice protein isolates as source of meat extenders in the development of chicken nuggets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), e13763.
- Shorky, A. M. (2016). The usage of quinoa flour as a potential ingredient in production of meat burger with functional properties. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 6, 4, 1128-1137.
- Sieveking, A., Weber, H., Riewerts, B., & Böhme, M. (2017). Towards a Sustainable Use of Phosphorus. *GAIA: Ecological Perspectives for Science & Society*, 26(1).
- Sikorski, Z.E. (2001). Functional properties of proteins in food systems. *Chemical and functional properties of food proteins*, 113-135.
- Silva, E. O., & Bracarense, A.P.F. (2016). Phytic acid: from antinutritional to multiple protection factor of organic systems. *Journal of food science*, 81(6), R1357-R1362.

- Silva, Y.P., Bernardi, A., & Frozza, R.L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in endocrinology*, *11*, 25.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. *Food Chemistry*, *206*, 1-11.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. In *Food Research International*, *101*, 1-16.
- Singh, N., Nakaura, Y., Inouchi, N., & Nishinari, K. (2008). Structure and viscoelastic properties of starches separated from different legumes. *Starch-Stärke*, *60*(7), 349-357.
- Singh, U. (2001). Functional properties of grain legume flours. *Journal of Food Science and Technology*, *38*(3), 191–199.
- Singh, Y & Chandra, S. (2014). Evaluation of physical properties of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Science Research Journal*, *5*(2), 125-129.
- Sirivongpaisal, P. (2008). Structure and functional properties of starch and flour from bambarra groundnut. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, *30*.
- Sironi, E., Sessa, F., & Duranti, M. (2005). A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. *European Food Research and Technology*, *221*(1), 145-150.
- Słupski, J. (2010). Effect of cooking and sterilisation on the composition of amino acids in immature seeds of flageolet bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Food Chemistry*, *121*(4), 1171-1176.
- Smith, C., Van Megen, W., Twaalfhoven, L., & Hitchcock, C. (1980). The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *31*(4), 341-350.
- Snelson, M., Jong, J., Manolas, D., Kok, S., Louise, A., Stern, R., & Kellow, N. J. (2019). Metabolic effects of resistant starch type 2: A systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, *11*(8), 1833.
- Soliman, G.A. (2019). Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Nutrients*, *11*(5), 1155.
- Soria-Hernández, C., Serna-Saldívar, S., & Chuck-Hernández, C. (2015). Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, *53*(3), 269-277.
- Soyer, A., Özalp, B., Dalmış, Ü., & Bilgin, V. (2010). Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chemistry*, *120*(4), 1025–1030.

- Spencer, M., Cienfuegos, C., & Guinard, J.X. (2018). The Flexitarian Flip™ in university dining venues: Student and adult consumer acceptance of mixed dishes in which animal protein has been partially replaced with plant protein. *Food Quality and Preference*, 68, 50-63.
- Sprent, J.I. (2009). *Legume Nodulation: A Global Perspective*. Chichester: Wiley Blackwell.
- Sprent, J.I., y Sprent, P. (1990). *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects*. London: Chapman and Hall.
- Sreerama, Y.N., Sashikala, V.B., Pratape, V. ., & Singh, V. (2012). Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, 131 (2): 462–468.
- Sreerama, Y.N., Sashikala, V.B., Pratape, V.M. (2010) Variability in the distribution of phenolic compounds in milled fractions of chickpea and horse gram: evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(14):8322-30.
- Su, H.S., Lu, W., & Chang, K.C. (1997). Microstructure and physicochemical characteristics of starches in six bean varieties and their bean paste products. *LWT-Food Science and Technology*, 31, 265–273
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Clare, B.W. (2002). Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22(4): 329–372.
- Szczesniak, A.S. (1963). Classification of Textural Characteristics. *Journal of Food Science*, 28(4), 385-389.
- Tahmasebi, M., Labbafi, M., Emam-Djomeh, Z., & Yarmand, M.S. (2016). Manufacturing the novel sausages with reduced quantity of meat and fat: The product development, formulation optimization, emulsion stability and textural characterization. *LWT- Food Science and Technology*, 68, 76-84.
- Tamsen, M., Shekarchizadeh, H., & Soltanzadeh, N. (2018). Evaluation of wheat flour substitution with amaranth flour on chicken nugget properties. *LWT- Food Science and Technology*, 91, 580-587.
- Tang, C.H. (2008). Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *LWT- Food Science and Technology*, 41(8), 1380–1388
- Tatipamula, V.B., & Kukavica, B. (2021). Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochemistry and Function*, 39(8), 926-944.
- Tayade, R., Kulkarni, K.P., Jo, H., Song, J.T., & Lee, J.D. (2019). Insight into the prospects for the improvement of seed starch in legume—a review. *Frontiers in plant science*, 1213.

- Teixeira, A., & Rodrigues, S. (2021). Consumer perceptions towards healthier meat products. *Current Opinion in Food Science*, 38, 147-154.
- Tester, R., Karkalas, J., Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60: 186-195.
- Thangavelu, K.P., Tiwari, B., Kerry, J.P., McDonnell, C.K., & Álvarez, C. (2022). Phosphate replacing potential of apple pomace and coffee silver skin in Irish breakfast sausage using a mixture design approach. *Meat Science*, 185, 108722.
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518.
- Toews, R., & Wang, N. (2013). Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Research International*, 52(2), 445-451.
- Totosaus, A. (2009). The use of potato starch in meat products. *Food*, 3(1), 102-108.
- Trautwein, E.A., Koppenol, W.P., De Jong, A., Hiemstra, H., Vermeer, M.A., Noakes, M., & Luscombe-Marsh, N.D. (2018). Plant sterols lower LDL-cholesterol and triglycerides in dyslipidemic individuals with or at risk of developing type 2 diabetes; a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition & Diabetes*, 8(1), 1-13.
- Trieu, H.H.; & Qutubuddin, S. (1994). Polyvinyl alcohol hydrogels I. Microscopic structure by freeze-etching and critical point drying techniques. *Colloid and Polymer Science*, 272(3), 301-309.
- Triñanes, P.G. (2010). Avances en aglomeración y compactación de partículas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Tromp, C.T., Raghavan, G.S.V., & Alikhani, Z. (1995). Nutritive quality of whole soybeans heat-treated in a continuous flow processor. *Journal of agricultural engineering research*, 61(1), 49-55.
- Troszynska, A., & Ciska, E. (2002). Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(1), 15-22.
- Turfani, V., Narducci, V., Durazzo, A., Galli, V., & Carcea, M. (2017). Technological, nutritional and functional properties of wheat bread enriched with lentil or carob flours. *LWT-Food science and Technology*, 78, 361-366.
- USDA. (2019). FoodData Central. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/>. Acceso: mayo 2022
- USDA. (2013). Fresh Pork from Farm to Table. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/safe-food-handling-and-preparation/meat/fresh-pork-farm-table>. Acceso en: mayo 2022

- Utrera, M., Morcuende, D., & Estévez, M. (2014). Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat science*, 96(3), 1250-1257.
- Utrera, M., Morcuende, D., Ganhão, R., & Estévez, M. (2015). Role of phenolics extracting from *Rosa canina* L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 854-864.
- Vaintraub, I.A., & Lapteva, N.A. (1988). Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. *Analytical biochemistry*, 175(1), 227-230.
- Vaz Patto, M.C., Amarowicz, R., Aryee, A.N.A., Boye, J.I., Chung, H.J., Martín-Cabrejas, M.A., & Domoney, C. (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 105–143
- Vedantham, G., Sparks, H.G., Sane, S.U., Tzannis, S., & Przybycien, T.M. (2000). A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H₂O solutions. *Analytical Biochemistry*, 285(1), 33-49.
- Velioğlu, H.M., Velioğlu, S.D., Boyacı, İ.H., Yılmaz, İ., & Kurultay, Ş. (2010). Investigating the effects of ingredient levels on physical quality properties of cooked hamburger patties using response surface methodology and image processing technology. *Meat Science*, 84(3), 477-483.
- Verain, M.C., Dagevos, H., & Antonides, G. (2015). Sustainable food consumption. Product choice or curtailment?. *Appetite*, 91, 375-384.
- Verma, A.K.; Rajkumar, V.; & Kumar, S. (2019). Effect of amaranth and quinoa seed flour on rheological and physicochemical properties of goat meat nuggets. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 5027-5035.
- Verma, M.M., Ledward, D.A., & Lawrie, R.A. (1984). Utilization of chickpea flour in sausages. *Meat Science*, 11(2), 109-121.
- Vestergaard, C.S., & Parolari, G. (1999). Lipid and cholesterol oxidation products in dry-cured ham. *Meat science*, 52(4), 397-401.
- Vilchis Velazquez, R. (2019). Evaluación de las propiedades físicas y viscoelásticas de granos de trigo (*Triticum aestivum* L.), centeno (*Secale cereale* L.) y triticale (*X Triticosecale Wittmack*). Tesis de grado. Universidad Autónoma de México. México
- Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C., & Torres, J. (2018). Almidón resistente: Características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Revista chilena de nutrición*, 45(3), 271-278.

- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., et al. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58, 1–45.
- Vizgarra, O.N., Espeche, C.M., & Ploper, L.D. (2016). Manual Técnico del Cultivo del Poroto para el Noroeste Argentino. Tucumán: Estación Experimental Obispo Colombres, 2016
- Vizgarra, O.N., Espeche, C.M., Mendez, D.E., Tarulli, L., Araya, M.F., & Ploper, L.D. (2019). TUC 450: primera variedad de garbanzo tipo Desi para la región del Noroeste Argentino. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 96(2), 31-36.
- Wagner, J.R., & Añón, M.C. (1985). Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 20, 735–744
- Waigh, T.A., Gidley, M.J., Komanshek, B.U., & Donald, A.M. (2000). The phase transformations in starch during gelatinization: a liquid crystalline approach. *Carbohydrate Research*, 328(2), 165-176.
- Wang, H., & Ratnayake, W.S. (2014). Physicochemical and thermal properties of *Phaseolus vulgaris* L. var. Great Northern Bean Starch. *Journal of food science*, 79(3), C295-C300.
- Wang, M., Wu, Y., Liu, Y., & Ouyang, J. (2020). Effect of ultrasonic and microwave dual-treatment on the physicochemical properties of chestnut starch. *Polymers*, 12(8), 1718.
- Wang, N., & Daun, J. K. (2006). Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 95(3), 493-502.
- Wang, R., Zhou, W., & Isabelle, M. (2007). Comparison study of the effect of green tea extract (GTE) on the quality of bread by instrumental analysis and sensory evaluation. *Food Research International*, 40, 470–479.
- Wang, Y., Liang, H., Xu, R., Lu, B., Song, X., & Liu, B. (2020). Effects of temperature fluctuations on the meat quality and muscle microstructure of frozen beef. *International Journal of Refrigeration*, 116, 1-8.
- Wani, I.A., Sogi, D.S., Hamdani, A.M., Gani, A., Bhat, N.A., & Shah, A. (2016). Isolation, composition, and physicochemical properties of starch from legumes: A review. *Starch-Stärke*, 68(9-10), 834-845.
- Wani, I.A., Sogi, D.S., Wani, A.A., & Gill, B.S. (2017). Physical and cooking characteristics of some Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 7-15.
- Wani, I.A., Sogi, D.S., Wani, A.A., Gill, B.S., & Shivhare, U.S. (2010). Physico-chemical properties of starches from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *International journal of food science and technology*, 45(10), 2176-2185.

- Wani, S.A., & Kumar, P. (2014). Comparative study of chickpea and green pea flour based on chemical composition, functional and pasting properties. *Journal of Food Research and Technology*, 2(3), 124-129.
- Warren, F.J., Gidley, M.J., & Flanagan, B. M. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure—a joint FTIR–ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate polymers*, 139, 35-42.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat science*, 86(1), 196-213.
- Welch, R.M., House, W.A., Beebe, S., & Cheng, Z. (2000). Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3576–3580.
- Wiesinger, J.A., Cichy, K.A., Hooper, S.D., Hart, J.J., & Glahn, R.P. (2020). Processing white or yellow dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) into a heat treated flour enhances the iron bioavailability of bean-based pastas. *Journal of Functional Foods*, 71, 104018.
- Willet, W., Rockström, J., & Loken, B. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet commission on health diets from sustainable food systems. *Lancet*, 393(10170):447–92.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Gute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, F.M., Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343–358.
- Woolley, L. D. (2014). *Evaluation of objective beef juiciness measurements techniques and their relationship to subjective taste panel juiciness ratings* (Doctoral dissertation).
- Wu, M.C.; Lanier, T.C.; & Hamann, D.D. (1985). Thermal transitions of admixed starch/fish protein systems during heating. *Journal of Food Science*, 50:20–25.
- Wu, P., Tian, J.C., Walker, C.E., Wang, F.C. (2009). Determination of phytic acid in cereals – a brief review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44 (9), 1671-1676.
- Xiong, Y. L. (2005). Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. *Food Research International*, 38(3), 281-287.
- Xu, B.J., & Chang, S.K.C. (2007). A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), S159-S166.

- Xu, B.J., Yuan, S.H., & Chang, S.K.C. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*, 72(2), S167-S177.
- Yamaji, N., Takemoto, Y., Miyaji, T., Mitani-Ueno, N., Yoshida, K. T., & Ma, J. F. (2017). Reducing phosphorus accumulation in rice grains with an impaired transporter in the node. *Nature*, 541(7635), 92-95.
- Yang, C., Pan, L., Sun, C., Xi, Y., Wang, L., & Li, D. (2016). Red meat consumption and the risk of stroke: a dose-response Meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 25 (5):1177–86.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., & Ishii, K. (1972). Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(5), 719-727.
- Yoshida, H., Nozaki, K., Hanashiro, I., Yagi, F., Ito, H., Honma, M., & Takeda, Y. (2003). Structure and physicochemical properties of starches from kidney bean seeds at immature, premature and mature stages of development. *Carbohydrate Research*, 338(5), 463–469
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., & Mizushima, Y. (2005). Characterization in the fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of food lipids*, 12(2), 169-180.
- Zervas, G., & Tsiplakou, E. (2016). Life cycle assessment of animal origin products. *Advances in Animal Biosciences*, 7(2), 191-195.
- Zhang, M., Li, F., Diao, X., Kong, B., & Xia, X. (2017). Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles. *Meat Science*, 133, 10-18.
- Zhong, V.W., Van Horn, L., Greenland, P., Carnethon, M.R., Ning, H., Wilkins, J. T., Lloyd-Jones, D.M, & Allen, N.B. (2020). Associations of processed meat, unprocessed red meat, poultry, or fish intake with incident cardiovascular disease and all-cause mortality. *JAMA internal medicine*, 180(4), 503-512.
- Zhou, Y., Hoover, R., & Liu, Q. (2004). Relationship between α -amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. *Carbohydrate polymers*, 57(3), 299-317.

- Zhu, Y., Guo, L., & Yang, Q. (2020). Partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* on nitrate, color, biogenic amines and gel properties of Chinese fermented sausages. *Food Research International*, 137, 109351.
- Zhuang, X., Han, M., Kang, Z.L., Wang, K., Bai, Y., Xu, X.L., & Zhou, G.H. (2016). Effects of the sugarcane dietary fiber and pre-emulsified sesame oil on low-fat meat batter physicochemical property, texture, and microstructure. *Meat science*, 113, 107-115.
- Zou, M.L., Moughan, P.J., Awati, A., & Livesey, G. (2007). Accuracy of the Atwater factors and related food energy conversion factors with low-fat, high-fiber diets when energy intake is reduced spontaneously. *The American journal of clinical nutrition*, 86(6), 1649-1656.