



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

**DESARROLLO DE PANIFICADOS LIBRES DE GLUTEN  
ADICIONADOS CON FIBRA: APLICACIÓN DE UN  
SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA DE JUGO DE MANZANA**

---

***Tesista: Ing. Agro Ind. Andrés Felipe Rocha Parra***

***Directora: Dra. Cristina Ferrero***

***Codirector: Dr. Pablo Daniel Ribotta***

**2016**

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Cristina Ferrero y la codirección del Dr. Pablo Daniel Ribotta.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron difundidos a través de su publicación en revistas internacionales, nacionales y en actas de congresos.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2015). Panificados libres de gluten enriquecidos con fibra de bagazo de manzana. Revista La Alimentación Latinoamericana. N° 317, pp 60-64.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2015). Apple pomace in gluten-free formulations: effect on rheology and product quality. International Journal of Food Science & Technology, 50 (3), 682–690.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2015). Starch–Apple Pomace Mixtures: Pasting Properties and Microstructure. Food and Bioprocess Technology, 8 (9),1854-1863.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2015). Propiedades reológicas (RVA) y análisis de microestructura en sistemas de bagazo de manzana y suspensiones de harina de arroz y fécula de mandioca. Actas del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2014). Efecto del bagazo de manzana sobre las propiedades reológicas (RVA) de suspensiones de harina de arroz y fécula de mandioca. Actas V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2013). Caracterización térmica y reológica de mezclas con bagazo de manzana para la elaboración de panificados libres de gluten. Actas del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rosario.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2013). Panificados libres de gluten enriquecidos con fibra de bagazo de manzana. Actas del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rosario.

Rocha Parra, A. F., Ribotta, P. D., Ferrero, C. (2012). Desarrollo de panificados libres de gluten enriquecidos con fibra de bagazo de manzana. Actas del IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba.

**Dedico este trabajo a mi familia quienes siempre tuvieron palabras de apoyo en las diferentes situaciones que viví en estos años de valioso aprendizaje, muchas gracias a mi mama, mi papa y mi hermano, todos ellos un ejemplo para mí.**

## **Agradecimientos**

A la doctora Cristina Ferrero, mi Directora por su apoyo incondicional durante estos años, por haberme orientado, aconsejado y ayudado a crecer profesional y académicamente. Fue la persona que me brindó la oportunidad de presentarme a la convocatoria de beca doctoral en el CONICET.

Al doctor Pablo Daniel Ribotta, mi Codirector por las innumerables ideas que me proporcionó para el desarrollo de esta tesis doctoral, y porque cada vez que tuve la oportunidad de ir a Córdoba (ICYTAC, CONICET-UNC) siempre estuvo dispuesto a orientarme en todo lo que necesitara, además con mi Directora se convirtieron en un buen complemento pues cada uno desde su formación aportó herramientas valiosas para el desarrollo de este trabajo.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por haberme financiado tanto en la beca Tipo I, como en la beca tipo II, para la realización del doctorado, a la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) por haberme permitido formarme durante estos años en el doctorado la Facultad de Ciencias Exactas con un nivel académico sobresaliente.

A la empresa Jugos S.A. por la donación del bagazo de manzana, materia prima fundamental para la elaboración de esta tesis.

Al personal del CIDCA, tanto técnico como administrativo, que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de mi trabajo directa o indirectamente.

Al personal técnico del DSC, Daniel y Javier ya que su ayuda fue fundamental para realizar los análisis térmicos en los sistemas evaluados, a Claudio Reyes por su ayuda y buena onda en todo momento.

A Diana la persona encargada de la Biblioteca del CIDCA, quien siempre me ayudó en los artículos que pude necesitar.

A la doctora Leda Giannuzzi, por la orientación brindada en el análisis microbiológico.

Al grupo de investigación de la doctora Ana Pilosoff de la UBA, en especial a la doctora Carolina Arzeni por su ayuda en la determinación de tamaño de partícula.

A Enrique Portiansky y Patricia Sarmiento, las personas que me ayudaron en el análisis microestructural a través del análisis por microscopía confocal y SEM.

Al grupo de investigación en CEREALES del cual soy miembro, pues desde el primer día de trabajo en el instituto siempre fueron amables y conté con su apoyo para lo que necesitara: Cecilia, Paula, Anita, Vicky, Jime, Marie, Leo y Facu.

A mi hermano Diego una persona que sabe perfectamente lo que significa cumplir este objetivo personal y que todas las cosas que se proponen tarde o temprano con dedicación se consiguen.

A Juliana por su paciencia y colaboración desinteresada que me brindo en todo momento y por los buenos recuerdos desde que fuimos compañeros en la maestría.

A Facu y a Lucas que se convirtieron en un apoyo desde el momento en que los conocí, siempre sentí su apoyo y su amistad.

A los chicos del laboratorio de vegetales con los cuales compartimos laboratorio en mi primer año de beca: Majo, Laura, Facu, Luis, Joaquin.

A mis compañeros de box y compañeros en general del Cidca con los que compartí muchos buenos momentos: Vicky, Nati, Juli, Belen, Marito, Vicky, Estefi, Lau, Andrea, Karim y Claudia, Ceci, Cristian.

A Camilo y Pablito dos amigos colombianos con los cuales compartí muchos buenos momentos en este país.

A mis amigos en Colombia que siempre fue agradable escucharlos, o leerlos desde la distancia: Choky, Samuel, Menchito, Valencia, Camilo, Oscar, Julián.

A la doctora Angélica Sandoval, y el doctor Freddy Forero quienes fueron uno de mis primeros tutores en este mundo de la investigación, y de los que aprendí día a día en Corpoica.

A mi familia que a pesar de la distancia, siempre conté con su compañía desinteresada: a mis tías, a mi primo Juan Camilo con quien llegue hace unos años a La Argentina, y por su puesto a mis padres.

Y finalmente a todas las personas que me aportaron algo valioso en estos años, de todos ellos se aprende, muchas gracias.

## Resumen

En la actualidad los subproductos agroindustriales constituyen una importante fuente de diferentes compuestos fitoquímicos que pueden aprovecharse en distintas áreas desde un punto de vista biotecnológico, o como ingredientes alimentarios. El objetivo general del presente trabajo de tesis fue desarrollar una formulación saludable y sensorialmente aceptable de un producto panificado libre de gluten, adicionada con bagazo de manzana (BM), rico en fibra dietaria (FD) y con mínimo procesamiento.

Se deshidrató y caracterizó el bagazo obtenido como subproducto de la industria de jugo de manzana (Jugos S.A., Rio Negro). A lo largo del trabajo, se utilizaron tres bagazos correspondientes a los años 2010, 2012, 2014. El bagazo de manzana fue secado a 50°C, molido y tamizado por criba de 250 µm. Se obtuvo un polvo aromático y de color marrón, cuya composición porcentual presentó los siguientes rangos de valores: humedad, 5,88-14,01 %; proteína, 4,28-7,03 %; y cenizas, 0,84-1,77 %. Los contenidos de FD y de glúcidos distintos de fibra quedaron determinados por las condiciones de procesamiento en la planta; la FD varió entre: 41,04 y 67,91 % y la fibra cruda entre 24,10 y 43,19%. La actividad de agua del BM deshidratado varió entre 0,4 y 0,5, lo que permitió asegurar la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico. El tamaño de partícula registró una distribución bimodal, en donde los diámetros de Sauter fueron 0,84 µm para la población principal y 241,03 µm para el resto de la población de partículas.

Se realizaron ensayos preliminares con una formulación base para seleccionar la fuente proteica más adecuada para otorgarle estructura y volumen a la matriz sin gluten. Se evaluaron y compararon los siguientes ingredientes ricos en proteína: leche en polvo, suero de leche concentrado bajo en lactosa, suero de leche microparticulado y clara de huevo (CH). Otros ingredientes utilizados, además del BM fueron: fécula de mandioca (FM), harina de arroz (HA), levadura, margarina, NaCl, aditivos mejoradores de panificación (emulsificante, celulosa modificada), leudante químico y agua. Se escogió la formulación con CH la cual presentó el mayor volumen específico. Se definió además el perfil de producto comparando una formulación con NaCl y sin sacarosa agregada respecto a una sin NaCl y con sacarosa. La adición de BM disminuyó el volumen específico significativamente en comparación con las formulaciones control (sin BM, con sacarosa o NaCl). Por los resultados obtenidos se optó por un producto con CH como fuente proteica, sin NaCl, con sacarosa adicionada y HPMC (celulosa modificada).

De acuerdo a lo observado mediante microscopia láser confocal de barrido (CLSM) con fluoróforos específicos (Rodamina B para proteína, FITC para almidón, Calcofluor White para paredes vegetales), los batidos resultaron sistemas materiales complejos, en donde coexisten una dispersión de los gránulos de almidón, cuerpos proteicos y fibra, una solución de glúcidos y proteínas solubles, una emulsión y una espuma. El aire incorporado durante el batido forma una espuma estabilizada por parte de los componentes mencionados que dará lugar a la miga después del horneado.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para evaluar el efecto de las proporciones de BM y agua sobre las características de los batidos y la calidad final de los productos obtenidos. Los módulos dinámicos elástico ( $G'$ ), viscoso ( $G''$ ) y complejo ( $G^*$ ) del batido, así como el volumen específico ( $V_e$ ) del pan y el color y los atributos texturales de la miga fueron altamente dependientes de las cantidades de BM y de agua adicionados. Las migas con los mayores niveles de BM presentaron menores valores de cohesividad y resiliencia así como menores  $V_e$ . Hasta 12,5 g de BM por cada 100 g de la mezcla HA+FM+CH permitieron obtener  $V_e$  superiores a 2,0  $\text{cm}^3/\text{g}$ , en un rango de cantidades de agua entre 115-150 g cada 100 g de mezcla HA+FM+CH. Sin embargo, cuando se incrementó el contenido de BM hasta 20 g cada 100 g de la mezcla HA+FM+CH, fue necesario aumentar el contenido de agua necesario hasta valores superiores a 140 g para obtener volúmenes específicos de al menos 2,0  $\text{cm}^3/\text{g}$ . Dentro de este rango, los valores de cohesividad y resiliencia fueron superiores a 0,5 y 0,3 respectivamente. La incorporación de BM condujo a un mayor número de alveolos /  $\text{cm}^2$  y de menor tamaño. Evaluando la microestructura de la miga con CLSM y microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó que el BM produjo alveolos más irregulares, con paredes más rugosas. Las características del batido influyeron directamente en las características de la miga, como se comprobó en el análisis de correlación de Pearson. Un mayor nivel de BM y menor cantidad de agua generaron una miga más compacta, es decir con mayor densidad alveolar; para estas formulaciones el valor de los módulos dinámicos del batido resultaron elevados.

Se evaluó el efecto de diferentes niveles de BM sobre las propiedades de formación de la pasta (pasting) en sistemas modelo almidón-BM, utilizando un RVA. Se realizaron tres series de ensayos: a) sistemas con contenido de sólidos constante (3 g / 25 mL de agua), en donde se mezclaron harina de arroz (HA) y fécula de mandioca (FM) en proporciones iguales, y se reemplazó esta mezcla con diferentes cantidades de BM (0% - 50%). Los valores de los parámetros viscosidad de pico (VP), inestabilidad (B), viscosidad final (VF) y asentamiento (S) en muestras con 2,5% hasta 25% de reemplazo con BM no presentaron diferencias significativas. Sin embargo niveles de reemplazo mayores a 25% dieron lugar a una reducción marcada

de VP y VF; b) sistemas con la misma cantidad de HA+FM que las muestras de la serie a) pero sin BM (HA+FM entre 1,5 y 2,7). Los resultados indicaron que la contribución más importante a la viscosidad del sistema fue la del almidón hasta niveles de reemplazo de 10%. A niveles mayores la viscosidad fue influida principalmente por el BM; c) sistemas con adición de dos niveles de BM (5 y 20 %) a cantidades constantes de HA+FM (3 g); la mayor adición de BM condujo a un incremento significativo de la VP con respecto al control sin BM, sugiriendo un efecto sinérgico.

Los estudios microestructurales (microscopía de campo claro, SEM) sobre los geles obtenidos al final del ensayo de RVA revelaron que los sistemas HA+FM+BM estuvieron formados por una matriz predominante de FM (que tiene una temperatura de formación de pasta inferior a HA) donde están inmersos y agregados los gránulos de almidón de arroz y las partículas de BM. Las mediciones de la capacidad de imbibición de agua (WIC) indicaron que las partículas de BM son capaces de absorber agua en un grado mayor que los almidones.

Las transiciones térmicas se analizaron en sistemas modelo de HA, FM y BM con una relación sólidos: agua de 1:1, similar a la que se tiene en las formulaciones de los batidos. Con la adición de CH al sistema, se observó un aumento de las temperaturas inicial y de pico (59,43 y 69,91°C) respecto al sistema sin CH (56,83 y 66,23°C). Sin embargo, el BM no alteró significativamente las temperaturas encontradas. Paralelamente, la temperatura final de las endotermas de gelatinización aumentó con el incremento del contenido de sólidos de las mezclas

Los resultados obtenidos permiten concluir que el BM con mínimo procesamiento es un ingrediente de potencial aplicación en productos alimentarios. Su incorporación a matrices complejas como las formulaciones de panificados sin gluten, permitió obtener productos sensorialmente aceptables, con niveles de fibra dietaria total mayores a 3 g cada 100 g de producto final.

# Índice

Capítulo 1 .....	1
Introducción .....	1
1.1. Fibra dietaria .....	3
1.1.1. Composición de la fibra dietaria .....	5
1.1.1.1. PNA (polisacáridos no almidonosos).....	6
1.1.1.1.1. Celulosa .....	7
1.1.1.1.2. Hemicelulosas.....	7
1.1.1.1.3. Pectinas .....	9
1.1.1.2. Inulina y FOS .....	10
1.1.1.3. Almidón Resistente .....	10
1.1.1.4. Lignina .....	11
1.1.2. Propiedades físico-químicas .....	11
1.1.2.1. Tamaño de partícula .....	11
1.1.2.2. Características de la superficie de partícula .....	12
1.1.2.3. Hidratación.....	12
1.1.2.4. Capacidad de intercambio catiónico.....	13
1.1.3. Aplicaciones en matrices alimentarias reales .....	13
1.1.4. Efectos fisiológicos y beneficiosos del consumo de fibra dietaria sobre la salud .....	14
1.1.4.1. Atenuación de la glucosa en sangre .....	15
1.1.4.2. Disminución del colesterol sanguíneo .....	15
1.1.4.3. Regulación de la función colónica .....	16
1.1.4.4. Saciedad y reducción de peso .....	17
1.1.4.5. Prevención contra el cáncer .....	18
1.1.5. Fuentes de fibra convencionales.....	19
1.1.5.1. Subproductos hortofrutícolas como fuente de fibra .....	20
1.1.5.1.1. Cítricos.....	22
1.1.5.1.1.1. Limón .....	22
1.1.5.1.1.2. Naranja .....	22
1.1.5.1.2. Uva .....	22
1.1.5.1.3. Banana .....	23
1.1.6. Bagazo de manzana .....	23
1.1.6.1. Perfil nutricional bagazo de manzana .....	25
1.1.7 Aplicación de fibra dietaria en productos panificados .....	27
1.2. Productos panificados libres de gluten.....	28
1.2.1. Harinas libres de gluten .....	29
1.2.1.1 Componente mayoritario de las harinas: Almidón .....	29
1.2.1.2 Almidones utilizados en panificados sin T.A.C.C.....	32
1.2.2. Otros ingredientes.....	33
1.2.2.1. Proteínas.....	33
1.2.2.2. Agua .....	36
1.2.3. Principales aditivos en panes libres de gluten.....	37
1.2.3.1. Aditivos .....	37
1.2.3.1.1. Hidrocoloides .....	37
1.2.3.1.2. Emulsificantes.....	39
HIPOTESIS .....	43
OBJETIVOS .....	45
Capítulo 2 .....	47
Materiales y Métodos.....	47
2.1. Materiales .....	49
2.1.1. Bagazo de manzana .....	49
2.1.2. Harina y fécula utilizada .....	49
2.1.3. Fuentes proteicas .....	49

2.1.4. Hidrocoloide.....	50
2.1.5. Otros ingredientes.....	50
2.2. Métodos.....	50
2.2.1. Secado y esterilización del bagazo de manzana (tratamiento preliminar) .....	50
2.2.2. Caracterización físico química de los materiales.....	50
2.2.2.1. Humedad .....	50
2.2.2.2. Cenizas.....	51
2.2.2.3. Proteínas .....	51
2.2.2.4. Lípidos .....	52
2.2.2.5. Fibra dietaria total .....	53
2.2.2.6. Actividad acuosa.....	55
2.2.2.7. Determinación de tamaño de partícula.....	55
2.2.2.8. Determinación de color .....	56
2.2.2.9. Determinación de polifenoles totales.....	57
2.2.2.10. Isotermas de sorción.....	57
2.2.2.11. Recuentos microbiológicos .....	58
2.2.2.12. Ensayo de absorción de agua (WIC).....	60
2.2.3. Obtención de productos horneados libre de gluten .....	61
2.2.3.1. Ensayos preliminares: elección de la fuente proteica y perfil de producto .....	61
2.2.3.2. Panificación con la fuente proteica seleccionada y bagazo de manzana.....	61
2.2.3.2.1. Diseño experimental para las formulaciones de los batidos y panes.....	61
2.2.4. Propiedades reológicas de los batidos.....	63
2.2.4.1. Ensayos reométricos oscilatorios .....	63
2.2.4.1.1. Barrido de deformación.....	68
2.2.4.1.2. Barrido de frecuencia .....	69
2.2.4.2. Viscosidad de los batidos.....	69
2.2.5. Microscopía láser confocal de barrido.....	69
2.2.5.1. Preparación de las muestras.....	70
2.2.6. Protocolo de panificación .....	71
2.2.6.1. Caracterización de los panes.....	72
2.2.6.1.1. Altura del pan.....	72
2.2.6.1.2. Volumen específico de los panes.....	72
2.2.6.1.3. Humedad de miga de los panes.....	73
2.2.6.1.4. Análisis de textura de miga .....	73
2.2.6.1.5. Determinación del color de corteza y miga.....	75
2.2.6.1.6. Análisis macroscópico y microscópico del alveolado de la miga .....	75
2.2.6.1.7. Composición centesimal de los panes .....	77
2.2.6.2. Almacenamiento panes.....	77
2.2.6.3. Evaluación sensorial de los panes .....	77
2.2.7. Comportamiento de sistemas modelo almidón-bagazo de manzana.....	78
2.2.7.1. Perfil viscoamilográfico .....	78
2.2.7.1.1. Series experimentales en RVA.....	79
2.2.7.2. Microscopía de campo claro .....	80
2.2.7.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles obtenidos por RVA ...	80
2.2.7.4. Propiedades térmicas de los sistemas modelo y formulaciones completas (batidos) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	81
2.2.7.4.1. Gelatinización .....	81
2.2.7.4.2. Retrogradación .....	82
2.2.8. Análisis Estadístico .....	82
Capítulo 3 .....	85
Caracterización fisicoquímica del bagazo de manzana y ensayos preliminares.....	85
3.1. Caracterización fisicoquímica del bagazo de manzana .....	87
3.1.1. Características físicas .....	88
3.1.2. Características químicas.....	92
3.1.3. Ensayos microbiológicos sobre el bagazo de manzana .....	94

3.2. Ensayos preliminares para la elección de fuente proteica y perfil del producto ....	95
3.2.1. Perfil de producto: formulaciones con NaCl o sacarosa .....	99
Conclusiones parciales .....	103
Capítulo 4 .....	105
Caracterización de los batidos y productos horneados libres de gluten .....	105
4.1. Características microscópicas de los batidos .....	107
4.2. Ensayos reológicos sobre los batidos .....	111
4.2.1. Ensayos dinámicos oscilatorios sobre los batidos .....	112
4.2.2. Curvas de viscosidad .....	117
4.3. Panificación con la fuente proteica seleccionada y bagazo de manzana .....	119
4.3.1. Caracterización de los panes .....	120
4.3.2. Textura de la miga .....	122
4.3.3. Color .....	125
4.3.4. Análisis macroscópico y microscópico del alveolado de la miga .....	128
4.3.5. Correlación de Pearson entre las distintas variables .....	134
4.3.6. Ensayos de Almacenamiento .....	136
4.3.7. Composición de panificados libres de gluten .....	138
4.3.8. Evaluación sensorial de dos formulaciones con distinto nivel de fibra .....	140
Conclusiones parciales .....	143
Capítulo 5 .....	145
Estudio de sistemas modelo almidón- bagazo de manzana .....	145
5.1. Interacción entre componentes: comportamiento en sistemas modelo almidón- bagazo de manzana .....	147
5.1.1. Perfil viscoamilográfico .....	148
5.1.1.1. Resultados de las series experimentales con RVA .....	151
5.1.2. Ensayo de absorción de agua (WIC) .....	160
5.1.3. Microscopía de campo claro de los sistemas modelo .....	162
5.1.4. Microscopia electrónica de barrido de los sistemas modelo gelificado .....	164
5.1.5. Propiedades térmicas de los componentes analizados por calorimetría diferencial de barrido .....	166
5.1.5.1. Retrogradación .....	172
Conclusiones parciales .....	175
Capítulo 6 .....	177
Conclusiones Generales .....	177
6.1. Conclusiones .....	177
Bibliografía .....	183
Glosario .....	215

# **Capítulo 1**

## **Introducción**



## 1.1. Fibra dietaria

### 1.1.1. Rol de la fibra dietaria en los alimentos funcionales

La principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes tienen efectos físicos y psicológicos beneficiosos, gracias al aporte de los nutrientes básicos. Hoy en día, la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de conceptos clásicos, como evitar las deficiencias de nutrientes y la suficiencia nutricional básica, a los conceptos de nutrición "positiva" u "óptima". Las investigaciones han pasado a centrarse más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades. Se ha descubierto que muchos productos alimenticios tradicionales, como frutas, verduras, soja, granos enteros y leche contienen componentes que pueden resultar beneficiosos para la salud. Además de éstos, se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos componentes beneficiosos, por las ventajas que suponen para la salud, un ejemplo clásico es el desarrollo de alimentos con adición de fibra dietaria. Se denomina a estos alimentos "funcionales"

Los alimentos funcionales en la actualidad no cuentan con una definición legal globalmente aceptada. Generalmente, se considera que son aquellos alimentos, que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos, que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos esenciales o **fibra alimenticia**, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (European Food Information Council, EUFIC), entre otros ejemplos.

El término fibra dietaria (FD) fue utilizado por primera vez en por Hipsley (1953). Trowell (1976) amplió el término, el cual fue usado para describir los componentes de la pared celular vegetal que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas alimentarias humanas; esta definición incluye así a celulosas, hemicelulosas, ligninas, gomas, celulosas modificadas, mucílagos, oligosacáridos y pectinas. En el 2001, la AACC (American Association of Cereal Chemists) definió la FD como la parte comestible de

las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con la fermentación completa o parcial en el intestino grueso, que incluyen polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas. Este término ha evolucionado para incluir otros componentes, como polisacáridos no almidonosos, almidón resistente, proteína resistente, polifenoles y otros. (Green, 2001; Champ y col., 2003; McCleary, 2007; Goñi y col., 2009; Zuleta y Araya, 2009; Pérez-Jiménez y col., 2014).

Actualmente, tanto en bases de datos como en el rotulado de los alimentos se manejan cinco conceptos de fibra dietaria en función del método analítico utilizado para su determinación (Charrondiere y col., 2004):

- *Fibra dietaria total analizada por el método de la AOAC* (fundamentado en la indigestibilidad de los componentes). Este método puede medir casi totalmente los polisacáridos no almidonosos (PNA), como lo son la lignina, el almidón resistente y residuos no-específicos. El método de referencia de la AOAC es el método enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1984) y sus modificaciones.
- *Polisacáridos no-almidón (PNA) analizados por el método de Englyst* (Englyst y col., 1994). El valor de PNA no incluye lignina, ceras, cutina y almidón resistente.
- *Fibra dietaria total por diferencia*: calculada como  $100 - (\text{humedad} + \text{proteína} + \text{grasa} + \text{cenizas} + \text{carbohidratos disponibles})$ . Incluye al almidón resistente. Este cálculo es raramente utilizado por el error que conlleva.
- *Fibra dietaria total analizada por el método de Southgate* (Southgate, 1969). Este método en la actualidad poco utilizado, aunque se puede encontrar en la 5 edición de las tablas de composición de alimentos británicos y en las tablas de composición de alimentos de Grecia (1992). Consiste en un método colorimétrico que analiza PNA, lignina y algo de almidón.
- *Fibra bruta analizada por el método de Weende*, es la sumatoria de sustancias resistentes a la hidrólisis ácida, seguida de una hidrólisis con álcali. Este método incluye parte de lignina, celulosa y hemicelulosas. Sus valores son considerablemente menores a los de la fibra dietaria. Se utiliza en algunas

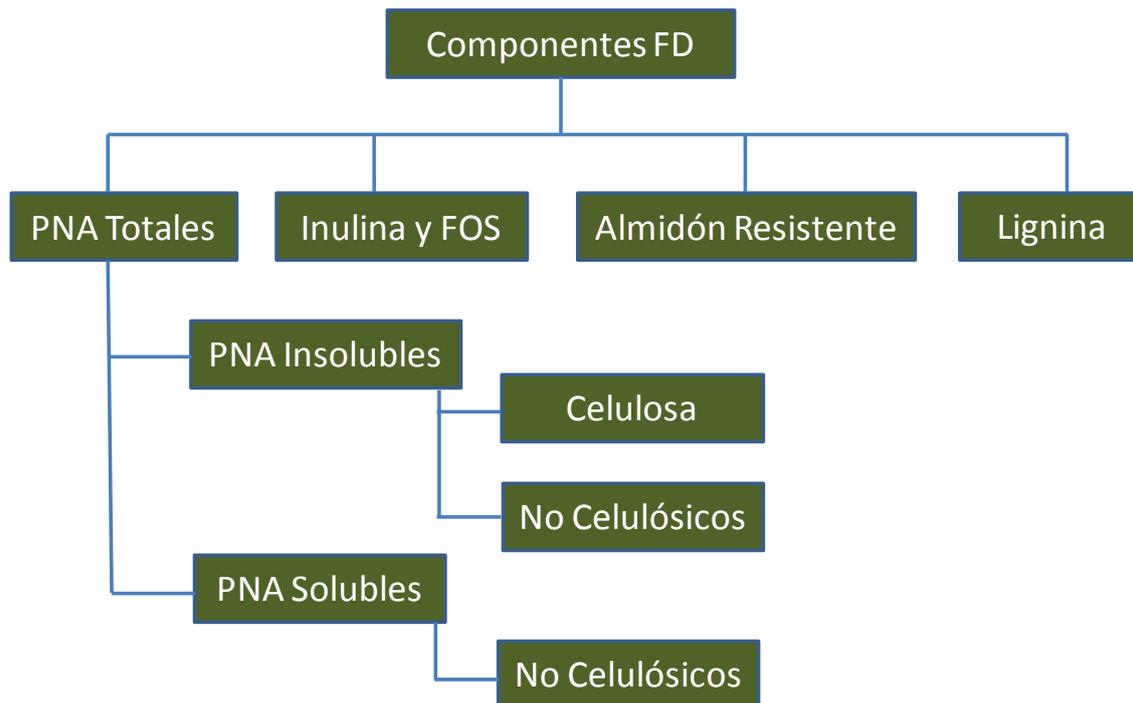
bases de datos de composición de alimentos, pero principalmente en el análisis de alimentos para animales.

Un concepto adicional que podría mencionarse es el de: *Fibra detergente neutro (FDN)* y *Fibra detergente ácido (FDAc)*. El método para medir FDAc lo desarrolló Van Soest (1963 a, b) y en 1967, Van Soest y Wine plantearon el método para obtener un residuo insoluble (FDN). El inconveniente más importante es que no se determina la fracción soluble de la fibra.

Según el Código Alimentario Argentino (2011) se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón (PNA), pectinas, almidón resistente, inulina, oligofructosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), y todos los que en el futuro incorpore la autoridad sanitaria nacional.

### **1.1.1. Composición de la fibra dietaria**

FD es generalmente clasificada en 2 categorías de acuerdo a su solubilidad en agua: fibra dietaria insoluble (FDI) celulosa, parte de la hemicelulosa y lignina; y fibra dietaria soluble (FDS) pentosanos, pectinas, gomas y mucilagos (Esposito y col., 2005). De acuerdo a su contribución en la ingesta diaria total de fibra, la FD puede ser subdividida en cuatro categorías (Figura 1.1.). Los polisacáridos no almidón contribuyen en un 40-50% del total mientras que el grupo inulina-FOS constituye de un 2 a 12% del total. Los almidones resistentes, de 1,5 a 15% y la lignina de 1 a 1,4% (Chawla y Patil, 2010). El total de fibra recomendada para una dieta de 2000 kcal diarias es de 25-30 g/d.



**Figura 1.1.** Componentes de la FD (Adaptado de Chawla y Patil, 2010)

#### 1.1.1.1. PNA (polisacáridos no almidonosos)

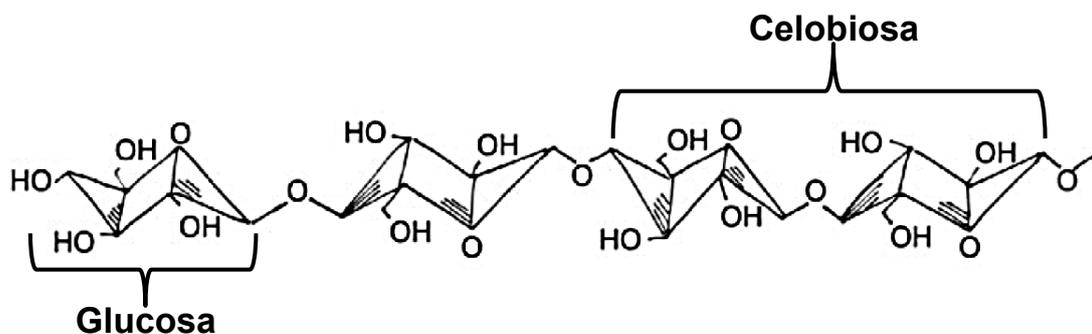
Polisacáridos no amiláceos contienen hasta varios cientos de miles de unidades de monosacáridos. La estructura de los polisacáridos pueden variar de acuerdo con el número de monosacáridos unidos entre sí, los diferentes tipos de monosacáridos presentes, el orden en la cadena del polímero, los tipos de vínculos entre los monosacáridos, la presencia de ramificaciones de la cadena principal del polímero, y el número de monosacáridos con grupos ácidos presente, por ejemplo, ácidos urónicos (Green, 2001) Dentro de los PNA principales se encuentran la celulosa, hemicelulosa, pectinas, oligosacáridos y otros componentes como gomas y mucílagos (Mataix y Gassull, 2002). La pared celular es definida como la estructura rígida situada en la zona más externa de las células de origen vegetal. Su composición química, así como el tipo de polisacáridos que la componen, varía ampliamente en función de la planta y el tipo de tejido. Los polisacáridos son los principales constituyentes de la pared celular primaria de frutas y hortalizas, concretamente, la celulosa, hemicelulosas y pectinas. Por su parte la lignina se encuentra mayoritariamente en las células que han desarrollado paredes celulares secundarias (Aboughe-Angone y col., 2008), La pared secundaria aparece sobre las paredes primarias, hacia el interior de la célula, se forma cuando la célula ha detenido su crecimiento y elongación. Se la encuentra en

células asociadas al sostén y conducción, el protoplasma de estas células generalmente muere a la madurez. Además de otras gomas (galactomananos, de algas, de microorganismos) que no serán detallados. A continuación se exponen las principales características de los de pared:

#### 1.1.1.1.1. Celulosa

Es el componente más abundante de las paredes celulares de las plantas superiores (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002). La celulosa constituye cerca de un cuarto de la fibra alimentaria de los granos de cereales y frutas y un tercio en hortalizas y frutos secos (Gray, 2006).

Es un polisacárido lineal no ramificado constituido por unidades de glucosa unidas por enlace glicosídico  $\beta$ -D-(1,4). Sin embargo la unidad básica de la celulosa es un dímero llamado celobiosa, el cual comprende dos unidades de glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -1,4 además de puentes de hidrogeno intermoleculares (Akin, 2010). Un esquema del tipo de estructura de la celulosa es mostrado en la Figura 1.2. Los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa benefician la formación de puentes de hidrógeno intra e intercatenariamente lo que conduce a la formación de microfibrillas que poseen una estructura cristalina muy estable. Esta disposición estructural junto a su composición química le confiere a la celulosa su carácter insoluble en agua.



**Figura 1.2.** Fragmento de una molécula de celulosa (Adaptado de Akin, 2010)

#### 1.1.1.1.2. Hemicelulosas

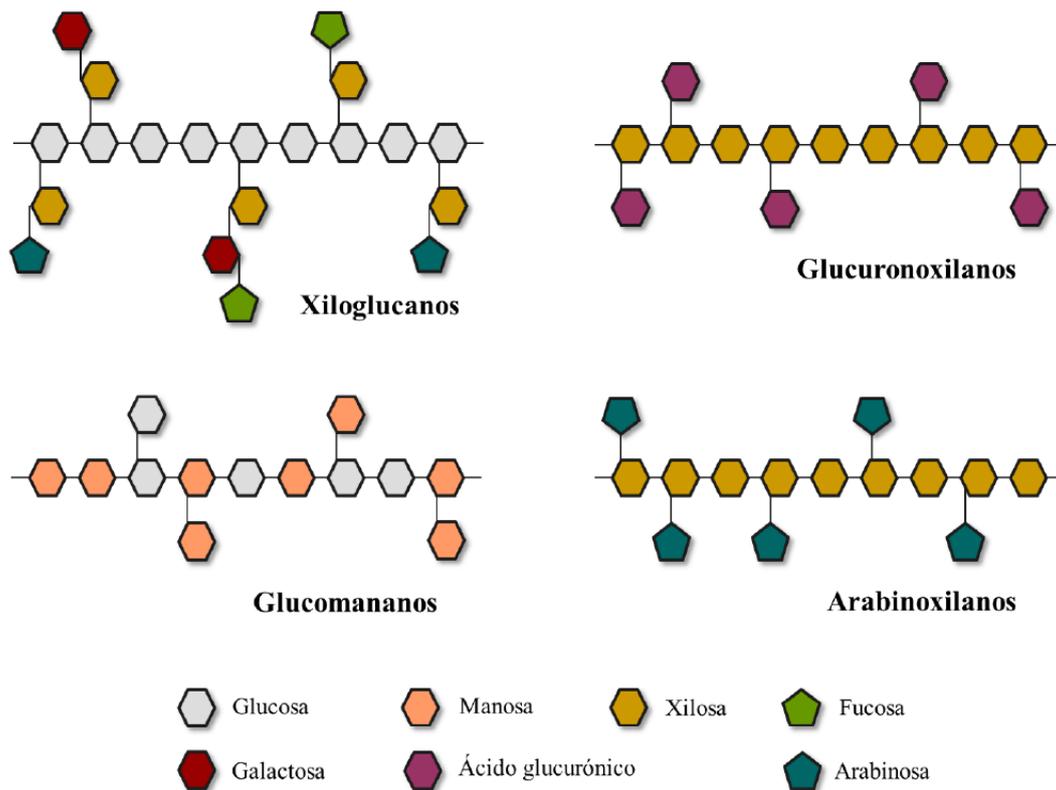
Bajo esta denominación, se agrupan diversos polisacáridos de estructura compleja y diferente composición química que junto con la celulosa forman parte de las paredes celulares de los vegetales. La diferencia más destacable entre las hemicelulosas y la

celulosa es que las primeras están constituidas por más de un tipo de monosacárido, lo que da lugar a diferentes heteropolímeros (Figura 1.3.). Entre estos, los xiloglucanos se destacan por su presencia mayoritaria en frutas y hortalizas (Derriche y Berrahmoune, 2007). Están constituidos por una cadena principal de glucosa con ramificaciones  $\alpha$ -1,6 de xilosa, que a su vez pueden presentar substituciones  $\beta$ -1,2 con unidades de galactosa, fucosa y/o arabinosa (Buckeridge, 2010).

Otro tipo de polisacáridos que pertenece al grupo de hemicelulosas es el de los xilanos acídicos o glucuronoxilanos, formados por una cadena principal de xilosa y ramificaciones de ácido glucurónico. También se destacan los glucomananos, algunas veces acetilados, constituidos únicamente por unidades de manosa y glucosa; y los arabinoxilanos los cuales presentan ramificaciones de arabinosa sobre una cadena principal de xilosa, son las principales hemicelulosas presentes en las paredes celulares de los cereales (Scheller y Ulvskov, 2010).

De acuerdo a su estructura presentan diferentes propiedades físicas y químicas, y por consiguiente en este grupo heterogéneo existen componentes solubles y otros insolubles (Lineback, 1999; Mataix y Gassull, 2002; Gray, 2006). Sin embargo, todas las hemicelulosas tienen algunas características estructurales comunes:

- Son polímeros que tienen una cadena principal lineal de azúcares con enlaces  $\beta$ -(1,4), de la cual, puede salir un número variable de ramificaciones laterales cortas.
- Su estructura es menos rígida que la de la celulosa, puesto que no forman agregados cristalinos.



**Figura 1.3.** Representación esquemática de los principales tipos de hemicelulosas (Adaptado Scheller y Ulvskov, 2010).

#### 1.1.1.1.3. Pectinas

Constituyen una compleja mezcla de polisacáridos coloidales, en donde su constituyente principal son los ramnogalacturonanos (I y II) que están formados por cadenas de  $\alpha$ -D-(1,4)-galacturonanos con residuos interpuestos de L-(1,2)- ramosa (Selvendran, 1985; Lineback, 1999). De acuerdo a su composición química, estos polímeros pueden aparecer parcialmente metil esterificados (pectinas) o libres (ácidos pécticos). Sin embargo, la estructura es más compleja porque además pueden presentar cadenas laterales consistentes en D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa y menos frecuentemente D-manosa, L-fucosa, ácido D-glucurónico, y algunos azúcares menos frecuentes como 2-O-metil-D-xilosa, 2-O-metil-L-fucosa y D-apiosa (Selvendran, 1985). Los azúcares neutros más comunes, D-galactosa y L-arabinosa, aparecen asociados al polisacárido péctico más frecuente, el ramnogalacturonano, formando cadenas de galactanos, arabinanos y arabinogalactanos (Selvendran, 1985; Lineback, 1999) como se muestra en la Figura 1.4.



#### **1.1.1.4. Lignina**

La lignina no es un polisacárido sino un polímero aromático complejo que contiene ácidos y alcoholes fenilpropílicos de peso molecular variable. Es muy resistente a la digestión en el intestino delgado y no es atacada por la flora bacteriana del colon (Fernández Bañares y Gassull Duró, 1999).

#### **1.1.2. Propiedades físico-químicas**

El interés actual de la FD arranca de la asociación epidemiológica entre una dieta rica en fibra y una menor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles de especial gravedad, como, por ejemplo, la enfermedad cardiovascular y el carcinoma de intestino grueso. Las repercusiones fisiológicas de las fibras derivan de sus características fisicoquímicas, que a su vez vienen determinadas por distintas propiedades fisicoquímicas, entre las que se destacan: el tamaño de partícula, las características de la superficie de la partícula, la hidratación, y la capacidad de intercambio catiónico. Estas propiedades específicas que se conocen estudiando la fibra in vitro, pueden variar en función de muchos factores, entre los que se encuentran: la madurez del alimento vegetal, tipo de tratamiento térmico, presencia de otros tipos de fibra, etc. (Guillon y Champ, 2000; Mälkki, 2001; Mataix y Gassull, 2002).

##### **1.1.2.1. Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula está relacionado con la historia de procesamiento que presenta el material que contiene la fibra, por ejemplo el tratamiento mecánico por molienda, pero también puede variar durante el tránsito en el tracto digestivo como consecuencia de la masticación, paso por el estómago y degradación bacteriana en el intestino grueso. El tamaño de partícula puede desempeñar un papel en el control de una serie de eventos que ocurren en el tracto digestivo por ejemplo el tiempo de tránsito intestinal, la fermentación y la excreción fecal (Guillon y col., 2000). Heller y col., 1980 realizaron un estudio nutricional en adultos a los que se le sometió a dos dietas diferente en función del tamaño partícula de fibra de trigo, y encontraron que el tamaño de partícula de la fibra influye en el peso de las heces de los sujetos estudiados, los pacientes que se alimentaron con una fibra de mayor tamaño de partícula, obtuvieron un peso mayor de las heces, esto lo atribuyeron a que la fibra de mayor tamaño de partícula presentó mayor capacidad de retención de agua y por lo tanto esto provoca el aumento del peso de las heces.

### 1.1.2.2. Características de la superficie de partícula

La porosidad y la superficie disponible pueden influir en el proceso de fermentación de la fibra dietaria, mientras que las características de la capa superficial pueden jugar un papel en algunas propiedades fisicoquímicas como la adsorción o unión de algunas moléculas.

La porosidad y la superficie disponible dependen de la arquitectura de la fibra, la cual está relacionada con el origen y tratamiento al que se ha sometido la misma. Dependiendo del tamaño del poro, una matriz de fibra insoluble puede retener agua en mayor o menor cantidad. No se conoce con precisión el mecanismo por el cual los constituyentes de la fibra dietaria controlan la porosidad de la pared celular, aunque existen algunos autores que afirman que las pectinas tienen un papel dominante (Guillon y Champ, 2000).

### 1.1.2.3. Hidratación

La capacidad de hidratación del material de la pared celular ha sido ampliamente estudiada. Se pueden evaluar diferentes aspectos de la hidratación de la fibra y por lo tanto surge la necesidad de definirlos por separado (Thibault y col., 1992; Guillon y Champ, 2000; Bach Knudsen, 2001):

**Capacidad de retención de agua (WHC):** es la cantidad de agua retenida por la fibra dietaria sin aplicación de una fuerza externa, medida a través de capilaridad por ejemplo.

**Capacidad de unión de agua (WBC):** es la cantidad de agua que permanece unida a la fibra hidratada tras la aplicación de una fuerza externa, medida mediante la aplicación de centrifugación.

**Capacidad de embeber agua (WIC):** Puede ser definida como la cantidad de agua que es espontáneamente imbibida por la matriz analizada, es medida a través del dispositivo de Bauman, el cual funciona por capilaridad (Torgersen y Toledo, 1977; Añón, y col., 2001).

**Hinchamiento:** es la primera parte del proceso de solubilización. Consiste en la entrada de agua que expande las macromoléculas hasta que son completamente extendidas y dispersadas, después de lo cual se solubilizan.

**Solubilidad:** es una propiedad que tienen profundos efectos en la funcionalidad de la fibra. La solubilización no es posible en el caso de que los polisacáridos adopten estructuras regulares y ordenadas, como la celulosa o los arabinosilanos lineales, de manera que estas estructuras sólo pueden hincharse.

La mayor parte de los polisacáridos generan soluciones viscosas cuando se disuelven en agua (Bach Knudsen, 2001). La viscosidad puede ser descrita como la resistencia al flujo y depende, principalmente, del peso molecular del polímero y de su concentración. Los polisacáridos solubles, como los arabinogalactanos, presentan relativamente una baja viscosidad en solución acuosa (Furuta y Maeda, 1999; Maeda, 2000).

#### **1.1.2.4. Capacidad de intercambio catiónico**

La fibra dietaria en su estructura química puede presentar grupos ionizables como los grupos carboxilo, que tienen capacidad de fijar cationes divalentes como el calcio. En el caso de fibras provenientes de cereales, presentan en su composición ácido fítico, que es un intercambiador polifuncional de cationes (Thibault y col., 1992).

#### **1.1.3. Aplicaciones en matrices alimentarias reales**

La FD puede impartir algunas propiedades físicas y estructurales particulares (Tabla 1.1.) a los alimentos, por ejemplo, modificar las propiedades texturales, aumentar su capacidad de retención de agua (WHC), la capacidad de retención de aceite, emulsificación y / o formación de gel. Estos cambios pueden afectar favorablemente la estabilidad de la matriz. La fibra dietaria incorporada en los productos alimenticios (productos de panadería, lácteos, mermeladas, carnes, sopas) puede evitar la sinéresis (separación de líquido de un gel causada por la contracción), estabilizar comida alta en grasa y emulsiones, y mejorar así la vida de anaquel (Elleuch y col., 2011). La FD ha sido aplicada en diversos productos cárnicos altos en grasa como las salchichas, que además contienen almidón dentro de su matriz, y la FD ayuda a la formación de una red de gel fuerte que puede prevenir el encogimiento de la salchicha durante la cocción (perdidas por cocción) (Aleson-Carbonell y col., 2005).

**Tabla 1.1.** Parámetros relacionados con la funcionalidad de los alimentos

Funcionalidad	Parámetro
Sensorial	Cohesividad
	Dureza
	Crujencia
	Gomosidad
Mecánico/físico	Densidad
	Expansión
	Esfuerzo/Resistencia
	Viscosidad
Microestructura	Cristalinidad
	Porosidad
	Uniformidad
Funcional	Retención de agua
	Emulsificación
	Untabilidad
	Capacidad de batido

Adaptado de Dreher (1999)

#### 1.1.4. Efectos fisiológicos y beneficiosos del consumo de fibra dietaria sobre la salud

Desde mediados de la década de 1970, el interés en el papel de la FD en la salud y la nutrición ha dado lugar a una amplia gama de investigaciones y recibido considerable atención pública (Abdul-Hamid y Luan, 2000). Los informes publicados indican numerosos beneficios para la salud asociados con un aumento en la ingesta de FD, entre los cuales se incluyen la reducción del riesgo de enfermedad coronaria, la diabetes, la obesidad y algunas formas de cáncer, además de beneficios en relación con el tiempo de tránsito intestinal y la prevención del estreñimiento (Mann y Cummings, 2009; Sabanis y col., 2009).

El principal efecto fisiológico de la FDI es la mejora de los hábitos intestinales, en particular lo relacionado con su efecto laxante (Schneeman, 1999; Slavin, 2008). Por otra parte la FDS tiene diferentes efectos, sirve como sustrato de la microflora intestinal, en particular y dependiendo de la fibra puede promover el crecimiento de bacterias probióticas (bacteria lácticas, bifidobacterias) las cuales son beneficiosas para el intestino; esta acción de ciertas fibras se denomina efecto prebiótico (Esposito

y col., 2005; Chawla y Patil, 2010). Además, son capaces de controlar el índice glucémico (Tudorica y col., 2002) y reducir el colesterol plasmático (Brown y col., 1999).

#### **1.1.4.1. Atenuación de la glucosa en sangre**

Habitualmente es aceptado que una dieta rica en FD particularmente en FDS, es útil en el control de la concentración de glucosa en plasma en individuos diabéticos (Guillon y Champ, 2000; Gray, 2006).

Diferentes estudios han confirmado que una dieta rica en carbohidratos no digeribles reduce la concentración de glucosa en sangre y disminuye el grado de hiperinsulinemia en los pacientes con diabetes tipo II (Chandalia y col., 2000). El consumo de fibra dietaria puede tener importancia en los individuos con diabetes tipo I puesto que presenta carbohidratos de digestión lenta que regulan las necesidades de insulina porque la absorción intestinal de los nutrientes se produce de manera más lenta, mejorando la tolerancia a la glucosa (Holt y col., 1996; AACC, 2001).

Durante la ingesta de fibra dietaria los mecanismos de mejora del control glicémico parecen estar relacionados con la absorción lenta de los carbohidratos, de manera que reducen o retrasan su absorción. Los alimentos que presentan un índice glicémico bajo, como por ejemplo las legumbres, pueden ser potencialmente útiles en la prevención y tratamiento de la diabetes tipo II (Chandalia y col., 2000; Jenkins y col., 2003; Gray, 2006), además pueden mejorar la tolerancia a la glucosa, siendo potencialmente aptas para dietas de individuos con diabetes tipo I (Holt y col., 1996; AACC, 2001).

Los ácidos grasos de cadena corta, acetato y propionato, originados en la fermentación de la FD son los productos de la acción bacteriana que al ser absorbidos regulan el metabolismo de la glucosa, debido a que disminuyen la glucosa postprandial (es aquella que se hace presente en la sangre después de ingerir alimentos) y la respuesta insulínica (García Peris y col., 2002).

#### **1.1.4.2. Disminución del colesterol sanguíneo**

Los efectos más destacados de la FDS, sobre las lipoproteínas séricas se relacionan con la absorción de los ácidos biliares y colesterol en el intestino delgado, y con la disminución de la reabsorción de estos ácidos biliares en el íleon terminal (Anderson y Major, 2002). De este modo, la cantidad de ácidos biliares que llega al colon para su excreción junto a las heces es mayor, disminuyendo la cantidad de estos ácidos que

retorna al hígado por circulación enterohepática. Los ácidos biliares reabsorbidos retornan al hígado por la vena porta y modulan la síntesis de colesterol o su catabolismo a ácidos biliares. La disminución en la reabsorción de estos ácidos hace que aumente su síntesis hepática, aumentando el uso del colesterol.

Asimismo, se produce un descenso en la síntesis de colesterol en el hígado, debido parcialmente a la reducción de las concentraciones de insulina en sangre, ya que la insulina es responsable de la activación de un enzima clave de la síntesis de colesterol, y por otro lado, este efecto podría ser atribuido al perfil alterado de los ácidos biliares en el hígado, especialmente la alta concentración de ácido deoxicólico, el cual es capaz de inhibir la síntesis del colesterol (Mälkki, 2001).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por fermentación de la FDS a nivel del colon ayudan a reducir la síntesis de colesterol hepático (Anderson y Hanna, 1999) ya que están implicados en la regulación del metabolismo intermediario hepático. Se ha demostrado que el ácido propiónico, uno de estos AGCC, disminuye la síntesis hepática del colesterol, por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A (Guillon y col., 2000; Delzenne y Kok, 2001; García Peris y col., 2002). Además algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras otras parecen inhibir la absorción del colesterol a través de la pared intestinal (Mussatto y Mancilla, 2007).

#### **1.1.4.3. Regulación de la función colónica**

La fibra dietaria contribuye a disminuir el tiempo de tránsito intestinal, prevenir el endurecimiento de las heces y retener agua (Mongeau y col., 1999; Gray, 2006).

Los efectos fisiológicos de la fibra dietaria en el colon varían en función de los componentes que la constituyen. Así, la FDI muestra efectos mecánicos que disminuyen el tiempo de tránsito intestinal, a diferencia de la FDS que tiene efectos sistémicos (Bennett y Cerda, 1996).

Al parecer los efectos de la FD sobre el peso de las heces dependen del tipo de polisacáridos y constituyentes asociados que contribuyen a la estructura de la pared celular vegetal (Mongeau y col., 1999). La fibra dietaria puede aumentar el volumen fecal como consecuencia de la capacidad de retención de agua de la fracción no fermentada, fundamentalmente polisacáridos insolubles (Johnson, 2000; Mälkki, 2001), además debido al aumento del número de bacterias resultantes de la extensa fermentación de los oligosacáridos no-digeribles (Mussatto y Mancilha, 2007). La fibra soluble es metabolizada por las bacterias colónicas en mayor medida que la fibra

insoluble, de este modo la viscosidad se reduce y los productos de degradación de la fermentación son utilizados como nutrientes por la microflora del colon (Mongeau y col. 1999). El incremento de la masa celular microbiana tiene una alta capacidad de retención de agua, causando el ablandamiento de las heces y evitando el estreñimiento (Mälkki, 2001; Gray, 2006; Mussatto y Mancilha, 2007).

Se ha informado que la suplementación de la dieta de ratas hembra Wistar Hannover con okara (residuo que queda después de la extracción de las semillas trituradas de soja para producir la llamada “leche de soja”) aumenta la excreción fecal y el peso de sus heces por su alto contenido en humedad, atribuible, sobre todo, al contenido en fibra insoluble. Además se encontró que la fermentación cecal es mayor en el grupo de ratas alimentado con la dieta enriquecida en okara, pudiendo indicar un potencial efecto prebiótico (Préstamo y col., 2007).

Además de los efectos mencionados, la fibra dietaria tiene un efecto positivo en el tratamiento de la enfermedad de colon irritable (Bosaeus, 2004).

#### **1.1.4.4. Saciedad y reducción de peso**

Los alimentos que presentan un alto contenido en FD son digeridos más lentamente, por lo tanto se ve afectada la absorción de nutrientes, que sucede de una forma lenta (Jenkins y col., 1993). Adicionalmente, los alimentos ricos en fibra son generalmente, de menor densidad calórica y de volumen mayor, lo que puede limitar espontáneamente la ingesta (Saris, 2003). La fibra incrementa la masticación, lo cual limita la ingesta mediante la promoción de la secreción de saliva y jugo gástrico, dando como resultado una expansión del estómago y aumento de la saciedad (Slavin, 2005).

Existen diferentes efectos que permiten explicar la saciedad que produce la fibra dietaria. El primero sucede a nivel estomacal, donde la fibra se une al agua y se hincha causando distensión (Mälkki, 2001). Asimismo, la viscosidad de la fracción soluble ralentiza el paso al intestino prolongando el tiempo de tránsito en el estómago (Bergmann y col., 1992; Mälkki, 2001). La distensión estomacal junto con el mayor tiempo de tránsito estomacal favorece la sensación de saciedad. Sin embargo el principal efecto posiblemente ocurre a nivel del intestino delgado, cuando la grasa y proteínas o aminoácidos entran en contacto con los receptores intestinales. La unión de estos nutrientes con los receptores intestinales inducen la liberación de la colecistoquinina, hormona cuyo efecto retrasa el vaciamiento gástrico, disminuye la hiperglicemia postprandial y aumenta la saciedad. La fibra dietaria incrementa la secreción de colecistoquinina. Se cree que esto es debido a la viscosidad de la fibra ya

que aumentaría el tiempo de contacto entre la grasa, los aminoácidos y los receptores intestinales (Reidelberger, 1994; Holt y col., 2001; Mälkki, 2001; Slavin, 2005).

Algunas investigaciones indican la posibilidad de que la saciedad provocada por la FD podría explicar la reducción de peso en algunas personas (Mälkki, 2001). Sin embargo, este efecto de la fibra en la prevención y control de la obesidad es más controvertido, aunque existen estudios epidemiológicos que han demostrado que la fibra alimentaria es una importante herramienta en el control de la obesidad (Slavin, 2005). En el citado trabajo de Préstamo y col., (2007) se obtuvo una disminución en el peso de las ratas hembra Wistar Hannover alimentadas con una dieta enriquecida en okara.

#### **1.1.4.5. Prevención contra el cáncer**

Diferentes trabajos le han atribuido a la fibra dietaria un papel en la prevención del cáncer colorrectal, sin embargo el tema ha estado siempre en discusión y se han generado opiniones contradictorias. La fibra dietaria puede presentar un papel en el cáncer de colon, y asimismo se le atribuye incidencia en la reducción del riesgo de otras enfermedades crónicas del sistema digestivo (Kushi y col., 1999; Scheppach y col., 2004; Gray, 2006).

Diferentes investigaciones se han realizado en las que se proponen distintos mecanismos que explican el efecto beneficioso de la fibra contra el cáncer de colon, entre los que se incluye: la dilución y unión a carcinógenos potenciales, disminución del tiempo de tránsito intestinal, reducción de la producción de ácidos biliares secundarios debido a la fijación de los ácidos biliares primarios y fermentación de la fibra produciendo ácidos grasos de cadena corta (Bingham y col., 2003; Peters y col., 2003; Gray, 2006). La fibra dietaria al reducir el tiempo de tránsito intestinal, evita la presencia de material fecal y la poca frecuencia de los movimientos intestinales que pueden producir una prolongada exposición de las células colónicas a mutágenos fecales. Igualmente, la fibra puede diluir los ácidos biliares produciendo una fase sólida dispersa, la cual absorbe sales biliares reduciendo su presencia en el agua fecal. Desde hace tiempo se sospecha que estas sales biliares puedan causar irritación crónica en el colon y por lo tanto actuar como promotores endógenos de tumores (Johnson, 2000). El consumo de fibra y carbohidratos complejos origina una alta fermentación colónica que resulta en un aumento de ácidos grasos de cadena corta que estimulan la micro flora del colon, la cual presenta un papel potencial en la prevención contra el cáncer de colon e infecciones colónicas, ya que inhiben el

desarrollo de bacterias de putrefacción (*Clostridium perfringens*) y patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria sp.*, shiguella), (Guillon y Champ, 2002).

Entre los AGCC, el butirato tiene un papel trófico muy importante en el colonocito, además puede actuar como regulador de la expresión de genes implicados en la proliferación y diferenciación de las células del colon, de manera que ha sido propuesto como protector contra el cáncer de colon (Edwards y Parrett, 1996; Guillon y col., 2000; García Peris y col., 2002; Bingham y col. 2003). Al mismo tiempo, la producción de los AGCC produce una disminución del pH que inhibe el crecimiento de ciertas cepas bacterianas patogénicas y estimula el crecimiento de microorganismos beneficiosos como bifidobacterias y lactobacilos; esto incrementaría la inmunidad celular y se podría traducir en reducción del riesgo de desarrollo de cáncer de colon. Un pH colónico bajo puede, además, ayudar en la excreción de carcinógenos (Mussatto y Mancilha, 2007).

### **1.1.5. Fuentes de fibra convencionales**

La FD se encuentra disponible en la dieta humana a través de una amplia variedad de fuentes alimentarias, tales como cereales crudos y procesados, vegetales, legumbres y frutas. La composición de la FD varía con el tipo de tejido vegetal (Tabla 1.2.).

Asimismo, las proporciones de los diferentes componentes de la FD que se encuentra en alimentos vegetales dependen de la madurez de las plantas. En las paredes celulares vegetales típicas, los porcentajes de celulosa, lignina y minerales tienden a ser más altos y el porcentaje de polisacáridos no celulósicos, ceras, y proteína tienden a ser más bajos en plantas maduras que en las inmaduras. La parte de la planta consumida y su madurez relativa, así como el almacenamiento y maduración, puede influir en la composición de FD de alimentos de origen vegetal. Las técnicas de procesamiento de alimentos también pueden alterar la composición de la fibra nativa. Los vegetales y cereales tienden a ser buenas fuentes de celulosa. La lignina es más alta en frutas con semillas comestibles como las frutillas (fresas) o en las hortalizas maduras, como las zanahorias y otras verduras de raíz. Los cereales integrales y salvado son ricos en hemicelulosa. La pectina se encuentra en frutas como manzanas y naranjas. La avena y porotos (frijoles) secos constituyen una buena fuente de FDS (Dreher, 2001).

**Tabla 1.2.** Influencia de la fuente sobre la composición de la fibra dietaria

Grupo de alimento	Tipo de tejido o matriz	Polímeros Mayoritarios
Cereales	Endospermo	Arabinosilanos
	Cubiertas de semillas	$\beta$ -D-Glucanos
		Celulosa Lignina
Frutas y vegetales	Parénquima	Sustancias pécticas
	Tejido vascular	Xiloglucanos
	Tejido epidérmico	Celulosa Lignina Cutina Ceras
Semillas y otros cereales	Cotiledones	Sustancias pécticas
	Paredes del endospermo	Galactomananos Xiloglucanos Celulosa
Aditivos alimentarios polisacarídicos	Amorfo	Gomas
	Soluble	Polisacáridos de algas
	Dispersable	Galactanos sulfatados Ésteres/Éteres de celulosa

(Adaptado de Dreher, 2001)

#### 1.1.5.1. Subproductos hortofrutícolas como fuente de fibra

La industria alimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados o se utilizan para alimentación animal u otros fines distintos. Se puede considerar **subproducto** a todo producto no principal obtenido en un determinado proceso y que tiene o puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamientos, de forma que lo que para una industria es un subproducto para otra puede constituir la materia prima, obteniendo a su vez un producto principal (Castells, 2009).

Las pautas dietéticas aconsejan una dieta rica en frutas y verduras como parte de un estilo de vida saludable. En la actualidad, durante la preparación y procesamiento hasta un tercio de las frutas y verduras se descarta en forma de cáscaras, pepitas y

tallos. Por lo tanto, se va generando un "residuo" que puede contener sustancias de valor nutricional o funcional, mientras que también se disminuye el máximo potencial nutricional de la fruta o verdura. Los investigadores están descubriendo nuevos usos alternativos para tales "residuos" como posibles ingredientes con valor agregado (O'Shea y col., 2012).

En particular, las bebidas de frutas y productos derivados tales como jugos, néctares, y refrescos han experimentado una creciente demanda en los últimos años. En el año 2002 el consumo mundial de bebidas industrializadas de frutas fue de 94,3 billones de litros, para el año 2009 fue de 117,7 billones de litros, presentándose un incremento del consumo de aproximadamente un 25% (Neves y col., 2011). Esta industria a su vez genera gran cantidad de subproductos que pueden representar en ocasiones problemas, pues este material es generalmente propenso al deterioro microbiano, por lo tanto el aprovechamiento de estos subproductos de manera eficiente, con bajo costo y a través de un proceso ambientalmente amigable es cada vez más importante (Schieber y col., 2001).

Los subproductos de frutas y vegetales son generados fácilmente y en gran cantidad (Tabla 1.3.), además pueden ser recuperados y utilizados como un valor agregado en diferentes productos, ya que proporcionan FD, así como compuestos bioactivos como polifenoles y aceites esenciales, los cuales aportan beneficios económicos para las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas (Elleuch y col., 2011).

Dentro de los subproductos de frutas que en la actualidad se utilizan como fuente de fibra y otros compuestos fitoquímicos se destacan los bagazos obtenidos de la uva, los cítricos (naranja, limón) y manzana.

**Tabla 1.3.** Producción mundial de subproductos de la industria agroalimentaria de frutas.

Subproducto	millones toneladas/año
Cascara cítricos	15,6
Bagazo de manzana	3-4,2
Bagazo de uva	5-9
Cascara banana	9
Residuos kiwi	0,9

(Adaptado de Lin y col., 2012)

#### **1.1.5.1.1. Cítricos**

##### **1.1.5.1.1.1. Limón**

Una vez que el zumo y aceite esencial se han extraído del limón, el restante subproducto constituye aproximadamente 50% de la fruta original. Este subproducto se compone de las cáscaras (albedo y flavedo), semillas y pulpa de fruta. Normalmente es utilizado para alimentación animal, o como fuente de pectina (Lario y col., 2004). Sin embargo, algunos trabajos han destacado los atributos potencialmente saludables del subproducto del limón. Gorinstein y col. (2001) encontraron niveles de FD de 14 g/100 g (base seca) en las cáscaras de limones, en comparación con 7,34 g/100 g (base seca) en la fruta pelada. La FD total contenía fibra insoluble de 9,04 g/100 g (base seca) y 4,93 g/100 g (base seca) fibra soluble. También encontraron que la cáscara del limón para ser una buena fuente de hierro.

##### **1.1.5.1.1.2. Naranja**

Las naranjas se consumen generalmente de forma directa o en forma de jugo de naranja recién exprimido, concentrado o pasteurizado. El 85% de las naranjas son procesadas para la obtención de jugo de naranja, dejando tras de sí toneladas de subproducto después de la producción. Por lo general, este subproducto se utiliza como alimento animal (Topuz y col., 2005)

Chau y Huang (2003) investigaron el contenido de FD de la cáscara de naranja (variedad Liucheng). Encontraron que la cáscara contiene 57% de FD (base seca); de ésta, 47,6% fue la fracción insoluble y 9,41% fue la fracción soluble. La fracción insoluble es la fracción dominante proporcionando así beneficios para la salud tales como la regulación intestinal y el aumento de volumen de las heces. Se determinó también que los polisacáridos pécticos y celulosa fueron los principales constituyentes de la fibra.

##### **1.1.5.1.2. Uva**

El bagazo de uva es un subproducto generado en el proceso de elaboración del vino, se compone de semillas, cáscaras y tallos. Se utiliza como fuente de FD y en la producción de ácido cítrico, metanol, etanol y goma de xántica como resultado de la fermentación (Deng y col., 2011). El bagazo de uva ha demostrado ser una rica fuente de FD; sus componentes comprenden principalmente celulosa y menores proporciones de pectinas y hemicelulosas (Kammerer y col., 2005)

#### **1.1.5.1.3. Banana**

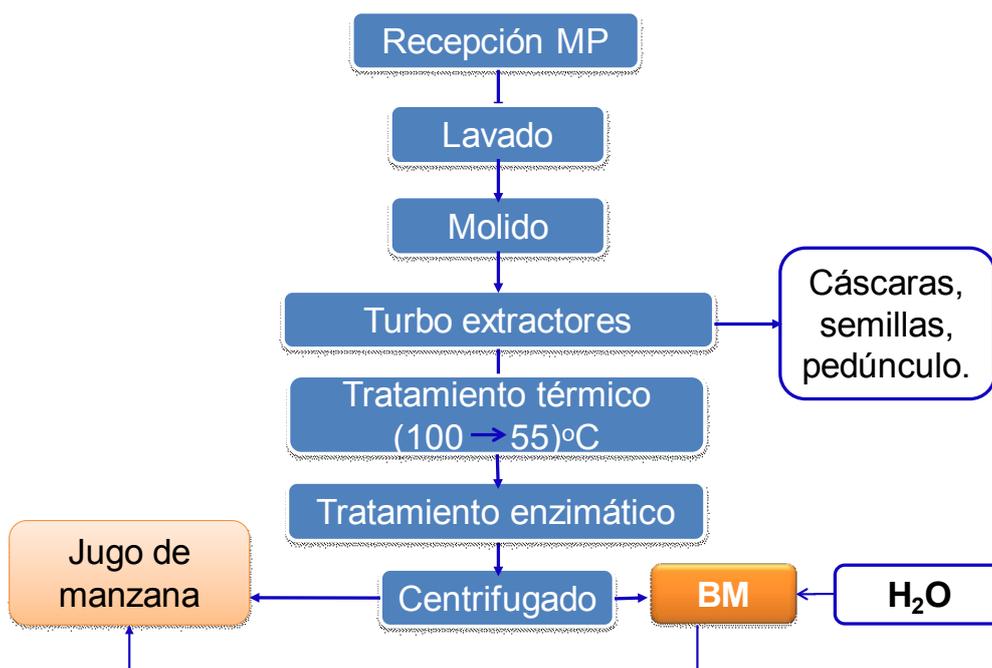
Dentro de las frutas a nivel mundial el cultivo de banana, representa uno de los más importantes con una producción anual de 50 millones de toneladas. Las cáscaras constituyen hasta el 30% del fruto maduro. Desde el punto de vista biotecnológico los subproductos de la banana se han utilizado para producir diferentes productos como proteína, etanol,  $\alpha$ -amilasa, celulasas, y hemicelulasas (Schieber y col., 2001).

#### **1.1.6. Bagazo de manzana**

Dentro de la producción mundial de manzana el 25-30% es destinado al procesamiento, a su vez dentro de este segmento el principal producto es el jugo concentrado de manzana (JCM) (65%), el resto de manzana procesada (25%) se destina a la producción de sidra, mermelada, purés y deshidratados. (Bhushan y col., 2008).

En la Figura 1.5 se presenta un diagrama de flujo típico de la obtención de jugo de manzana en una industria procesadora de jugos (Jugos S.A.).

A nivel regional Argentina es el quinto productor mundial de jugo concentrado de manzana, ubicándose como líder del hemisferio sur en este producto. Por su parte, las exportaciones argentinas concentran el 10 % del comercio mundial, siendo el cuarto exportador en el orden internacional (Ablin, 2011).



**Figura 1.5.** Esquema general del proceso de obtención de jugo de manzana y bagazo como subproducto en la empresa Jugos S.A.

Esta industria genera una gran cantidad de un subproducto conocido como bagazo de manzana (Tabla 1.4.), el cual es el producto obtenido (25-30% del peso total de la manzana fresca) después de la extracción del jugo, y consiste principalmente de pulpa/cáscara (95%), semillas (2-4%), y pedúnculo (1%) (Bhushan y col., 2008; O'Shea y col., 2012).

**Tabla 1.4.** Producción mundial de bagazo de manzana.

País	miles toneladas/año
China	1800
India	1300
Alemania	250
Japón	160
Irán	97
Estados Unidos	27
Nueva Zelanda	20
España	20
Brasil	13.7

(Adaptado de Bhushan y col., 2008; Kanwar y col., 2012; Xue y col., 2013)

### 1.1.6.1. Perfil nutricional y funcional bagazo de manzana

La composición del bagazo de manzana se describe en la Tabla 1.5 a y b. El perfil nutricional del bagazo de manzana seco muestra un elevado contenido de carbohidratos y fibra dietaria (Bhushan y col., 2008).

**Tabla 1.5.** Composición proximal del bagazo de manzana

Componente	Composición (base seca)
Humedad (%)	3,90-10,80
Proteína (%)	2,94-5,67
Carbohidratos totales (%)	48,0-62,0
Fibra (%)	4,70-51,10
Insoluble	3,36-36,5
Soluble	1,34-14,6
Grasa (extracto etéreo, %)	1,20-3,90
Pectina (%)	3,50-14,32
Cenizas (%)	0,50-6,10
<b>Fracción de carbohidratos soluble en alcohol</b>	
Sacarosa (%)	3,8-5,8
Glucosa (%)	19,50-19,70
Fructosa (%)	48,3
Xilosa, manosa, galactosa (%)	1,20-4,40
Ácido málico (%)	2,60-3,20
Arabinosa y ramnosa (%)	6,00-7,90
Gluco-oligosacáridos (%)	3,40-3,80
Xilo-oligosacáridos (%)	3,0-3,70
Arabino-oligosacáridos (%)	0,20-0,40
Ácidos urónicos (%)	2,70-3,40
<b>Fracción de carbohidratos insoluble en alcohol</b>	
Glucanos (%)	41,90-42,90
Almidón (%)	14,40-17,10
Celulosa (%)	7,20-43,60
Polisacáridos de xilosa, manosa, galactosa (%)	13,00-13,90
Polisacáridos de arabinosa, ramnosa (%)	8,10-9,00
Lignina detergente ácido	15,20-20,40
Ácidos urónicos (%)	15,3

(Adaptado de Bhushan y col., 2008; Dhillon y col., 2012)

Además el bagazo de manzana contiene cantidades significativas de compuestos fitoquímicos que son sustancias fenólicas características y que se muestran en la Tabla 1.6. Dentro de los componentes fenólicos encontrados en el bagazo de

manzana, la familia fenólica predominante fueron los glicósidos de la quercetina seguido por las dihidrochalconas, dos flavonoles: hiperina (273,71 mg/kg en base seca (b.s.) de BM) y avicularina (185,10 mg/kg b.s. de BM) representan más del 50% de flavonoles en el bagazo de manzana, siendo la hiperina el flavonol predominante.

**Tabla 1.6.** Principales componentes fenólicos identificados en el bagazo de manzana

**Procianidinas y Flavonoles**

Procianidina B2  
Epicatequina  
Derivados de quercetina

**Dihidrochalconas**

Floridzina  
Derivados floretina

**Ácidos Benzoicos**

Ácido protocatecuico

**Ácidos Hidroxicinámicos**

Ácido clorogénico  
Ácido cafeico

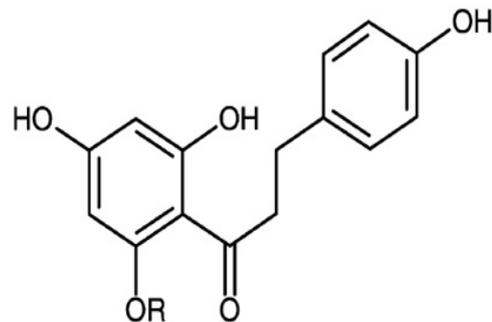
**Flavonoles**

Hiperina  
(Rutina + isoquercetina)  
Reynoutrina  
Avicularina  
Quercitrina

(Adaptado Suárez y col., 2010; Lavelli y Kerr, 2012)

La floridzina y los derivados de la floretina fueron las mayores dihidrochalconas cuantificados con valores del alrededor del 20% (380,05 mg/kg b.s. de BM) y 10% (170,72 mg/kg b.s. de BM), respectivamente, del total de compuestos polifenólicos encontrados en el bagazo de manzana. Los menores componentes encontrados fueron los ácidos fenólicos, epicatequina (88,45 mg/kg b.s. de BM) y procianidina B2 (74,87 mg/kg b.s. de BM), realizando una extracción con acetona (Suarez y col., 2010) En la Figura 1.6. se muestra la estructura química de la floridzina el cual es uno de los principales compuestos polifenólicos presentes en el bagazo de manzana y pertenece al grupo de las dihidrochalconas, a nivel farmacológico ha sido ampliamente estudiada

pues la flordizina bloquea la absorción intestinal de la glucosa mediante la inhibición de los transportadores de glucosa-sodio, jugando un papel clave en el tratamiento de diabetes mellitus (Ehrenkranz y col., 2005).



**Figura 1.6.** Estructura química de la flordizina (R: glucosa). Adaptado Sanchez-Rabameda y col., (2004).

### 1.1.7. Aplicación de fibra dietaria en productos panificados

La literatura contiene numerosos trabajos acerca de la adición de fibra dietaria a productos alimenticios tales como: panes, bebidas, dulces, productos lácteos, carnes pastas y sopas (Elleuch y col., 2011). Por lo general la fibra dietaria se incorpora en productos de panadería para prolongar la frescura, gracias a su capacidad para retener agua, reduciendo así las pérdidas económicas. La fibra puede modificar el volumen del pan, su elasticidad, la suavidad de la miga y su firmeza (Wang y col., 2002; Sangnark y Noomhorm, 2004). Como regla general la incorporación de fibras en panificados reduce el volumen del pan e incrementa la firmeza, pero el grado de modificación depende de la fuente de fibra. Existen diferentes alternativas que pueden mejorar la calidad del pan cuando se adiciona fibra, por ejemplo el tratamiento enzimático de las fibras (Laurikainen y col., 1998), el tratamiento de materiales lignocelulósicos con peróxido de hidrógeno y la utilización de diferentes fracciones de fibra obtenidas por molido (Gould et al., 1989; Sangnark y Noomhorm, 2003). Como ejemplo, los panes elaborados con fibra de caña de azúcar de menor tamaño de partícula, fueron más blandos y elásticos que los de las fibras con tamaño de partícula más grande, además la mayoría de las características organolépticas tales como color, olor y sabor se favorecieron con la reducción del tamaño de partícula (Sangnark y Noomhorm, 2004).

Praznik y Filipiak-Florkiewicz (2002) informaron que la calidad sensorial del pan enriquecido con polvo proveniente de tubérculos de papa (*Helianthus tuberosus*) rico en fibra soluble (inulina) resultó mejorada en comparación con el pan común o tradicional. Cuando se suplementaron muffins con fibra dietaria de durazno y masa para torta con fibra proveniente del cladodio (tallo) de opuntia con niveles hasta del 5% se obtuvieron puntuaciones sensoriales tan aceptables como con el control (Grigelmo-Miguel y col., 1999; Ayadi y col., 2009).

Otros estudios, en panes libres de gluten, han demostrado que la adición de fibra dietaria de maíz y de avena en formulaciones libres de gluten, dieron productos con volúmenes significativamente mayores y migas más blandas en comparación con el control (pan libre de gluten sin fibra), mejorando así su aceptabilidad (Sabanis y col., 2009).

## **1.2. Productos panificados libres de gluten**

El aumento en número de personas diagnosticadas con enfermedad celíaca junto con una creciente demanda de alimentos saludables con aceptables atributos de sabor, ha dado origen a un nuevo tipo de productos panificados elaborados con cereales diferentes al trigo. Sin embargo la remoción total del gluten en las formulaciones de estos panificados conduce a mayores desafíos tecnológicos en la elaboración de los productos levados, debido a que las proteínas del gluten están relacionadas con la absorción de agua, cohesividad, extensibilidad, elasticidad, tolerancia al mezclado y capacidad para retener gas de la masa (Lazaridou y col., 2007; Wieser, 2007).

El gluten está compuesto por dos fracciones proteicas: las gliadinas que contribuyen fundamentalmente a la viscosidad y extensibilidad de la masa en el sistema y las gluteninas, responsables de la tenacidad y elasticidad de la masa (Hüttner y Arendt, 2010). La combinación de estas dos fracciones proteicas da como resultado una estructura distintiva, que es crucial para desarrollar la textura y características de la miga del pan de trigo (Faubion y Hosney, 1990). Además, la matriz sólida de la miga también incluye una fase continua de almidón gelatinizado, atrapado por la red del gluten. En contraste, las masas libres de gluten carecen de una red proteica con estas características (Hüttner y Arendt, 2010). Por otro lado, la suplementación de la masa de pan sin gluten con otros ingredientes o aditivos resulta difícil, puesto que la estructura es más débil a la que presenta una masa normal de pan de trigo, la cual posee la red de gluten (Korus y col., 2009).

En el mercado se pueden encontrar diferentes productos panificados libres de gluten; sin embargo, éstos suelen ser de una calidad inferior a sus contrapartes con gluten (Arendt y col. 2002; Gujral y col., 2003). En la actualidad, numerosos estudios han sido realizados para investigar las propiedades de harinas de distintos cereales sin gluten (Gujral y col., 2003; Schober y col., 2005), derivados lácteos (Gallagher y col., 2003a, b), hidrocoloides (Moore y col., 2004; Lazaridou y col., 2007) y enzimas (Gujral y Rosell, 2004; Renzetti y col., 2010) para mejorar el volumen, la textura de miga, la calidad global y la aceptabilidad de los panes libres de gluten.

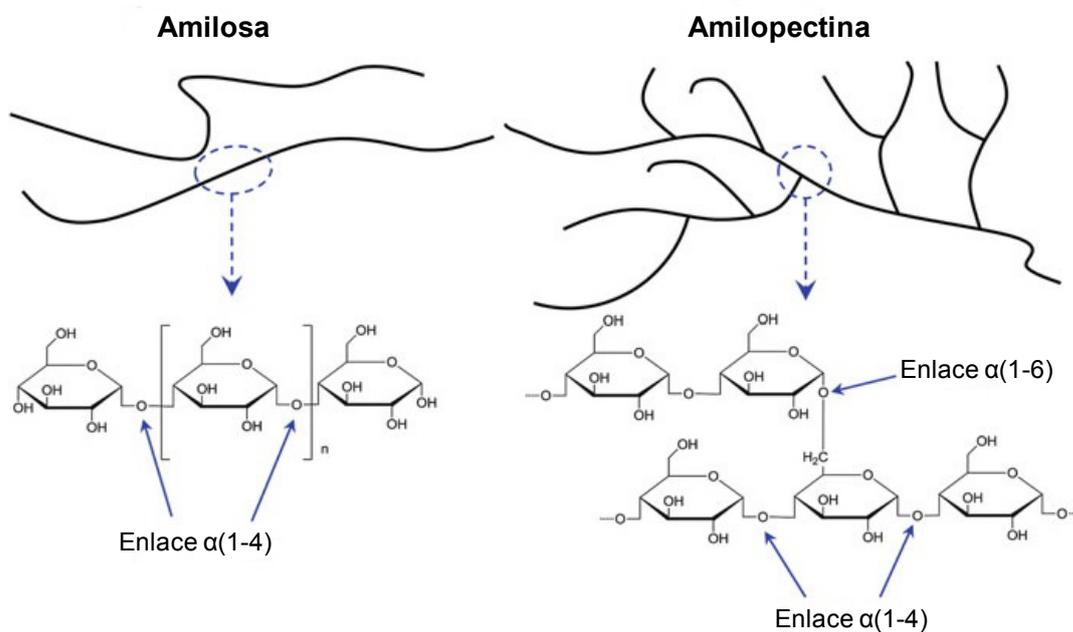
### **1.2.1. Harinas libres de gluten y almidones**

En los años recientes, se han publicado numerosos trabajos que muestran los resultados del empleo de diferentes materias primas sobre la calidad de productos panificados libres de gluten. Estos productos deben elaborarse sin utilizar harinas que contengan prolaminas, a las que los pacientes celíacos son susceptibles, es decir sin trigo, avena, cebada, centeno (“sin T.A.C.C.”) (Asociación Celiaca Argentina). Las harinas libres de gluten que se utilizan normalmente para la elaboración de estos productos son: la harina de arroz, ya sea refinada o integral; la harina de maíz, de sorgo, avena, trigo sarraceno, amaranto, quinua y tef (Zannini y col., 2012).

#### **1.2.1.1. Componente mayoritario de las harinas: Almidón**

En su gran mayoría las harinas o formulaciones empleadas para panificados libres de gluten, están compuesta por almidón, por esto conocer sus características y como interactúa con otros componentes es fundamental para comprender mejor una matriz libre de gluten. El almacenamiento de energía en las semillas de cereales se realiza a través del almidón. La cantidad de almidón que contiene el grano es variable, pero generalmente está entre el 60 y el 75% del peso del mismo. En las plantas, el almidón se encuentra organizado en forma de gránulos, en general formados dentro de amiloplastos. En cereales como trigo, maíz, cebada, centeno, sorgo y mijo, cada amiloplasto contiene un único gránulo (gránulos simples). En arroz y avena, por el contrario, poseen varios gránulos por cada amiloplasto (gránulos compuestos). Por tanto, gran parte de los alimentos que consume el hombre están constituidos por almidón, el cual como se mencionó anteriormente es una excelente fuente de energía. Al mismo tiempo de ser utilizado como fuente energética, el almidón es empleado en la industria alimentaria por el efecto que éste ejerce sobre las propiedades físicas de los alimentos.

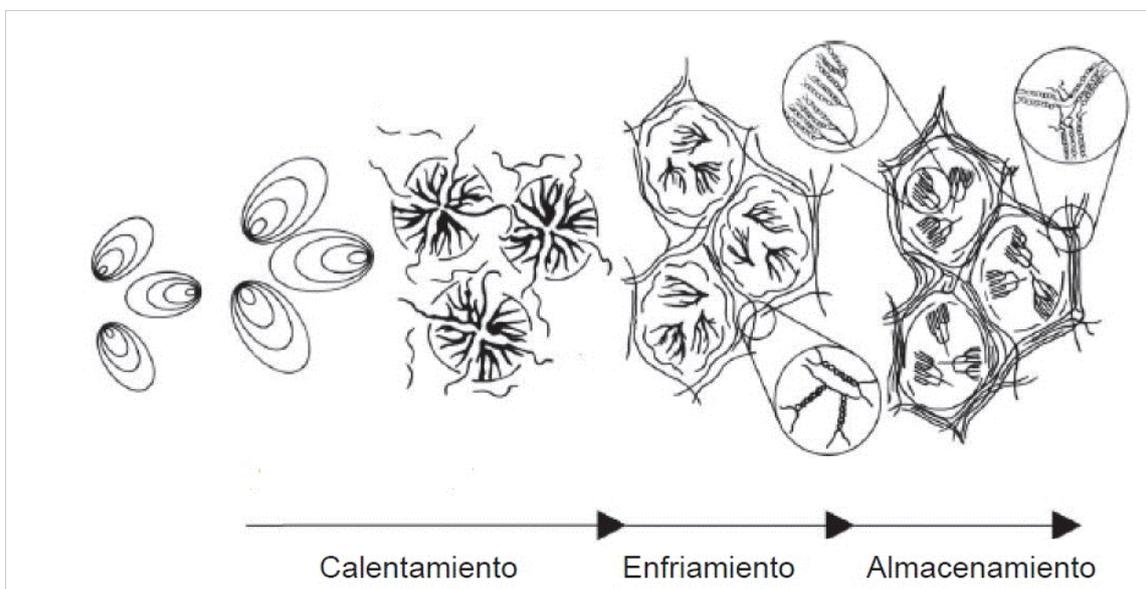
Desde el punto de vista estructural, los mayores componentes del almidón son dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es esencialmente una molécula lineal, formada por residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4), (Figura 1.7.) con un grado de polimerización que se encuentra en el rango de 500-6000 residuos de glucosa. Por otra parte la amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada con un grado de polimerización que se encuentra entre  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^6$  residuos de glucosa y se encuentra formada por cadenas de residuos de glucosa unidos a través de enlaces  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4); estas cadenas se unen a través de enlaces  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6), generándose de este modo una estructura ramificada como se puede observar en Figura 1.7. (Goesaert y col., 2005; Arendt y col., 2008). La relación amilosa/amilopectina difiere entre los diferentes almidones, pero generalmente los niveles de amilosa y amilopectina son 25-28% y 75-72% respectivamente. Sin embargo, algunos genotipos mutantes de maíz, cebada y arroz contienen un nivel mayor de amilosa (hasta 70%) o un incremento de amilopectina (almidones céreos con 99-100% amilopectina). El almidón está presente a nivel intracelular como gránulos insolubles en agua, de diferentes formas y tamaños dependiendo de la fuente botánica (Goesaert y col., 2005).



**Figura 1.7.** Estructura de la amilosa y amilopectina (adaptado Xie y col., 2014)

Las moléculas de amilosa y amilopectina se encuentran dentro del gránulo ordenadas de forma radial. Los gránulos contienen regiones cristalinas y no cristalinas (amorfias) en capas alternadas (BeMiller y Whistler, 1993). Cuando los gránulos de almidón

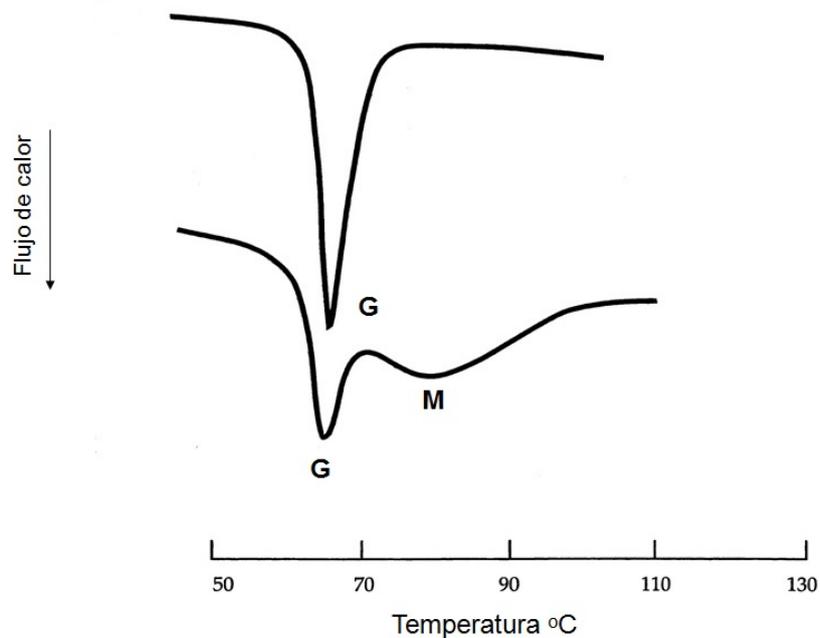
nativo son calentados en agua, su naturaleza semicristalina y arquitectura tridimensional se alteran gradualmente, dando como resultado una transición de fase desde una estructura granular ordenada a un estado desordenado en agua, a este proceso se le conoce como gelatinización. El proceso de gelatinización es esquematizado en la Figura 1.8. La gelatinización es un proceso irreversible que incluye en un amplio sentido, en una secuencia de tiempo /temperatura, hinchamiento granular, fusión cristalina (perdida de birrefringencia cuando se observa bajo microscopio de luz polarizada), y solubilización molecular (Xie y col., 2014). El calentamiento continuado de los gránulos de almidón en un exceso de agua resulta en un mayor hinchamiento de los gránulos, lixiviación adicional de componentes solubles (amilosa principalmente) y, eventualmente, si se aplican fuerzas de cizalla, disrupción total de los gránulos. Este fenómeno resulta en la formación de una pasta de almidón. El hinchamiento de los gránulos y la disrupción da lugar a una masa viscosa (pasta) que consiste en una fase continua de amilosa y /o amilopectina solubilizadas y una fase discontinua de restos de gránulos. El enfriamiento de una pasta de almidón de maíz caliente resulta en la formación de un gel rígido, firme y viscoelástico.



**Figura 1.8.** Mecanismo de gelatinización del almidón (adaptado Goesaert y col., 2005)

Debido a que la gelatinización del almidón es un proceso endotérmico, es muy utilizada la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), que mide tanto la temperatura como la entalpia de gelatinización. En el proceso de gelatinización el agua

actúa como un plastificante, si la gelatinización ocurre con un exceso de agua, esta penetra principalmente por la regiones amorfas del almidón, con el con el simultaneo hinchamiento de los gránulos, este hinchamiento desestabiliza los cristales de amilopectina y se puede observar una única endoterma correspondiente al proceso de gelatinización (pico G) (Figura 1.9.). Si se está en condiciones de agua limitante, el proceso anterior también es cierto, aunque el agua no es suficiente para que la gelatinización ocurra por completo, bajo estas condiciones, los cristales remanentes funden cuando se alcanzan temperaturas mayores (pico M). Por tal razón la cantidad de agua disponible en el sistema juega un papel determinante, para suspensiones de almidón en 60% (p/p) de agua, se puede ver una única endoterma, mientras que el área de G disminuye a medida que disminuye la cantidad de agua y al mismo tiempo aumenta el área de M (Donovan, 1979; Biliaderis y col., 1980).



**Figura 1.9.** Endotermas modelo obtenidas para el almidón de papa, con exceso de agua (superior) y en restricción de agua (inferior) (adaptado Donovan, 1979).

#### 1.2.1.2. Almidones utilizados en panificados sin T.A.C.C.

Los almidones son ampliamente utilizados por la industria alimentaria para gelificar, espesar, retener la humedad, emulsionar, formar películas y brindar textura adecuada en diversos productos. En la masa panaria pueden absorber el agua y contribuir significativamente a la textura, apariencia y aceptabilidad global de productos

horneados (Ward y Andon 2002; Miyazaki y col. 2006). Durante el horneado, los gránulos de almidón gelatinizan, es decir, se hinchan y son parcialmente solubilizados, pero aún mantienen la estructura granular intacta (Hug-Iten, 2000; Hug-Iten y col., 2001). La gelatinización del almidón podría jugar un importante papel en las formulaciones libres de gluten, debido a la habilidad de las pastas de almidón para atrapar burbujas de aire, que ayuda a la capacidad de retención del gas del batido (Zannini y col., 2012). Los almidones de maíz, mandioca, batata, sorgo, arroz, se puede utilizar en productos libres de gluten. Si bien ha sido objeto de estudio en productos sin T.A.C.C., el almidón aislado del trigo no es recomendable debido a que muchos pacientes celíacos son sensibles incluso a muy pequeñas cantidades de gliadinas que pueden subsistir después del aislamiento de este almidón (Lohiniemi y col., 2000). El almidón de arroz es un ingrediente básico en panes libres de gluten debido a su bajo contenido en sodio y alta digestibilidad (Gallagher y col., 2002). Los almidones de maíz y mandioca pueden impartir sabores inusuales a los panes libres de gluten (Sanchez y col., 1996). Se necesitan más estudios para comprender mejor el impacto de los diferentes tipos de almidón y sus propiedades funcionales en productos libres de gluten.

## **1.2.2. Otros ingredientes**

### **1.2.2.1. Proteínas**

#### **Proteínas lácteas**

Las principales fracciones proteicas empleadas en la industria de alimentos son las caseínas y las proteínas del suero, las cuales se obtiene a partir de leche descremada. El uso de la leche descremada asegura que el contenido de grasa es lo suficientemente bajo para minimizar los defectos de sabor derivados del deterioro de lípidos. Respecto a las proteínas lácteas presentes en bovinas alrededor del 20% pertenecen a un grupo de proteínas conocidas como proteínas del suero, a escala industrial se pueden obtener diferentes productos enriquecidos con proteínas del suero, utilizando ultrafiltración o cromatografía de intercambio iónico se puede variar la cantidad de lactosa presente en este tipo de productos (Stathopoulos, 2008).

En productos horneados libres de gluten, los ingredientes lácteos forman redes que mejoran el sabor y color de la corteza, permiten mejorar la textura, reducir el envejecimiento y aumentar la absorción de agua, y por lo tanto mejorar las propiedades de manipulación de batidos (Arendt y col., 2008). Los panes libres de

gluten con almidón de trigo preparados con caseinato de sodio y proteína láctea han presentado mejoras en la forma y volumen, una miga más firme, un atractivo color blanco, y mejores puntajes sensoriales. Sin embargo, batidos y panes que contienen proteína de suero presentaban deficiencias en la mayoría de las características evaluadas (Gallagher y col. 2003 a). En contraste, Nunes y col. (2009) mostraron que la inclusión de proteína de suero en el pan sin gluten inducía un volumen más alto en comparación con los que tenían esta proteína y caseinato de sodio. Moore y col. (2004) observó que las formulaciones que contenían productos lácteos tuvieron mejor desempeño después de dos días de almacenamiento que otras formulaciones libres de gluten. Las micrografías de la miga de pan de los panes libres de gluten con productos lácteos añadidos mostraron estructuras de red que se asemejan más a las de pan tradicional trigo. A pesar de las mejoras funcionales observadas con el uso de productos lácteos en formulaciones libres de gluten, esta fuente de proteína tiene un inconveniente significativo para el uso en este tipo de productos. El daño que causa la enfermedad celiaca en las vellosidades intestinales suele conducir a una intolerancia a la lactosa (Bodé y Gudmand-Høyer, 1988). Por lo tanto, el uso de las proteínas de la leche debería en lo posible limitarse.

### **Proteínas de huevo (clara)**

El huevo entero de gallina o sus constituyentes son ingredientes claves asociados con características sensoriales únicas y una excelente funcionalidad para aplicaciones industriales. Durante la elaboración de diferentes productos alimenticios los constituyentes del huevo pueden funcionar como emulsionantes o/y agentes espumantes, así como formadores de estructura de red. La yema de huevo se utiliza principalmente para la formación de una emulsión cuya estabilidad dependerá de la capacidad de los constituyentes para adsorber en la interfase aceite-agua. Por otra parte la clara de huevo es conocido por ser un buen agente de formación de espuma y su principal componente es la ovoalbúmina la cual ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales y su estabilidad térmica (Ibanoglu y Erçelebi, 2007).

Las proteínas del huevo forman fuertes películas viscoelásticas cohesivas, que son esenciales para la formación de una espuma estable (Ibanoglu y Erçelebi, 2007) y una mejor retención de gas (Zannini y col., 2012). La albúmina de huevo en combinación con metilcelulosa y goma arábiga mejora la miga en panes libres de gluten en cuanto a los parámetros sensoriales: dureza percibida al primer bocado, adherencia, masticabilidad y cohesión (Toufeili y col. 1994). Por lo tanto, mejora la calidad general.

En panes libres de gluten en donde se utilizó tanto proteínas de huevo (huevo en polvo) como la enzima transglutaminasa (TGasa), se aumentó la capacidad de retención de agua del pan libre de gluten y forman una red de proteína similar a la encontrada en el pan de trigo. El pan resultante muestra pérdidas de cocción más bajas y aumento de la humedad de la miga, finura, luminosidad y homogeneidad (Moore y col. 2006). Por lo tanto, el huevo puede aportar estructura en los productos libres de gluten y puede añadir una mejora a nivel nutricional, necesaria en estos productos.

### **Otras proteínas utilizadas**

#### **Soja**

Se ha estudiado el efecto de aislado proteico de soja adicionado en diferentes cantidades a formulaciones de panes libres de gluten basadas en almidón de trigo. Comparando con un control, los panes con soja mostraron una mejoría notable en textura pasando de una miga irregular, desmenuzable, de estructura abierta en su interior, a una estructura más uniforme, cerrada, con una compacta estructura alveolar (Ranhotra y col., 1975). Sin embargo el agregado de elevados niveles de soja afectó severamente la calidad de panes libres de gluten. Otros autores han ensayado una pequeña cantidad de soja (0.5%) adicionada a formulaciones con almidón de maíz, mandioca y harina de arroz y observaron un incremento del volumen específico, una textura más uniforme y mejores puntajes sensoriales (Sanchez y col., 2002). La actividad enzimática (U) de harinas de soja ( $768 \pm 29$  U/g) mejora el volumen y la estructura en panes libres de gluten frente a harinas de soja inactivadas, este efecto es debido tanto a las proteínas estructurales como a la mencionada actividad enzimática; además el tamaño de la partícula y la concentración de la harina de soja también afectan la calidad de los panes (Ribotta y col., 2004). En conclusión las proteínas de soja son apropiadas para las formulaciones libres de gluten, pues con ellas se pueden superar principalmente, problemas relacionados con la textura.

#### **Zeína (proteína del maíz)**

La prolamina del maíz (zeína), recientemente se ha ensayado en las formulaciones de panes libres de gluten con buenos resultados (Schober y col., 2008). La zeína, combinada con almidón de maíz y agua, puede formar masas viscoelásticas parecidas a las masas de harina de trigo, para que formen una masa con características similares a la harina de trigo estas masas deben prepararse en temperaturas

superiores a 25°C (Lawton, 1992), y al adicionar hidrocoloides como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) se encontraron mejoras en el volumen del pan (Schober y col., 2008; Andersson y col., 2011). La combinación de zeína con HPMC en formulaciones de pan libres de gluten con almidón de maíz produjo panes con una mejora notable en el volumen y forma (Schober y col., 2010). Las modificaciones en la zeína como por ejemplo preparar las masas por encima de 40°C (temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea de la zeína), junto a diferentes condiciones de proceso posiblemente pueden mejorar la reología de los productos libres de gluten.

### **1.2.2.2. Agua**

El agua afecta el comportamiento reológico de los batidos y la calidad del pan en formulaciones libres de gluten (Arendt y col., 2008). La expansión de la masa y la retención del gas durante el desarrollo del proceso requieren de una matriz elástica. Si la proporción de agua es demasiado baja, la masa se convierte en quebradiza sin consistencia y exhibe un marcado efecto de corteza debido a la rápida deshidratación en la superficie. Por el contrario si la proporción de agua es demasiado alta, la viscosidad del batido es baja, resultando poca o ninguna resistencia a la deformación (Arendt y col., 2008). La gelatinización del almidón y otras reacciones que ocurren durante el horneado son afectadas por el agua. De este modo el agua regula, la blandura de la miga, la crujencia de la corteza, la vida útil y otras propiedades de la textura (Wagner y col. 2007). Las formulaciones libres de gluten con un nivel de agua adicional de 10%-20%, generan un mayor volumen de pan, suavidad en la corteza y textura de la miga (Gallagher y col., 2003; McCarthy y col., 2005.) Schober y col. (2005) estudiaron las propiedades reológicas de miga y batidos en panes libres de gluten de sorgo, variando el contenido de agua (95% -120%) mientras se mantiene constante el contenido de almidón (30% de almidón de maíz). Utilizaron la metodología de superficies de respuesta para evaluar la influencia de tres factores, agua, goma xántica y leche en polvo descremada. El volumen específico claramente aumento cuando se incrementó el nivel de agua, y por el contrario descendió cuando se incrementó el nivel de goma xántica. El efecto de la leche en polvo fue menos obvio. La cantidad de agua y la cantidad de hidrocoloide tiene impacto directo en la textura. Niveles de HPMC (0.5%) y agua (hasta alcanzar la consistencia óptima de 500 unidades Brabender) produjeron panes libres de gluten de buena calidad (Barcenas y Rosell, 2005). Los hidrocoloides limitan la difusión y la pérdida de agua de la miga del

pan de acuerdo con Barcenas y Rosell (2005); en panes con trigo disminuye la velocidad de endurecimiento y retarda la retrogradación de la amilopectina, lo cual a su vez retrasa el envejecimiento del pan. Por lo tanto el contenido de agua y su movilidad pueden ser factores claves para el control del volumen y la firmeza de la miga en los panes.

### **1.2.3. Principales aditivos en panes libres de gluten**

#### **1.2.3.1. Aditivos**

Según el Código Alimentario Argentino un aditivo alimentario se define como: “cualquier sustancia o mezcla de sustancias que directa o indirectamente modifiquen las características físicas, químicas o biológicas de un alimento, a los efectos de su mejoramiento, preservación, o estabilización, siempre que: a) Sean inocuos por sí mismos o a través de su acción como aditivos en las condiciones de uso. b) Su empleo se justifique por razones tecnológicas, sanitarias, nutricionales o psicosensoriales necesarias. c) Respondan a las exigencias de designación y de pureza que establezca este Código.”

Con el fin de obtener productos panificados libres de gluten de buena calidad tecnológica y con una vida de anaquel aceptable, se han incorporado una amplia gama de aditivos en formulaciones establecidas a partir de mezcla de harinas y almidones libres de gluten y que son seguros para las personas que sufren enfermedad celiaca, o intolerancia al gluten.

##### **1.2.3.1.1. Hidrocoloides**

Bajo la denominación de hidrocoloides se incluyen diferentes polisacáridos (aunque la definición se puede hacer extensiva a proteínas) solubles parcial o totalmente en agua, que por sus diferencias en estructura química, proveen de un amplio rango de propiedades funcionales y por tal motivo son comúnmente utilizados en la industria de alimentos como agentes gelificantes, espesantes, emulsificantes, estabilizantes, agentes espumantes, inhibidores de sinéresis en los ciclos congelación-descongelación, mejoradores en las propiedades de textura y retención de humedad y para el control de la movilidad del agua (Rosell y col., 2007).

Todos los hidrocoloides interactúan con el agua, reduciendo su difusión. Usualmente los hidrocoloides neutros presentan una menor solubilidad, por su parte los polielectrolitos tienen mayor solubilidad, sin embargo la cinética de hidratación depende de muchos factores; goma xántica, guar y carboximetilcelulosa (CMC), presentan

solubilidad en agua fría, a diferencia de los carragenanos, goma garrofín y muchos alginatos que requieren de agua caliente para una completa hidratación. El agua puede ser retenida específicamente a través de puentes de hidrogeno y estructuración en torno a los grupos funcionales hidrofílicos, o puede ser retenida en los espacios que se forman inter o intramolecularmente (Anton y Artfield, 2008). El remplazo del gluten para la elaboración de panes para dietas sin T.A.C.C. implica un gran desafío tecnológico, pues los batidos libres de gluten tienen una consistencia líquida y la inexistencia de la red proteica dificulta una buena expansión durante el levado. Por lo tanto se requieren materiales poliméricos (hidrocoloides) que brinden las propiedades viscoelásticas necesarias para la elaboración de estos productos (Zannini y col., 2012). Se han empleado diferentes hidrocoloides en la elaboración de panes sin T.A.C.C.; cada uno de ellos presenta características particulares como podemos observar en la Tabla 1.7.

**Tabla 1.7.** Hidrocoloides comúnmente utilizados en panes libres de gluten

Hidrocoloide	Propiedades gelificantes	Efecto en panes libres de gluten
Agarosa	Forma geles por calentamiento	Incrementa el volumen, Disminución de uniformidad de la miga (celdas de gas más grandes)
Goma guar	Soluciones altamente viscosas, no hay propiedades gelificantes	Distribución uniforme de los alveolos en la miga, retrasa el envejecimiento del pan
Goma garrofín	Ligeramente soluble en agua fría, se disuelve en agua a 85°C, forma geles con K-carragenanos y goma xántica	Incrementa el volumen de los panes, retarda el envejecimiento del pan
HPMC	Forma geles por calentamiento, alguna actividad interfacial y habilidad para formar películas	Incremento del volumen específico, mejora la retención del gas y la absorción de agua
Pectina	Pectinas de bajo metoxilo forman geles en presencia de iones de calcio	Incrementan la porosidad de la miga
Goma xántica	Alta viscosidad, soluciones pseudoplásticas, forma geles con k-carragenanos, garrofín	Buena estructura de miga, disminuye volumen específico, incrementa dureza de miga

(Adaptado Hüttner y Arendt, 2010)

Derivados de la celulosa como la (HPMC) y un hidrocoloide de origen microbiano, la goma xántica son los más utilizados, pues son los que reemplazan de manera más exitosa el gluten en panes sin este componente, independientemente de la formulación utilizada (Anton y Artfield, 2008).

#### 1.2.3.1.2. Emulsificantes

Los emulsificantes son aditivos de naturaleza lipídica que funcionan como estabilizantes de la masa, cuando el emulsificante interactúa con la fracción proteica

de la misma, y también como texturizantes de la miga cuando se complejan con el almidón gelatinizado durante el horneado, obteniéndose migas más suaves (Goesaert y col., 2005). Entre los más comúnmente utilizados se encuentran la sal de sodio del éster del ácido esteárico con el ácido láctico (SSL), el éster del ácido acetil tartárico con mono y diglicéridos (DATEM) y la lecitina.

Una de las justificaciones para el uso de los emulsificantes en la industria de productos horneados desde hace más de 60 años ha sido retardar el endurecimiento de la miga (Pisesookbunternng y D'Appolonia, 1983). Este efecto se podría explicar con la habilidad de estos compuestos para formar complejos insolubles con la amilosa durante el horneado; este complejo no participaría en la recristalización del almidón. Asimismo, los emulsificantes disminuyen la absorción de agua por parte del almidón y su solubilización durante la gelatinización (Eliasson y Gudmundsson, 1996; Roach y Hosney, 1995). Por tal motivo, la movilidad de los polímeros que constituyen el almidón se ve limitada, así como también la lixiviación de la amilosa, resultando un menor grado de recristalización durante el almacenamiento (Gray y BeMiller, 2003). La eficiencia de los diferentes emulsificantes para retardar el endurecimiento de la miga está estrechamente relacionada con su estructura química, que determina características importantes como su balance hidrófilo-lipófilo (BHL) y su potencial de ionización (Stampfli y Nersten, 1995; Armero y Collar, 1998). El balance o equilibrio hidrófilo-lipófilo es una medida del grado en el que el compuesto es hidrófilo o lipófilo siendo los de BHL bajos (<9) los más lipófilos y los de BHL altos los más hidrófilos. El potencial de ionización es la energía mínima necesaria para separar un electrón de la molécula. Estas propiedades influyen en la interacción del emulsificante con las proteínas y los gránulos de almidón intactos, o los polímeros que lo constituyen (amilosa y amilopectina). El SSL posee un BHL de 8,3. Por otro lado, el DATEM tiene un BHL de entre 8,5 y 9. Por otra parte el DATEM es más hidrófilo comparado con los mono o diglicéridos y la lecitina.

Otro beneficio adicional de los emulsificantes es ayudar a la masa a tolerar mejor el trabajo realizado sobre ella durante el batido y la fermentación (Goesaert y col., 2005), y mejorar la estructura de la miga, obteniéndose un alveolado más fino y uniforme (Stampfli y Nersten, 1995). Además, retienen también el aire incorporado durante el batido, y disminuyen su liberación durante el horneado (Daniels y Fisher, 1976).

Onyango y col. (2009) evaluaron el efecto de diferentes emulsionantes sobre el endurecimiento de la miga en panes libres de gluten elaborados a partir de almidón pregelatinizado de mandioca y harina de sorgo. Estos autores encontraron que todos

los emulsionantes disminuyeron el endurecimiento de la miga, y obtuvieron mejores resultados mediante la incorporación de DATEM (ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico) y SSL (estearoil 2-lactilato de sodio). Nunes y col. (2009) evaluaron el impacto de diferentes emulsificantes en los batidos y panes libres de gluten, encontrando que el tiempo de vida útil de la miga de pan se incrementaba significativamente con altos niveles de SSL.



## **HIPOTESIS**

Es ampliamente reconocido que la fibra dietaria juega un importante papel en la salud humana, y que su ingesta en las dietas occidentales suele estar por debajo de los niveles recomendados. Actualmente hay más conciencia sobre esta deficiencia alimentaria por parte de consumidores y fabricantes de alimentos por lo que hay un espectro mayor de productos ricos en fibra disponibles. Asimismo, se ha incrementado la investigación sobre diferentes fuentes alternativas de fibra, en particular subproductos de la industria hortofrutícola. El bagazo de manzana es un subproducto de la industria de jugos, rico en fibra tanto soluble como insoluble, que se encuentra subutilizado como ingrediente alimenticio y que podría constituir un buen recurso para el enriquecimiento de los alimentos.

Un ejemplo de productos que suelen tener niveles bajos de fibra son los panificados libres de gluten en los que la harina de trigo es generalmente reemplazada por almidones comerciales, que no contribuyen significativamente al contenido de fibra dietaria. Esta matriz representa además un desafío tecnológico ya que al carecer de gluten es necesario estructurarla con diferentes ingredientes y aditivos. Además, la incorporación de fibra suele conducir a productos de inferior calidad tecnológica y sensorial.

Se plantea entonces como hipótesis que es posible ampliar el espectro de utilización de un subproducto agroindustrial como el bagazo de manzana mediante su acondicionamiento con un mínimo procesamiento, para su incorporación en matrices deficientes en fibra como los panes libres de gluten, obteniendo productos de adecuada calidad tecnológica y sensorial.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una formulación saludable y sensorialmente aceptable de un producto panificado a partir de ingredientes y aditivos libres de gluten, adicionado con bagazo de manzana, rico en fibra dietaria.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar químicamente el bagazo de manzana proveniente de la industria de jugos.

Evaluar la potencialidad del bagazo de manzana como ingrediente aprovechable, con mínimo procesamiento, en productos panificados libres de gluten.

Evaluar el efecto de la adición de diferentes cantidades de bagazo de manzana (rico en fibra dietaria insoluble) sobre las características fisicoquímicas y reológicas de los batidos y la calidad de los panes libres de gluten.

Estudiar las interacciones que se establecen entre los componentes del sistema: proteína-fibra, almidón-fibra.

Evaluar la composición y características sensoriales del producto desarrollado, en particular en lo que respecta al contenido de fibra.



# **Capítulo 2**

## **Materiales y Métodos**



## 2.1. Materiales

### 2.1.1. Bagazo de manzana

El bagazo de manzana (BM) fue provisto por la empresa Jugos S.A (Villa Regina, Río Negro); fue obtenido como subproducto en el procesamiento descrito en la sección (1.1.6), utilizando manzanas cosechadas en el Alto Valle de las variedades: Red Delicious, Granny Smith, Golden Delicious, Royal Gala.

Este material fue enviado inmediatamente después de obtenido y congelado para su preservación durante el traslado desde la empresa al CIDCA, donde se le realizó el tratamiento respectivo para obtener BM deshidratado. Se trabajó con tres cosechas diferentes 2010, 2012, 2014. Las cosechas tuvieron lugar en el mes de marzo, las manzanas son almacenadas por los productores y la empresa las recibe inmediatamente antes de la obtención del jugo. Los envíos de BM húmedo se realizaron entre los meses de mayo y julio.

### 2.1.2. Harina y fécula utilizada

Se utilizaron harina de arroz (HA), y fécula de mandioca (FM) (KAPAC, Alimentos Específicos S.A., Olavarría, Argentina) se obtuvieron en el comercio local identificadas como productos libres de gluten.

La harina de arroz tiene la siguiente composición según rótulo del fabricante: hidratos de carbono 82,0%, proteínas 4,2%, fibra alimentaria 1,6%, lípidos 1,6%, sodio 6mg/100g.

La fécula de mandioca contiene 90,0% hidratos de carbono.

Los contenidos de cenizas y humedad para la harina y fécula utilizadas se determinaron siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.2.2. de la presente tesis, el contenido de cenizas para la HA fue de  $0,42 \pm 0,13$  % y su humedad  $10,52 \pm 0,83$ %, para el caso de la FM el contenido de cenizas que se determinó fue de  $0,42 \pm 0,06$  % y la humedad de  $9,82 \pm 0,69$  %).

### 2.1.3. Fuentes proteicas

Como fuente de proteína se ensayaron para las formulaciones preliminares: suero de leche deshidratado bajo en lactosa (Lacprodan 80, Adama S.A), suero de leche microparticulado (Simplese, CP Kelko), leche en polvo (Svelty 0 % grasa-libre de gluten, Nestle) y clara de huevo deshidratada CH (Ovobrand, Argentina).

#### **2.1.4. Hidrocoloide**

Se utilizó hidroxipropilmetilceluosa del tipo HPMC F 4M (HPMC, Dow Chemical Company, Estados Unidos). La HPMC tiene las siguientes características según lo informado por el fabricante: 29,3% de sustitución de grupos metoxilo, 6,0% de grupos hidroxipropilo, la viscosidad a 20°C de una solución acuosa al 2% fue de 4477 cP (USP). Se ha utilizado también en ensayos preliminares carboximetilcelulosa (CMC, Latinquímica-Amtex S.A.). Sus características son: grado de sustitución con grupos carboximetilo, 0,9%, viscosidad de una solución al 1% a 25°C: 3640 cP.

#### **2.1.5. Otros ingredientes**

Los otros ingredientes utilizados para la preparación de los panes fueron: margarina (DANICA, Danica Dorada S.A., Argentina) como fase grasa, polvo para hornear como leudante químico (ROYAL, Kraft Foods, Argentina), azúcar (LEDESMA, Argentina) y levadura fresca (CALSA, Argentina), todos obtenidos en el comercio local. También se utilizó estearoil-2-lactilato de sodio (SSL) como emulsionante (DANISCO, Copenhagen, Dinamarca).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Secado y esterilización del bagazo de manzana (tratamiento preliminar)**

Se secó a 50°C en una estufa con convección forzada (GMX 9203A PEET LAB, Estados Unidos), se molió en un molino de martillo de escala piloto (Pulverisette 16, FRITSH, ALEMANIA), luego se tamizó en una criba de malla de 250 µm con el objeto de obtener un producto de granulometría uniforme y adecuada, después de este procedimiento el BM fue esterilizado a 121°C, durante 20 minutos para eliminar la flora natural (principalmente levaduras y mohos) y de esta manera prevenir fermentaciones no deseadas en el periodo de fermentación durante el proceso de panificación.

#### **2.2.2. Caracterización físico química de los materiales**

##### **2.2.2.1. Humedad**

La determinación de humedad se realizó a través del método indirecto. Este método se basa en determinar el agua a partir de la pérdida de peso de la muestra calentada a temperatura constante. Para la FM y HA Se realizó según método AACC 44-19 (2000),

en el cual la muestra ( $3 \pm 0,001$ ) g se seca en estufa (San Jor, Argentina) durante dos horas a  $135^{\circ}\text{C}$ . Para el resto de los componentes se utilizó una temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$ , hasta peso constante. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso medido antes y después del calentamiento de la muestra. El ensayo se realizó por triplicado.

La humedad ( $H$ ) se calculó utilizando la ecuación 2.1 (Ec. 2.1)

$$\% H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde:

$m_0$  = masa de cápsula de Petri vacía (g)

$m_1$  = masa de cápsula de Petri con la muestra húmeda (g)

$m_2$  = masa de cápsula de Petri con sólidos luego del secado (g)

### 2.2.2.2. Cenizas

Se determinó el contenido de cenizas ( $C$ ) empleando método directo según AACC 08-01 (2000) basado en la calcinación completa de la materia orgánica, quedando las cenizas en el residuo, se utilizó una mufla INDEF 331 (HORNOS ELECTRICOS S.A., Argentina). Se pesaron ( $5 \pm 0,0001$ ) g de harina en cápsula de porcelana previamente calcinada y pesada. Se carbonizaron con mechero en triángulo de pipa y luego se calcinaron a  $550^{\circ}\text{C}$  hasta obtención de residuo blanquecino y peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

El calculó el contenido de cenizas utilizando la ecuación 2.2 (Ec. 2.2)

$$\% C = \frac{m_1 - m_0}{m} * 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde:

$m_0$  = masa de capsula de porcelana vacía (g)

$m_1$  = masa de cápsula con residuo inorgánico obtenido luego de calcinar la harina (g)

$m$  = masa de harina (g)

### 2.2.2.3. Proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Kjeldahl, de acuerdo con el método AOAC 920.52. En este método se determina el contenido de nitrógeno total. La digestión de la materia orgánica se realiza con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado p.a., en presencia de la mezcla catalizadora  $\text{K}_2\text{SO}_4$  anhidro p.a. y  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en

relación 10:1 en un digestor (BÜCHI K-435, Suiza). Una vez finalizada esta etapa se procedió a la liberación del amonio formado como amoníaco, empleando NaOH 32% p/v en un equipo semiautomático (BÜCHI K-350, Suiza); el amoníaco fue destilado sobre 50 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4% p/v en presencia de indicador de Mortimer. Se valoró directamente el borato de amonio formado utilizando HCl 0,1032 N. Se realizó un blanco para evaluar la posible presencia de compuestos nitrogenados en los reactivos empleados.

El porcentaje de proteína se calculó empleando la ecuación 2.3 (Ec. 2.3):

$$\% P = \frac{V_m - V_b}{m} * f * N_{HCL} * P_{meq} * 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde:

V<sub>m</sub> = volumen de HCl gastados en la titulación de la muestra (mL)

V<sub>b</sub> = volumen de HCl gastados en la titulación del blanco (mL)

N<sub>HCl</sub> = normalidad del HCl

P<sub>meq</sub> = peso miliequivalente del nitrógeno (g/meq)

m = masa de la muestra (g)

f = factor de conversión g proteína/g nitrógeno.

Para estimar el contenido de proteínas se multiplicó el porcentaje de nitrógeno por el factor de conversión f = 5,64 g proteína/g nitrógeno, usualmente empleado frutas (Levey y col. 2000). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 2.2.2.4. Lípidos

La determinación de lípidos se realizó previa liberación de la fase grasa en medio ácido, siguiendo el método AOAC 922.06. En vaso de precipitado de 100 mL se colocó la cantidad adecuada de muestra, se agregaron 10 mL de HCl (ρ = 1,19) y se calentó a baño de María hasta que las proteínas fueron disueltas. Se dejó enfriar, transfiriendo luego el contenido a una probeta graduada con tapa esmerilada y lavando el vaso de precipitado con unos 10 mL de alcohol etílico en dos porciones. Se agregaron a la probeta 50-60 mL de éter. Luego de dejar en reposo por 24 horas se leyó el volumen de la fase etérea. Se tomó una alícuota exactamente medida y se evaporó el éter en un vaso de precipitado pequeño previamente tarado. Una vez evaporado el éter se pesó nuevamente y se determinó el contenido de lípidos por diferencia, teniendo en

cuenta la alícuota tomada para realizar los cálculos. La determinación se realizó por triplicado.

#### **2.2.2.5. Fibra dietaria total**

Se determinó el contenido de fibra dietaria total (FDT) empleándose el método AOAC 991.43 (enzimático-gravimétrico), utilizando el kit (Megazyme, Irlanda). Se describen a continuación los pasos de este protocolo.

#### **Preparación y limpieza crisoles filtrantes**

Los crisoles filtrantes (Schott, DURAN, Alemania) se calcinaron en la mufla toda la noche a 525 °C, se removió el celite que pudo haber quedado de una determinación anterior (material filtrante) residual, se enjuagó cada crisol con una solución de limpieza 2% (en agua destilada) Micro (International products, corp. Trenton, NJ, Estados Unidos), durante 60 minutos, después se enjuagó el crisol filtrante con agua corriente y agua destilada, para finalmente realizar un enjuague con 15 mL de acetona. Se adicionó 1 g de celite en cada crisol y se secó hasta peso constante a 130 °C, se enfrió cada crisol filtrante en un desecador y se registró el peso del crisol con el celite.

#### **Preparación muestra**

Se pesó  $1 \pm 0,005$  g (por duplicado) de BM en un vaso de precipitado tipo berzelius de 500 mL, se añadieron 40 mL de solución tampón MES/TRIS (pH 8.2), ajustándose el pH cuando resultó necesario.

#### **Incubación con $\alpha$ -amilasa termoestable**

A continuación se añadieron 50  $\mu$ l de  $\alpha$ -amilasa termoestable, se agitó, se cubrió el vaso con papel de aluminio y se llevó a un baño María con durante 30 minutos con agitación constante. Se remueve el papel de aluminio, se limpiaron las paredes del vaso con 10 mL de agua destilada, utilizando una espátula y se enfrió a temperatura ambiente hasta llegar a los 60°C.

#### **Incubación con proteasa**

Se adicionaron 100  $\mu$ l de proteasa a cada muestra, se cubrió el vaso con papel aluminio y se llevó a un baño con agitación a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos contados a partir que el baño alcanzara los 60°C.

### Incubación con amiloglucosidasa

Se removió el papel aluminio, se adicionaron 5 mL de HCl 0,561 N en cada muestra con agitación, se controló el pH el cual debe estar en un rango entre 4,1-4,8. Se adicionaron 200  $\mu$ l de amiloglucosidasa a cada muestra con agitación, se llevó a un baño con agitación a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos contados a partir que el baño alcanzara los  $60^\circ\text{C}$ .

### Precipitación y lavados

En cada muestra se adicionaron aproximadamente 225 mL de etanol al 95%, precalentado a  $60^\circ\text{C}$ , debiendo asegurar que la relación entre el volumen de etanol y volumen de muestra fuera 4:1. Se cubrieron los vasos con papel aluminio y se dejó precipitar a temperatura ambiente por 60 minutos.

Se tomó el crisol filtrante que contiene el celite (previamente tratado), se mojó y se redistribuyó el lecho de celite dentro del crisol utilizando 15 mL de etanol al 78%, se filtró el precipitado de cada vaso con el crisol filtrante, utilizando un kitasato y una bomba de vacío. Utilizando vacío se realizó el lavado sucesivo del residuo utilizando las siguientes cantidades: 15 mL etanol 78% (2 veces), 15 mL etanol 95% (2 veces), y 15 mL acetona (2 veces). Se secó cada residuo contenido en el crisol filtrante a  $103^\circ\text{C}$  durante toda la noche. A uno de los residuos de FD se le determinó el contenido de cenizas incinerando la muestra a  $550^\circ\text{C}$ , y al otro se le determinó contenido de proteínas por el método de Kjeldahl descrito en la sección 2.2.2.3.

La FDT (Ec. 2.5) se calculó como el peso de la fibra dietaria filtrada y secada al que se le descontaron los contenidos de proteínas y cenizas. Estos fueron determinados de acuerdo a los descriptos previamente y calculados según las ecuaciones 2.3 y 2.2, respectivamente

$$\text{FD} = \frac{m_1 - m_0}{m} * 100 \quad \text{Ec. 2.4}$$

$$\text{FDT (\%)} = \text{FD (\%)} - [\text{P (\%)} + \text{C (\%)}] \quad \text{Ec. 2.5}$$

donde:

$m_1$ = masa del filtro junto con el residuo de fibra dietaría (g)

$m_0$ = masa del filtro con celite (g)

$m$ = masa de la harina (g)

### **Fibra cruda**

Se determinó el contenido de fibra cruda (FC) empleándose el método AOAC 962.09 (1998). La fibra cruda es definida como la pérdida por ignición del residuo seco que queda después de digerir la muestra sucesivamente con soluciones de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1,25% e NaOH 1,25% bajo condiciones específicas.

Se trabajó sobre 2 g de material desgrasado, transfiriendo la muestra a un balón de 500 mL evitando la contaminación con fibra de papel o pincel. Se agregaron 200 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,25%, algunos trozos de porcelana y 2 ó 3 gotas de antiespumante. Se conectó el condensador y se hirvió exactamente 30 min, agitando periódicamente para suspender los sólidos adheridos a las paredes. Luego se adicionó NaOH 1,25% y se mezcló. Se conectó nuevamente el condensador y se hirvió durante 30 min exactamente.

Se filtró, lavó con 50 mL de agua caliente, 25 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,25% hirviendo, 3 porciones de 50 mL c/u de agua hirviendo y 25 mL de alcohol, succionando lo más posible después de cada lavado. Se filtró hasta casi sequedad y se colocó el papel de filtro con el residuo sobre un vidrio de reloj en estufa a  $130^\circ\text{C}$  durante 20-30 min, trasvasándose luego a una cápsula de porcelana. Se secó a la misma temperatura el tiempo necesario para completar 2 horas de secado. Se enfrió en desecador y se pesó.

Se llevó a ignición 30 min a  $600^\circ\text{C} \pm 15^\circ\text{C}$ . Una vez calcinada la muestra en la cápsula sólo quedan las sales minerales. La pérdida de peso fue referida a 100 y consignada como fibra cruda.

### **2.2.2.6. Actividad acuosa**

La actividad acuosa ( $a_w$ ), definida como el cociente entre la presión parcial del vapor de agua en equilibrio con el alimento y la presión del vapor de agua pura a una determinada temperatura, se analizó a  $25^\circ\text{C}$ . 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. Este ensayo se realizó por duplicado. Se empleó una solución de sulfato de potasio saturada como estándar de calibración. La determinación se realizó por triplicado.

### **2.2.2.7. Determinación de tamaño de partícula**

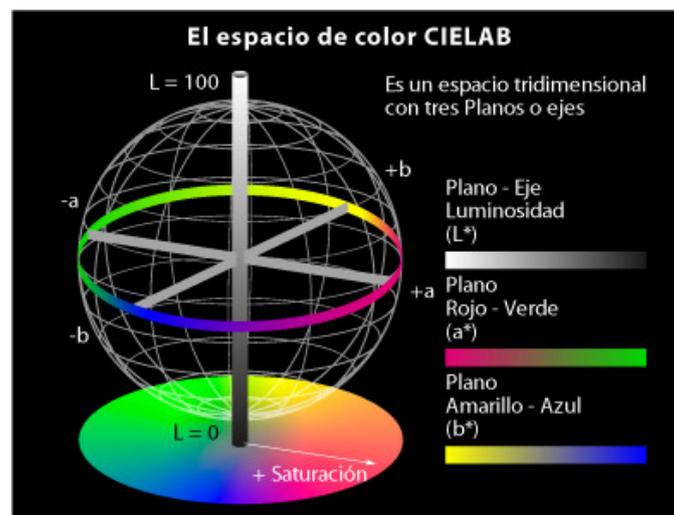
El tamaño de partícula del bagazo molido y tamizado, se determinó a través de la técnica de dispersión de la luz utilizando un equipo MASTERSIZER 2000E provisto de una unidad de dispersión HYDRO 2000 MU (Malvern Instruments, Reino Unido). El material fue dispersado en una solución de etanol-agua (70:30), con una relación de

0,5 g de bagazo de manzana y 4,5 g de solución. El índice de refracción de la solución fue de 1,367. La velocidad de la bomba fue de 1800 r.p.m. El tamaño de partícula se informó como diámetro de Sauter, definido como el diámetro de una esfera que tiene la misma relación volumen / área superficial que la partícula medida. Los datos se obtuvieron a partir de diez lecturas hechas sobre dos dispersiones preparadas en forma independiente y se informó el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

### 2.2.2.8. Determinación de color

El color del BM deshidratado se midió con un colorímetro triestímulo (Minolta CR400, Osaka, Japón) colocando el polvo en capa uniforme dentro de una placa de Petri. Se obtuvieron los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del espacio de color CIELAB.

Existen diversos sistemas para la medición de color. Los más comunes son: sistema CIELAB, propuesto en 1971 por CIE (CIE, Comisión Internationale de l'Éclairage), el cual define un espacio en coordenadas rectangulares ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) junto con otro en coordenadas cilíndricas ( $L^*$ ,  $H^*$ ,  $C^*$ ); y el sistema Hunter el cual es el más utilizado en los alimentos. Este último define un espacio cartesiano en que  $L^*$  es la claridad o luminosidad, va desde 0 (negro) a 100 (blanco). El parámetro  $a^*$  define a los componentes rojo - verde, rojo para valores positivos y verde para negativos. El parámetro  $b^*$  define la componente amarillo - azul, amarillo para valores positivos y azul para negativos (Figura 2.1.).



**Figura 2.1.** Espacio de color CIELAB. (tomado de [http://www.gusgsm.com/espacio\\_color\\_cie\\_lab](http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab))

Se determinó además el índice de pardeamiento (IP), de acuerdo a los datos obtenidos de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del sistema Hunter, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$IP = \frac{(x-0,31)100}{0,172} \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde:

$$x = \frac{(a^*+1,75L^*)}{(5,645L^*+a^*-3,012b^*)} \quad \text{Ec. 2.7}$$

### 2.2.2.9. Determinación de polifenoles totales

#### Obtención de extractos para cuantificación de polifenoles totales

Para la determinación de los polifenoles se realizó una extracción con solución acuosa de metanol al 70% v/v, siguiendo la técnica de Zaro y col. (2014) con algunas modificaciones. En un vaso de precipitado se pesaron aproximadamente 4 g de BM, se le adicionó la solución de metanol y se realizó una agitación en un dispositivo agitador multiposición RO-10 (IKA-WERKE, Alemania) durante 40 minutos a una temperatura de 4°C. La extracción se llevó a cabo en tubos Beckman de 50 mL con una relación muestra: solvente de extracción de 4g BM: 20 mL solución metanólica, los cuales se centrifugaron en una centrifuga Avanti J-25 (Beckman Coulter, USA) a una velocidad de 16080 x g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para cuantificar los polifenoles totales.

#### Determinación de polifenoles solubles

A 50 µL del extracto metanólico descripto anteriormente se le adicionó H<sub>2</sub>O bidestilada hasta completar un volumen de 2350 µL, luego se agregaron 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperaron 3 minutos y se incorporaron 100 µL una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% (p/v) preparada en una solución de NaOH 0,1M (Singleton y col., 1999) esperándose 90 minutos para que se complete la reacción. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) a una absorbancia de 765 nm utilizando ácido gálico como patrón. La concentración de polifenoles se expresó en mg de ácido gálico equivalente de ácido gálico cada 100 g de BM. La determinación se realizó por triplicado.

### 2.2.2.10. Isotermas de sorción

Las isotermas de sorción se determinaron con el método gravimétrico estático a 20°C. Para obtener las condiciones de humedades relativas (%HR) deseadas, el BM seco

(1,0 g) se almacenó en recipientes herméticos conteniendo recipientes con soluciones saturadas de las siguientes sales: Cloruro de Litio, LiCl (11,3 %HR); Acetato de Potasio, CH<sub>3</sub>COOK (23,4%); Cloruro de Magnesio, MgCl<sub>2</sub> (33%); Carbonato de Potasio, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (43,2%); Nitrato de Magnesio, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (54,4%); Nitrito de Sodio, NaNO<sub>2</sub> (65,4%); Cloruro de Sodio, NaCl (75,7%) y Cloruro de Potasio, KCl (86,7%). Los pesos de las muestras se midieron cada tres días hasta alcanzar un valor constante (< ± 0,003g), donde se asume que se ha alcanzado el equilibrio y que los valores de a<sub>w</sub> de cada muestra son iguales al valor de %HR/100 respectivo. Cada punto de la isoterma se hizo por triplicado, y los datos experimentales se ajustaron de acuerdo al modelo de Guggenheim, Anderson y de Boer (GAB).

$$X_{(a_w)} = \frac{X_m C K a_w}{(1 - K a_w)[1 + (C - 1) K a_w]} \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde:

X(a<sub>w</sub>) = humedad de equilibrio en base seca (g / 100 g de materia seca)

a<sub>w</sub> = actividad de agua

X<sub>m</sub> = humedad de la monocapa en base seca (g / 100 g de materia seca)

C = constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa.

K = factor de corrección de las propiedades de la multicapa con respecto al líquido (relacionado con el calor de sorción de la multicapa)

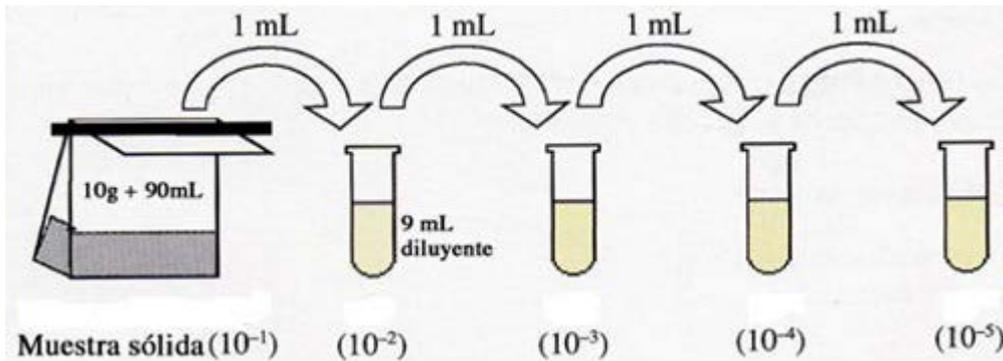
### 2.2.2.11. Recuentos microbiológicos

Se realizaron recuentos microbianos a las siguientes muestras: BM tal como llega de la empresa, sin procesar ni autoclavar (BMSP), BM procesado pero sin autoclavado (BMP), bagazo sin procesar pero autoclavado (BMSPA), BM procesado y autoclavado (BMPA) a fin de controlar la inocuidad microbiológica del producto lograda con el método de procesamiento elegido a escala de laboratorio

#### Procedimiento

En primer lugar, la muestra (10 g) se diluyó en un medio estéril (90 mL de agua peptona 0,1%), se homogenizó en Stomacher 400 (Seward, Estados Unidos) durante 120 segundos a velocidad máxima, luego se realizaron las diluciones seriadas (Figura 2.2), transfiriendo 1 mL de la muestra homogenizada a 9 mL de agua peptona y

mezclando adecuadamente. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de  $10^{-5}$ . Posteriormente se añadió 1 mL de las diluciones a una placa con agar nutritivo (PCA para mesófilos aerobios, e YGC para hongos y levaduras) mezclándolos suavemente.



**Figura 2.2.** Esquema de diluciones seriadas (Laboratorio de Tecnología Educativa. Universidad de Salamanca, [http://virus.usal.es/web/demo\\_microali/Saureus/SaureusPlaca.html](http://virus.usal.es/web/demo_microali/Saureus/SaureusPlaca.html)).

Los medios de cultivo se describen a continuación:

**Plate Count Agar (PCA, Oxoid)** Para recuento de mesófilos aerobios totales

Peptona de caseína	5 g/L
Extracto de levadura	2.5 g/L
Glucosa	1 g/L
Agar	14 g/L
pH	7,0 ± 0,2

Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos.

La incubación se realizó a 37°C durante 48 h para recuento de microorganismos totales. Los resultados fueron expresados como log UFC/g de muestra. El límite de detección es de  $10^2$  UFC/g.

**Agar Cloroanfenicol, Extracto de levadura, Glucosa (YGC)** Para recuento de hongos y levaduras.

Extracto de levadura	2.5 g/L
Glucosa	1 g/L
Agar	14 g/L
Croranfenicol	0.1 g/L

Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. La incubación se realizó a 25-30°C durante 5 días. . El límite de detección es de 10<sup>2</sup> UFC/g.

### 2.2.2.12. Ensayo de absorción de agua (WIC)

Se determinó la capacidad de imbibición de agua (water imbibing capacity: WIC) del BM, FM y HA y de las mezclas en donde se remplazaron los componentes almidonosos (HA+FM; 1:1) por BM en tres niveles (10%, 25%, 50%). Se empleó un equipo de Baumann, el cual consiste en una base perforada sobre la cual se coloca papel de filtro y que se conecta a una pipeta graduada a través de un tubo flexible, la base y la pipeta se encuentran en posición horizontal y al mismo nivel (Figura 2.3.).

El sistema se llenó con agua, se enrasó la pipeta y se colocó una capa uniforme de muestra (50 mg) sobre el papel de filtro. Se midió la variación del volumen de agua de la pipeta en función del tiempo hasta obtener un volumen constante. La capacidad de imbibición de agua se determinó como (ecuación 2.9):

$$WIC = \frac{ml \text{ agua absorbida}}{g \text{ muestra}} \quad \text{E.c 2.9}$$

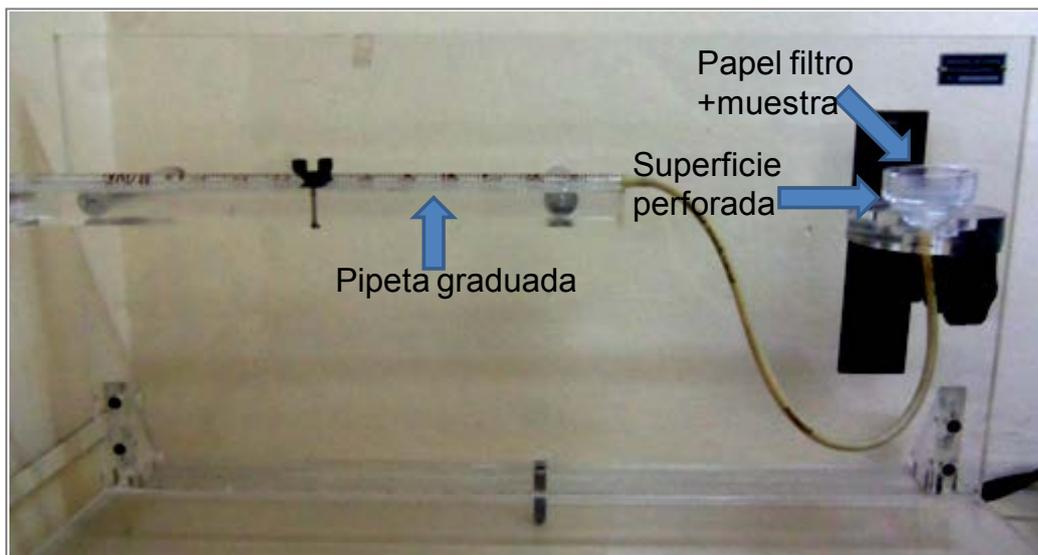


Figura 2.3. Fotografía del equipo de Baumann (CIDCA).

## **2.2.3. Obtención de productos horneados libre de gluten**

### **2.2.3.1. Ensayos preliminares: elección de la fuente proteica y perfil de producto**

Con el objetivo de elegir las fuentes de proteína más adecuada para obtener panificados libres de gluten que soporten mejor la adición de bagazo de manzana y permitan obtener productos con buena aceptabilidad, se evaluaron las proteínas descritas en la sección 2.1.3.

La mezcla base de las formulaciones se basó en un trabajo previo (Ferrero y col., 2009) y consistió en: 45 % de harina de arroz, 45 % de fécula de mandioca y 10 % de la fuente proteica (base de cálculo para determinar los porcentajes). Los restantes ingredientes se agregaron según (en base a 100 g mezcla HA-FM-fuente proteica): 10 % bagazo de manzana, 3 % levadura, 2 % margarina, 2% de NaCl, 1 % hidrocoloide (CMC o HPMC), 1 % emulsionante (SSL), 0,1 % leudante químico, el agua se ajustó para tener una consistencia adecuada de la mezcla.

Una vez seleccionada la fuente proteica más adecuada se compararon formulaciones con BM y con 2% de sal con formulaciones con BM y 2% de sal o 10% de sacarosa (porcentajes en base a 100 g de la mezcla base), para evaluar los efectos de estos materiales sobre el volumen y calidad sensorial del pan

### **2.2.3.2. Panificación con la fuente proteica seleccionada y bagazo de manzana**

#### **2.2.3.2.1. Diseño experimental para las formulaciones de los batidos y panes**

Con el objetivo de evaluar la interacción entre el bagazo de manzana (BM) y la cantidad de agua (A) adicionada, se utilizó un diseño central compuesto (DCC), con triplicado del punto central variando las proporciones de BM (5 a 20) % y A (115 a 150) % en base a 100 g mezcla (HA+FM+CH), dando lugar a 11 combinaciones, las que se detallan en la Tabla 2.1.

La metodología de superficie de respuesta (MSR), propuesta por Box y Wilson (1951), es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables (Montgomery, 1997; Khuri y Cornell, 1996). Se empleó el programa Design-Expert 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) para ajustar un modelo de segundo orden, generar el gráfico de superficie de respuesta, determinar diferencias significativas entre factores.

**Tabla 2.1.** Valores codificados y decodificados del DCC

Formulación	Codificadas		Decodificadas	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	BM (%)	A (%)
1	0	-1,41	12,5	115
2	0	0	12,5	132,5
3	1	-1	17,8	120,1
4	-1	-1	7,18	120,1
5	1,41	0	20	132,5
6	0	1,41	12,5	150
7	-1	1	7,18	145
8	0	0	12,5	132,5
9	0	0	12,5	132,5
10	-1,41	0	5	132,5
11	1	1	17,8	145

El modelo propuesto (Montgomery, 1997; Khuri y Cornell, 1996) para cada respuesta viene dado por la ecuación 2.10 (Ec. 2.10). Las adecuaciones de modelo fueron verificadas a través de un análisis de varianza (prueba de F) y los valores de coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde:

Y: variable respuesta estudiada

$b_0$ : valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño.

$b_1, b_2$ : términos de regresión lineal

$b_{11}, b_{22}$ : términos de regresión cuadrática

$b_{12}$ : términos de regresión correspondiente a la interacción

X<sub>1</sub>: variable independiente bagazo de manzana

X<sub>2</sub>: variable independiente agua

La formulación utilizada en la elaboración de panes se obtuvo a partir de diferentes pruebas preliminares, la composición general para la elaboración de los batidos y panes se puede observar en la Tabla 2.2., en donde la cantidad de agua y bagazo de manzana varía en función del diseño experimental elegido.

**Tabla 2.2.** Formulación de los batidos libres de gluten por cada 100 g de HA+ FM+ CH

INGREDIENTES	g
Harina de arroz	45
Fécula de mandioca	45
Clara de huevo	10
Bagazo de manzana	Variable (*)
Agua	Variable (*)
Azúcar	10
Levadura fresca	3
Margarina	2
HPMC	1
SSL	0,5
Leudante químico	0,1

(\*) de acuerdo a diseño (Tabla 2.1.)

## 2.2.4. Propiedades reológicas de los batidos

Para los ensayos reológicos de los batidos, se emplearon formulaciones, sin la utilización de levadura ni leudante químico para evitar cambios (formación de gas) durante el ensayo.

### 2.2.4.1. Ensayos reométricos oscilatorios

En estos ensayos, que se encuentran dentro de los más comunes para estudiar el comportamiento viscoelástico de los alimentos, las muestras son sometidas a una deformación oscilatoria. Los resultados son muy sensibles con respecto a la composición química y la estructura física del alimento, por tanto son útiles en una amplia variedad de aplicaciones dentro de las que se incluyen, entre otras: evaluación de fuerza de un gel, monitoreo de la gelatinización del almidón, estudio del fenómeno de transición vítrea, observación de la coagulación o desnaturalización proteica, evaluación de la cuajada formada en productos lácteos, desarrollo de textura en productos horneados, ensayos de vida útil, y correlaciones entre las propiedades reológicas y la percepción sensorial de los alimentos (Steffe, 1996).

La muestra se coloca en una celda que puede tener distintas geometrías (plato-plato, cono-plato) y se termostatiza. Un ejemplo de este dispositivo se observa en la Figura

2.4. El plato o cono superior oscila horizontalmente mientras el inferior se encuentra fijo.



**Figura 2.4.** Esquema de una celda de platos paralelos (fuente: adaptado de Thermofisher, [http://thermofisher.cn/Resources/200802/productPDF\\_2936.pdf](http://thermofisher.cn/Resources/200802/productPDF_2936.pdf))

A una frecuencia fija ( $\omega$ ), la deformación oscilatoria del material en función del tiempo está dada por la ecuación 2.11:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ec. 2.11}$$

donde:

$\gamma$  = deformación del material (-)

$\gamma_0$  = amplitud de deformación (-)

$\omega$  = velocidad angular (rad/s o Hertz (Hz))

$t$  = tiempo (s)

El gradiente de deformación periódico se puede evaluar derivando la ecuación 2. 12:

$$\delta\gamma / \delta t = \gamma_0 * \omega * \cos(\omega t) \quad \text{Ec. 2.12}$$

Si la amplitud de deformación que se aplica es pequeña, de forma que nos encontramos en el rango de viscoelasticidad lineal, el esfuerzo producido está dado por la ecuación 2.13:

$$\sigma = \sigma_0 * \text{sen}(\omega t + \delta) \quad \text{Ec. 2.13}$$

donde:

$\sigma$  = esfuerzo (kPa)

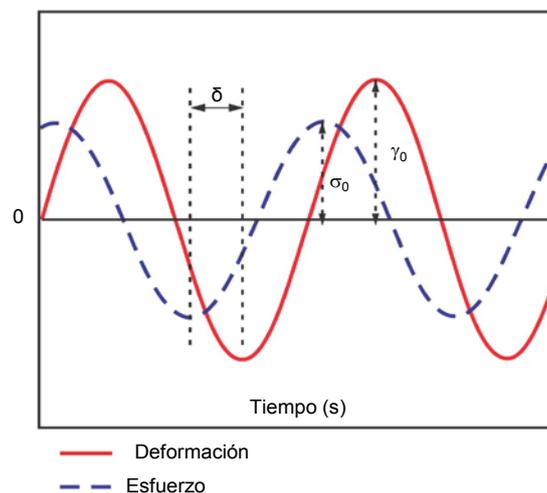
$\sigma_0$  = amplitud del esfuerzo (kPa)

$\delta$  = ángulo de desfasaje que separa al esfuerzo de la deformación (°)

$t$  = tiempo (s)

Para un material perfectamente elástico, la onda de deformación se encontrará en fase con el esfuerzo ( $\sigma$ ) aplicado. Por lo tanto para un sólido ideal el ángulo de desfasaje ( $\delta$ ) entre el esfuerzo aplicado y la deformación será de  $0^\circ$ . Si en cambio se realiza para un material viscoso ideal, la onda que representa la deformación oscilatoria se encuentra exactamente fuera de fase ( $\delta = 90^\circ$ ) con respecto a la correspondiente al esfuerzo (Steffe, 1996).

Los materiales viscoelásticos presentan un comportamiento intermedio entre el correspondiente al viscoso ideal y al elástico ideal, por lo tanto las funciones trigonométricas que representan la deformación y el esfuerzo presentan ángulos de desfasaje entre  $0$  y  $90^\circ$  (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Comportamiento mostrado por un material viscoelástico (Salinas, 2013).

La ecuación 2.13 también puede escribirse como:

$$\sigma = G' \gamma + (G''/\omega) \quad \text{Ec. 2.14}$$

donde:

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos \delta \quad \text{Ec. 2.15}$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin \delta \quad \text{Ec. 2.16}$$

donde:

$G'$  = módulo de almacenamiento o módulo elástico (Ec. 2.15) relacionado con la respuesta del material como un sólido. Se expresa en kilopascales (kPa).

$G''$  = módulo de pérdida o viscoso (Ec. 2.16) relacionado con la respuesta del material como un fluido. Se expresa en kPa.

Otras funciones que describen el comportamiento viscoelástico de la muestra y su dependencia con la frecuencia son el módulo complejo (Ec. 2.17) y la tangente del ángulo de desfasaje (Ec. 2.18).

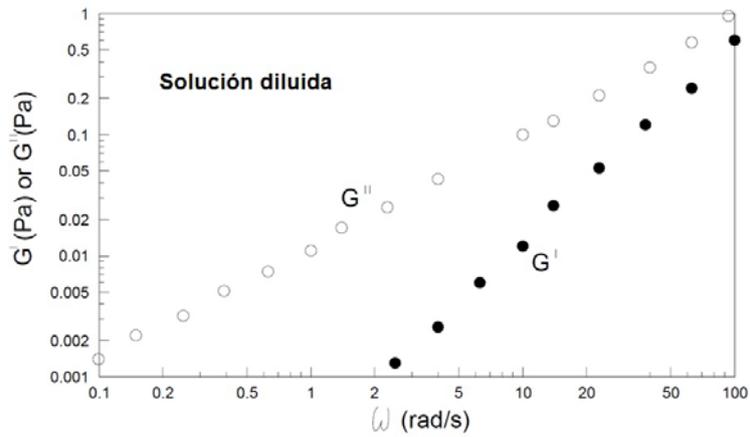
$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0 = [(G')^2 + (G'')^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 2.17}$$

$$\tan \delta = G''/G' \quad \text{Ec. 2.18}$$

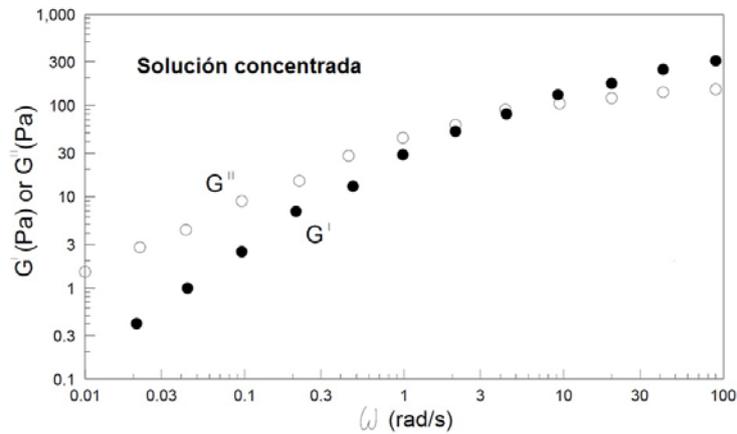
La  $\tan \delta$  se vincula con la relación entre la energía perdida por la muestra por ciclo respecto a la energía almacenada por ciclo (Steffe, 1996).

Resulta útil comparar el comportamiento viscoelástico de una muestra con los espectros mecánicos medidos para soluciones típicas de polisacáridos y geles (Ross-Murphy, 1988). Una solución diluida, concentrada y un gel muestran un comportamiento característico (Figura 2.6., Figura 2.7., Figura 2.8.) cuando son sometidos a un barrido de frecuencia. En una solución diluida (Figura 2.6.),  $G''$  es mayor que  $G'$  sobre el rango total de frecuencias evaluado, pero ambas curvas se aproximan a frecuencias altas. Las curvas de los espectros  $G''$  y  $G'$  suelen cruzarse dentro del rango de frecuencias estudiadas para la solución concentrada (Figura 2.7.), mostrando una clara tendencia a un comportamiento como sólido a frecuencias altas. Por el contrario el espectro de un gel (Figura 2.8.), que es el de un material sólido,  $G'$  resulta mayor que  $G''$  en todo el rango. Es significativo observar que los módulos tienen una fuerte dependencia de la frecuencia en soluciones diluidas y concentradas,

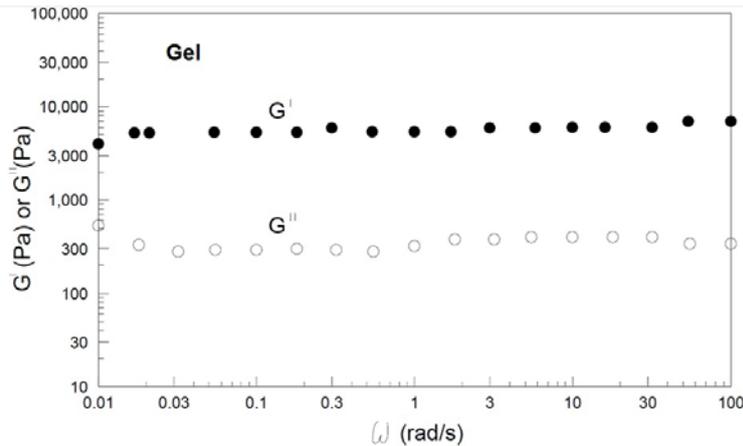
pero son prácticamente independientes de ésta en un gel (Ross-Murphy, 1988; Steffe, 1996).



**Figura 2.6.** Espectro mecánico para una solución diluida elaborada con dextrina al 5%, adaptado de Steffe (1996).



**Figura 2.7.** Espectro mecánico para una solución concentrada elaborada con lamda carragenano al 5%, adaptado Steffe (1996).



**Figura 2.8.** Espectro mecánico para un gel elaborado con agar al 1%, adaptado Steffe, (1996).

Steffe, 1996 ha propuesto ecuaciones potenciales (ecuaciones 2.19, 2.20) para describir los comportamientos observados en los espectros correspondientes a distintos tipos de sistemas

$$G' = a\omega^b \quad \text{Ec. 2.19}$$

$$G'' = c\omega^d \quad \text{Ec. 2.20}$$

Para las mediciones se utilizó un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado (RS600, Haake Alemania) utilizando el programa RheoWin data Manager 3.30. Para los diferentes ensayos se utilizó un sensor de platos paralelos de superficie rugosa paralelos, el plato superior móvil (PP35/S) de 35 mm de diámetro y el plato inferior fijo (D35/S). Se trabajó a temperatura controlada (25°C). El espacio entre los platos fue de 1,5 mm. Los batidos se prepararon de la misma manera que para la fabricación de panes, pero sin la incorporación de levadura.

Se colocó el material a medir sobre el plato inferior removiéndose cuidadosamente el exceso de muestra. Para evitar la evaporación del agua durante el ensayo, los bordes expuestos fueron recubiertos con vaselina. Antes de comenzar los diferentes ensayos, la muestra se dejó reposar por 5 min.

#### 2.2.4.1.1. Barrido de deformación

Estos ensayos se realizaron para determinar el rango de viscoelasticidad lineal del material, dentro del cual se elegirá una deformación para realizar los barridos de frecuencia. El rango de viscoelasticidad lineal de un material a aquel en el cual las

propiedades del mismo no dependen de la magnitud del esfuerzo aplicado, de la deformación realizada.

Se realizó un barrido de deformación a una frecuencia de 1Hz entre 0,05 y 100 Pa para determinar el máximo de deformación ( $\gamma_0$ ) para la muestra en el rango de viscoelasticidad lineal. El ensayo se realizó por triplicado.

#### **2.2.4.1.2. Barrido de frecuencia**

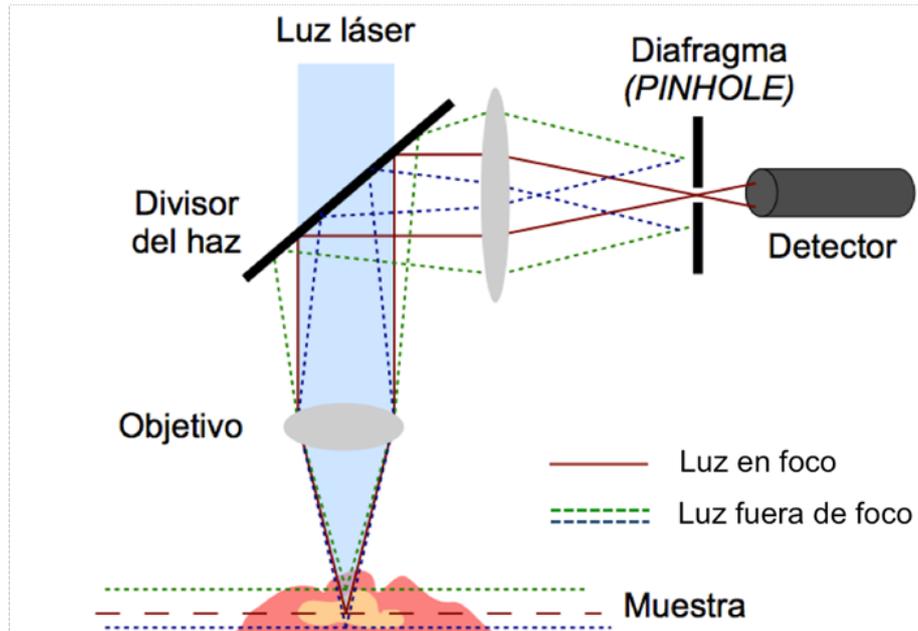
Se realizó un barrido de frecuencia entre 0,005 Hz y 100 Hz a deformación constante dentro del rango viscoelástico lineal ( $\tau = 0,1$  Pa). Se obtuvo el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) y la tangente del ángulo de desfase  $\tan \delta = G''/G'$  en función de la frecuencia.

#### **2.2.4.2. Viscosidad de los batidos**

Para las mediciones se utilizó un viscosímetro rotacional Fungilab Expert Series modelo RVT utilizándose los rotores: R5, R6 y R7 en función de la viscosidad del sistema, se evaluaron tres batidos seleccionados del DCC, (5%BM; 132,5%A), (12,5%BM, 132,5%A), (17,8%BM, 120,1%A). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente (20°C) y se obtuvieron los valores de la viscosidad aparente en función de velocidad de rotación a 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 120; 130 y 140 rpm. Se obtuvieron las curvas de viscosidad aparente en función de la velocidad angular aplicada (rpm).

#### **2.2.5. Microscopía láser confocal de barrido**

La microscopía láser confocal de barrido (CSLM) es una técnica de observación que permite a través de un láser como fuente de luz de alta intensidad obtener secciones ópticas de una pequeña zona de la muestra y lograr su reconstrucción tridimensional. Esto que permite apreciar detalles de la estructura no accesibles a través de la microscopía óptica convencional. Asimismo, las imágenes obtenidas en un plano son de gran nitidez y contraste y de mayor resolución. Las distintas partes de la estructura son teñidas con fluoróforos específicos. La luz fluorescente procedente de los planos fuera de foco es eliminada, lo que contribuye a la nitidez de la imagen. En la Figura 2.9., se muestra un esquema del microscopio.



**Figura 2.9.** Principio de confocalidad, adaptado de Almansa-Carrascosa, C, Universidad de Alicante, España

### 2.2.5.1. Preparación de las muestras

Las observaciones se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Imágenes (LAI) de la facultad de Cs. Veterinarias (UNLP).

Se estudiaron diferentes sistemas: a) mezclas de CH (relación CH:agua 1:1); b) extendido de BM (relación BM:agua 1:5); c) extendido de mezcla de FM y HA parcialmente gelatinizados y teñidos (relación sólidos:agua 1:1); d) batido con un nivel elevado de fibra (17,8%BM; 120,1%A). Se realizó un marcado no covalente con Rodamina B (Biopack), isotiocianato de fluoresceína FITC (Sigma), Calcofluor White (Sigma-Aldrich). El contraste obtenido a través de la tinción depende del balance entre la afinidad de los fluoróforos por las fases a ser teñidas. En la solución acuosa las concentraciones empleadas fueron Rodamina B 0,001%, FITC 0,01%, y Calcofluor White 0,01%. Para los sistemas mencionados se realizó una tinción con los colorantes individuales o mezclas de ellos.

Se tomó una porción del sistema y se extendió sobre un portaobjetos, inmediatamente se cubrió con la solución que contenía los fluoróforos. Se dejó 30 minutos en reposo en un recipiente cerrado y en la oscuridad, luego se lavó con agua y se colocó sobre la muestra un cubreobjetos. Se empleó un microscopio confocal invertido LEICA TCS SP5 (Mannheim, Alemania) equipado con láseres de Argón y HeNe para el estudio de los sistemas. Se utilizaron como longitudes de onda de excitación 488 nm (para FITC)

y 568 nm (para Rodamina B) y 365 (para el Calcofluor White) y como longitudes de onda de emisión 518 nm 625 nm, 420 para FITC, Rodamina B y Calcofluor White respectivamente. Se realizaron observaciones de varios campos con diferentes aumentos: 4x, 10 x, 20x, 40x, 63x, con diferentes zoom, con la finalidad de buscar las mejores condiciones para el estudio de los sistemas. El análisis de las imágenes se realizó con el empleo del programa Image J.

### **2.2.6. Protocolo de panificación**

El proceso de panificación utilizado fue modificado respecto al original (Ferrero et al., 2006) de acuerdo a los resultados de los ensayos preliminares, algunos tiempos y temperaturas como los de fermentación y horneado tuvieron que ser incrementados para lograr un mejor volumen y una buena cocción. Los pasos seguidos, fueron los siguientes:

- Se colocaron los ingredientes secos pesados (harina de arroz, fécula de mandioca, clara de huevo, bagazo de manzana, azúcar, HPMC, SSL, leudante químico) junto con la margarina fundida en el bol de una amasadora (KENWOOD MAJOR 1200W, KENWOOD, Italia).
- Se incorporó la levadura suspendida en una porción del agua total necesaria y luego el resto del agua y se mezcló a baja velocidad (velocidad 1, que corresponde a 52 rpm durante 4 minutos).
- Se aumentó la velocidad (velocidad 3, que corresponde a 124 rpm) y se continuó durante 5 minutos.
- El bol con el batido se llevó a una fermentadora (ROTAR, Brito Hnos, Argentina) a 30°C durante 30 minutos (primera fermentación).
- Terminado el tiempo de la primera fermentación se volvió a batir a velocidad 1 durante 1 minuto para homogenizar las burbujas de gas generadas en el batido.
- Se vertieron (aproximadamente) 50 gramos del batido en moldes cónicos (diámetro de base 4,0 cm, diámetro de boca 6,5 cm, altura 5,5 cm) previamente

tarados y se llevaron estos a fermentación a 30°C durante 25 min (segunda fermentación).

- Luego de la segunda fermentación los moldes se llevaron al horno (ARISTON, Argentina) previamente calentado a 170°C y se hornearon durante 60 minutos.
- Una vez retirados del horno los panes fueron desmoldados en caliente y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de colocarse en bolsas plásticas individuales rotuladas.

### **2.2.6.1. Caracterización de los panes**

#### **2.2.6.1.1. Altura del pan**

A cada pieza de pan se le determino la altura por medio de la utilización de un calibre, la altura se midió en cm, y se determinó desde la base de cada pieza de pan, hasta la parte superior de la corona en la corteza, siempre se procedió a colocar el calibre en el centro tanto de la base como de la corona del pan.

#### **2.2.6.1.2. Volumen específico de los panes**

La determinación del volumen de las piezas de pan se realizó por desplazamiento de semillas de nabo en una probeta de 2 L. Primero se midió el volumen de las semillas sin la pieza de pan (volumen inicial), luego se vació la probeta, se colocó la pieza de pan y se añadieron nuevamente las semillas. Se midió el nuevo volumen (volumen final) y por diferencia se obtuvo el volumen de pan. Este proceso se realizó tres veces para cada pieza de pan. Según la ecuación 2.21 fue calculado el peso específico (cm<sup>3</sup>/g).

$$Ve = \frac{Vf - Vi}{M} \quad \text{Ec. 2.21}$$

donde:

Vf= volumen final (cm<sup>3</sup>)

Vi= volumen inicial (cm<sup>3</sup>)

M= masa de la pieza de pan (g)

### 2.2.6.1.3. Humedad de miga de los panes

La humedad de miga se determinó por secado en estufa a 105°C hasta peso constante (método indirecto). Las muestras de miga se obtuvieron de la parte central de los panes. La miga se disgregó para aumentar el área y favorecer el secado y se pesó en cajas de Petri previamente taradas. Una vez transcurrido el tiempo de secado se dejó enfriar las muestras en desecador hasta temperatura ambiente y luego se pesó en balanza analítica. La humedad ( $H$ ) de miga se calculó como se detalla en la ecuación 2.22.

$$H \% = \left( \frac{M - M_s}{M} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 2.22}$$

donde:

$M$ =masa de muestra sin secar (g)

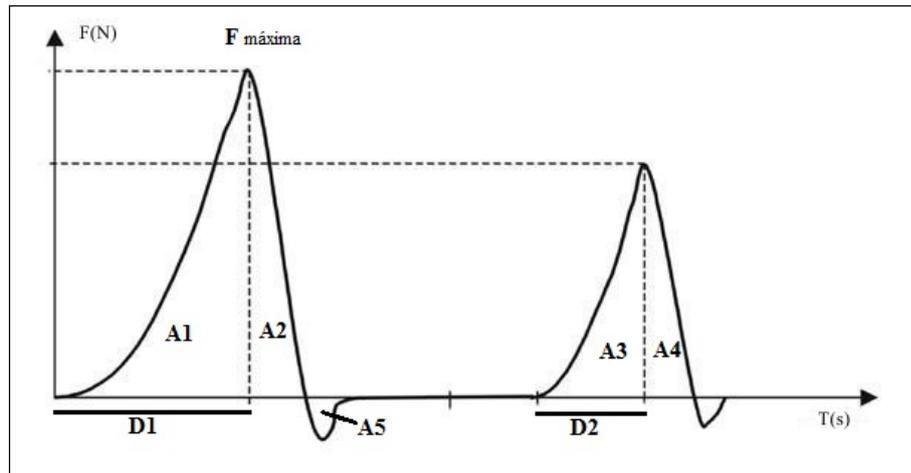
$M_s$ =masa de muestra después del secado (g)

### 2.2.6.1.4. Análisis de textura de miga

Se cortaron rodajas de 1,5 cm de espesor de la zona media de los panes y mediante un sacabocado de 4 cm de diámetro se descartó la parte externa de las rodajas (corteza) que puede interferir, al ser más dura, en las mediciones de la miga.

Las rodajas de pan se analizaron con un texturómetro TA-XT2i (Stable Microsystems, Surrey, Inglaterra) que consta de un brazo móvil al cual se le pueden adaptar diferentes tipos de sondas de acuerdo al tipo de ensayo a realizar y la muestra a medir.

Para las muestras de miga de pan se realizó un análisis de perfil de textura con la sonda SMSP/75. El ensayo consistió en 2 ciclos de compresión (con un porcentaje de compresión de 40% de la altura total de la rodaja). La velocidad de compresión fue de 0,5 mm/s.



**Figura 2.10.** Gráfico típico obtenido por Análisis de Perfil de Textura para miga de pan

En la Figura 2.10., se puede observar un gráfico general de Análisis de Perfil de Textura, donde se muestran los principales parámetros que se obtienen de él. Mediante el análisis de los gráficos obtenidos se pueden calcular las siguientes propiedades del material:

**Dureza:** es la fuerza máxima alcanzada durante el primer ciclo de compresión (altura máxima del primer pico del gráfico) y está relacionada con la resistencia de la muestra a la compresión (unidades de fuerza, N).

**Consistencia:** se obtiene sumando las áreas de los dos picos positivos de ambos ciclos de compresión ( $A1+A2+A3+A4$ ) (N.s).

**Cohesividad:** es una medida del trabajo necesario para vencer las uniones internas del material. Se calcula como el área del segundo pico dividido el área del primero  $(A3+A4) / (A1+A2)$  (adimensional).

**Elasticidad:** se relaciona con la capacidad de recuperar la forma inicial que tiene la muestra luego de ser comprimida por la sonda. Se calcula como la división entre la distancia entre el inicio y el máximo del segundo pico y la distancia entre el inicio y el máximo del primer pico ( $D2 / D1$ ) (adimensional).

**Resiliencia:** se relaciona con la elasticidad instantánea del sistema y su valor se obtiene del cociente entre el área entre el máximo y el final del primer pico respecto al área entre el inicio y el máximo del mismo pico ( $A2 / A1$ ) (adimensional).

**Gomosidad:** se obtiene multiplicando el valor de dureza por el de cohesividad (N).

**Masticabilidad:** se calcula como el producto de la gomosidad por la elasticidad (N).

**Adhesividad:** es la capacidad del material a pegarse a otras superficies. Se obtiene del área del pico negativo ( $A5$ ) (N.s).

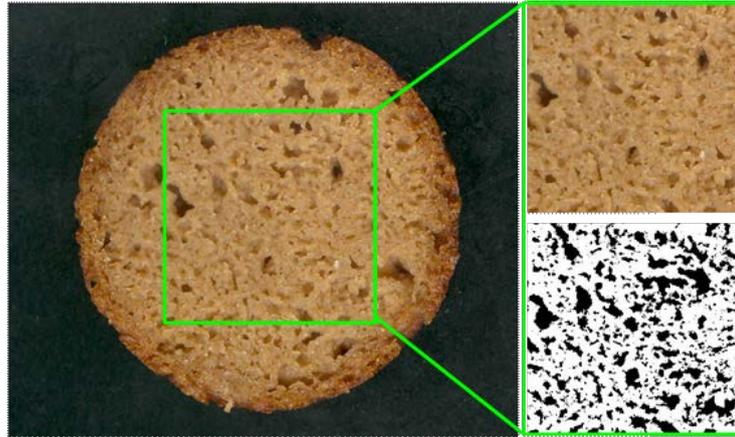
#### **2.2.6.1.5. Determinación del color de corteza y miga**

El aspecto visual de los alimentos lo conforman la transparencia y la opacidad, relacionadas con la cantidad de luz que el material deja pasar a través de él o bien que se refleja en él. El color de la corteza de los panes se midió con un colorímetro triestímulo (Minolta CR400, Osaka, Japón) mediante la obtención de los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del espacio de color CIELAB, como se detallara en una sección previa (2.2.2.8.)

#### **2.2.6.1.6. Análisis macroscópico y microscópico del alveolado de la miga**

En cada panificación se realizó el escaneo de 4 rodajas de pan con un escáner HP 4070, el tamaño de las imágenes adquiridas fue de 10 X10 cm y la resolución de 350 dpi. Mediante la utilización del programa Image J versión 143 (NIH, National Institutes of Health, Estados Unidos) se procedió al análisis de las características de alveolado de la miga. A partir del centro de cada rodaja se obtuvo una imagen de 2,28 cm X 2,28 cm para todas las muestras. Con el fin de evitar distorsiones en los parámetros de la imagen debido a la diferencia de brillo, este parámetro fue homogenizado antes de la binarización, para esto a través del software se llevó la media del brillo de todas las fotografías a un valor referencia en este caso la formulación más clara (5%BM; 132,5%A).

Luego la imagen digital en RGB color se convirtió a imagen de 8 bits en escala de grises y se binarizó con la utilización del algoritmo de Huang, el cual se eligió entre otros que ofrece el programa Image J debido a que fue el que mejor reflejó la estructura original de la miga. Para binarizar se eligió un valor umbral (206) dentro de los grises, de forma tal que los niveles de grises inferiores al umbral se convirtieron en negro y los mayores en blanco. De este modo se convirtió la imagen en escala de grises en una imagen binarizada, donde los alvéolos se representan en negro y las paredes de los mismos en color blanco. Los resultados del procedimiento descrito se muestran en la Figura 2.11. (binarización). Antes de proceder al análisis de las muestras se realizó una calibración utilizando como escala una regla graduada al mm.



**Figura 2.11.** Fotografía de un panificado libre de gluten con adición de BM mostrando el área seleccionada para el análisis de imagen. Esta selección es luego transformada en imagen de 8 bits.

Luego se analizó la imagen binarizada determinándose el número de alvéolos, el área alveolar promedio ( $\text{mm}^2$ ), la fracción de aire (relación entre el área alveolar y el área total), la densidad alveolar (número de alveolos/ $\text{cm}^2$ ).

Para el análisis microscópico del alveolado se empleó la técnica de CSLM, descrita en la sección 2.2.5., se realizaron microfotografías de miga control (sin bagazo de manzana) teñida con Rodamina B con un aumento de 4x y 10x; miga con 20% BM (año 2014) teñida con Rodamina B y aumentos de 4x y 10 x; miga control teñida con Rodamina B y Calcofluor White (4x, 10x) y miga con 20%BM teñida con Rodamina B y Calcofluor White (4x y 10x).

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM) de la miga**

Se analizaron migas control (sin adición de BM) y para dos formulaciones (12,5%BM; 132,5%A) y (17,8%BM; 120,1%A). Se cortaron cubos de miga de aproximadamente 5 mm de arista con un bisturí. Los cubos de miga se guardaron en solución de glutaraldehído 2,5% v/v a una temperatura de 4°C hasta el momento de realizar la deshidratación. La deshidratación se realizó mediante lavados seriados de las muestras en soluciones con concentraciones crecientes de acetona (0, 25, 50, 75 y 100% v/v). Se realizaron tres lavados de cinco minutos con agitación para cada concentración. Posteriormente al último lavado con acetona se procedió a realizar el secado por punto crítico con  $\text{CO}_2$  en un secador Baltec CPD30 (Liechtenstein). Las muestras se almacenaron en ambiente libre de humedad hasta el momento del montaje y posterior metalización con oro de las mismas con un metalizador Jeol Fine

Coat JFC1100 (Japón). El secado por punto crítico, metalización, montaje y observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Cs Naturales y Museo (UNLP).

### **Observación microscópica**

Se realizaron observaciones de cara externa y de la superficie de fractura de las muestras. Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360 LV (Japón) equipado con detectores de electrones secundarios y de electrones retrodifundidos. Se obtuvieron imágenes de diversos campos para las muestras, con magnificaciones entre 40X y 100X.

#### **2.2.6.1.7. Composición centesimal de los panes**

La determinación de la composición centesimal de los panificados se realizó para 2 formulaciones (12,5%BM; 132,5%A) y (17,8%BM; 120,1%A) según lo descrito en la sección 2.2.2. El pan fue almacenado en freezer a -20°C hasta su análisis, esta determinación se realizó por duplicado.

#### **2.2.6.2. Almacenamiento panes**

Los panes se envasaron en bolsas tipo ziploc, y se almacenaron durante 1 día en una cámara a  $(20 \pm 0,1)$  °C, para realizarles el análisis correspondiente.

#### **2.2.6.3. Evaluación sensorial de los panes**

Se realizó un análisis sensorial de 2 formulaciones del diseño con distintos niveles de BM y por lo tanto con distintos niveles de fibra (12,5%BM; 132,5%A) y (17,8%BM; 120,1%A), con un panel no entrenado de 50 personas, para lo cual se empleó una planilla con una escala hedónica que se les presentó a cada panelista, se evaluaron 6 atributos por formulación: aspecto, color, aroma, textura, sabor y aceptabilidad general. A cada evaluador se le presentaron dos muestras en una bandeja, codificadas con números de tres cifras al azar y cada bandeja en orden aleatorio (Figura 2.12).

A cada uno de los atributos de las planillas con la respuesta de los evaluadores se les asignó un puntaje de 1 al 9, siendo para el 1 *disgusta* y para el 9 *gusta*. Para cada atributo se calculó en base a las respuestas del panel, un promedio ponderado.



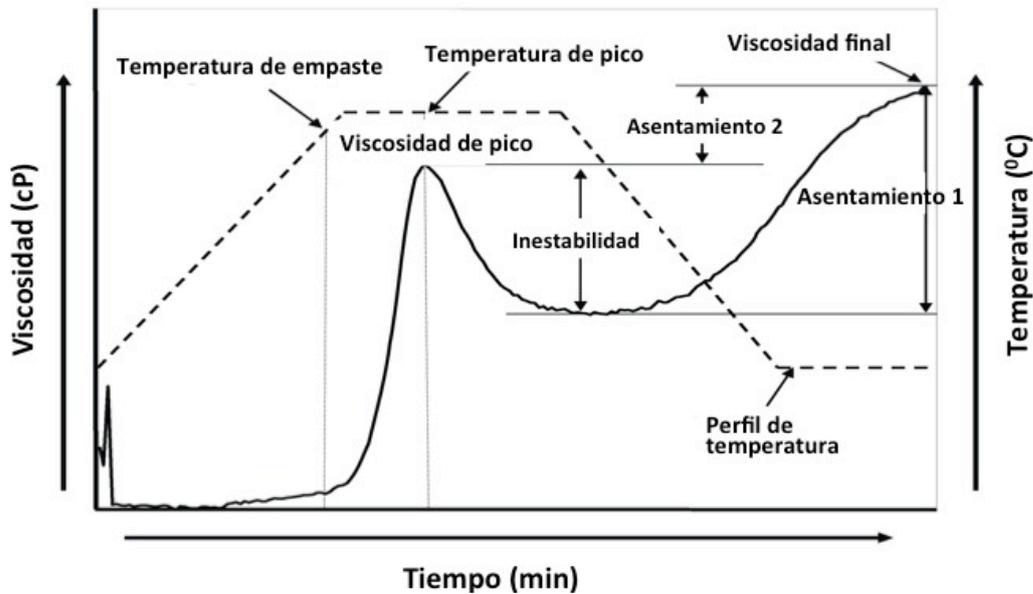
Figura 2.12. Planilla y bandeja utilizadas en la evaluación sensorial.

## 2.2.7. Comportamiento de sistemas modelo almidón-bagazo de manzana

### 2.2.7.1. Perfil viscoamilográfico

Para evaluar las propiedades de empaste (*pasting*) de las diferentes mezclas HA+FM+BM a diferentes concentraciones se utilizó un ciclo de calentamiento/enfriamiento empleando un viscoamilógrafo rápido (RVA-4; Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia) perteneciente al ICYTAC-UNC.

Los sólidos fueron dispersados en agua destilada (25 mL). La dispersión fue calentada hasta 50°C y agitada a 160 rpm durante 10 segundos, luego se mantuvo a esta temperatura por 1 minuto, y se calentó hasta 95°C, manteniendo esta temperatura por 2,5 minutos, para finalmente enfriar hasta 50°C, y se mantiene esta temperatura durante 2 minutos. En la Figura 2.13., se muestra un perfil de viscosidad típico, y los diferentes parámetros obtenidos.



**Figura 2.13.** Perfil viscoamilográfico típico de almidón de trigo y parámetros calculados a partir del mismo. (Fuente: autor).

Se obtuvieron los siguientes parámetros:

**Temperatura de formación de la pasta o temperatura de pasting ( $T_p$ ):** temperatura a la cual los gránulos de almidón comienzan a hincharse por la absorción de agua y generan aumento de la viscosidad.

**Viscosidad de pico (VP):** máxima viscosidad obtenida durante el calentamiento, relacionada con la capacidad de la muestra para ligar agua.

**Viscosidad final (VF):** viscosidad alcanzada al final del enfriamiento, relacionada con la habilidad de la muestra para formar una pasta viscosa o gel después de la cocción y el enfriamiento.

**Inestabilidad (B; breakdown):** diferencia entre VP y la viscosidad al final del periodo de mantenimiento a 95°C, relacionada con la habilidad de la suspensión para resistir el calentamiento y el esfuerzo de cizalla.

**Asentamiento 1 (S; setback):** diferencia entre VF y la viscosidad al final del periodo de mantenimiento a 95°C.

**Asentamiento 2:** diferencia entre VF y VP. Al enfriar la muestra ocurre una asociación de las moléculas de almidón formándose un gel por lo que esta zona de la curva se relaciona con la tendencia a retrogradar de la pasta.

#### 2.2.7.1.1. Series experimentales en RVA

Se realizaron las siguientes 3 series de experimentos:

a) Sistemas con sólidos constantes (3 g); estos sistemas se prepararon por reemplazo o sustitución de la mezcla (HA+FM) (1:1) con cantidades crecientes de BM (0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% y 50% de remplazo).

b) Sistemas con la misma cantidad de (HA+FM) que las muestras en la serie (a) pero sin BM (HA+FM de 2.7 g hasta 1.5 g)

c) Sistemas con una cantidad constante (3 g) de HA, FM, mezcla de HA+FM, y dos diferentes niveles de BM adicionado (0,16 g y 0,6 g) correspondiendo al 5% y 20% de BM adicionado.

Como controles se evaluaron muestras (3 g) de BM, FM y HA. Las medidas fueron realizadas por duplicado.

### **2.2.7.2. Microscopía de campo claro**

El aspecto de los sistemas de almidón antes y después del calentamiento en el RVA fue evaluado mediante un microscopio de campo claro (Leica DM 5000B, Wetzlar, Alemania). Cuando fue necesario, se aplicó a los sistemas una tinción con lugol (0,2% p/V yodo y 2%p/V yoduro de potasio). Se utilizaron dos diferentes aumentos: 40X y 100X. Para estas observaciones la concentración total de sólidos fue ajustada a 0,5 g totales para evitar aglomeración en las muestras observadas y poder distinguir detalles más fácilmente.

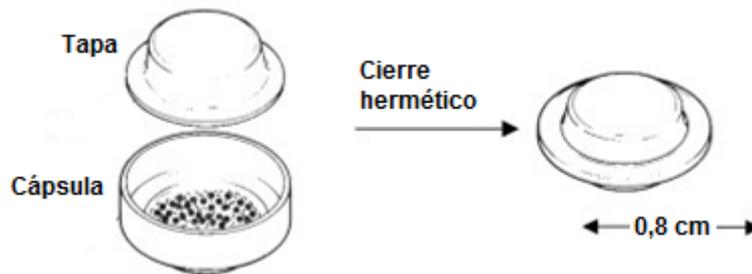
### **2.2.7.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles obtenidos por RVA**

Se evaluaron los sistemas modelo correspondientes a la serie (a): de los cuales se tomaron dos puntos que fueron: la mezcla sola de (HA+FM) (1:1) y la mezcla con un nivel de remplazo con BM correspondiente al 50%. La suspensión que sale del RVA, se vertió en caliente (50°C) en tubos de polipropileno y luego se enfrió a temperatura ambiente, para permitir la formación del gel cuando corresponda. Luego las muestras fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C) por 7 días para observar la retrogradación. Después las muestras fueron preparadas para la observación por SEM, estas fueron congeladas en un freezer a -85°C y liofilizadas. Las muestras liofilizadas fueron adheridas a una cinta adhesiva de doble cara, montada sobre la matriz del SEM, recubiertos con 3-5 miliamperios oro/platino bajo vacío y examinados con un microscopio FE-SEM (Carl Zeiss - Sigma, Alemania). El montaje, metalización y observación de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la Universidad Nacional de Córdoba.

## 2.2.7.4. Propiedades térmicas de los sistemas modelo y formulaciones completas (batidos) por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

### 2.2.7.4.1. Gelatinización

En esta metodología la muestra a ensayar y una muestra de referencia (inerte en el rango de temperatura ensayado) se someten a un calentamiento controlado. La muestra se deposita en una capsula de aluminio, la cual es sellada herméticamente tal como se muestra en la Figura 2.14.; la diferencia de flujo calórico necesario para mantener la muestra y la referencia a una misma temperatura se determina mediante termosensores y se registra. Una transformación acompañada de un cambio de entalpía es observable por la aparición de un pico endotérmico o exotérmico en el termograma.



**Figura 2.14.** Cápsulas para colocar las muestras antes y después del cierre hermético (adaptado de Carl von Ossietzky, <http://www.gmehling.chemie.uni-oldenburg.de/16633.html>).

Las mediciones calorimétricas se realizaron en un equipo Q100 (TA Instruments, Estados Unidos). El programa de calentamiento utilizado fue de 10 a 130°C a una velocidad constante de 10 °C/min. Alícuotas de las muestras (aproximadamente 10 mg exactamente pesados) fueron colocadas en cápsulas de aluminio recubiertas en su interior que fueron selladas herméticamente. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Se obtuvieron los termogramas a partir de los que se identificaron los picos y se calcularon las temperaturas inicial de pico y final y las entalpías a partir de las áreas de los mismos.

### Sistemas modelo

Para los ensayos realizados se utilizó siempre una relación de sólidos agua de 1:1. Las muestras se prepararon en tubos eppendorf y se dejaron equilibrar por un periodo de 12 horas. El ensayo se realizó por duplicado. Se analizaron los ingredientes puros

HA, FM, CH, BM para establecer las transiciones térmicas que se presentan en el rango de temperatura evaluado. Para evaluar el efecto de cada ingrediente puro en los batidos libres de gluten durante el horneado se establecieron sistemas modelos en donde a la mezcla de los componentes almidonosos (FM+HA), se le adicione BM, y CH. La relación de los ingredientes sólidos varió según la muestra: a) HA+ FM (1:1), b) HA+FM+CH (4:4:1), c) HA+FM+BM (4:4:1), d) HA+FM+BM+CH (4:4:1:1).

Se realizaron ensayos con diferente contenido de sólidos para los sistemas sin clara de huevo (HA+FM+BM) en una relación de ingredientes 4:4:1. Los niveles de sólidos evaluados fueron 26, 36, 64 y 83 % (p/p), también se realizó un ensayo con diferente contenido de sólidos para los sistemas con clara de huevo (HA+FM+BM+CH) en una relación de componentes 4:4:1:1, los niveles de sólidos fueron 30, 38, 50, 67, 83% (p/p).

#### **Formulaciones de batidos**

Se analizaron tres puntos del diseño experimental: (5%BM; 132,5%A); (12,5%BM; 132,5%A) (17,8%BM; 120,1%A), que corresponden a las siguientes relaciones de HA+FM+BM+CH: a) 4,5:4,5:1:1, b) 4,5:4,5:1,25:1, c) 4,5:4,5:1,8:1

#### **2.2.7.4.2. Retrogradación**

Para una formulación del diseño central compuesto establecido (17,8%BM; 120,1%A), Se pesaron aproximadamente 8-12 mg de miga en cápsula de aluminio para DSC, y se almacenaron a 20°C durante 0, 1,3, 6 y 9 días. Pasado este tiempo se evaluó el proceso de retrogradación del almidón por DSC. El programa de calentamiento seleccionado consistió en una isoterma de 5 minutos a 5°C y luego una rampa de calentamiento de 5°C / min desde 5°C hasta 140°C. Se determinaron las temperaturas de inicio, de pico y de finalización de las endotermas del almidón y el cambio de entalpía asociado.

#### **2.2.8. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa STATGRAPHICS Centurion XV (Version 15.2.06, USA). En función del ensayo y el número de réplicas realizadas, se informó el promedio y la desviación estándar ( $\pm$  DE). Con el objeto de determinar si existen diferencias significativas entre las muestras se realizó un análisis de varianza (ANOVA), en el caso de presentar diferencias, la comparación de las medias se realizó mediante el test de Tukey HSD con un nivel de

significancia de 0,05. La relación entre los distintos parámetros fue determinada mediante el coeficiente de correlación de Pearson con  $p \leq 0,05$ .

Para el diseño central compuesto empleado se empleó el programa Design-Expert 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) para ajustar un modelo de segundo orden, generar el gráfico de superficie de respuesta y determinar diferencias significativas entre factores.



**Capítulo 3**

**Caracterización fisicoquímica  
del bagazo de manzana y  
ensayos preliminares**



### **3.1. Caracterización fisicoquímica del bagazo de manzana**

A lo largo del presente trabajo se utilizaron tres bagazos correspondientes a tres cosechas diferentes (2010, 2012 y 2014). El acondicionamiento del bagazo de manzana se realizó según lo descrito en la sección 2.2.1. El secado se realizó a 50°C durante 12 h, lapso que permitió llegar a peso contante. Esta temperatura permitió minimizar los cambios en las propiedades funcionales y en el contenido de componentes bioactivos. Figuerola y col. (2005) informaron que a temperaturas inferiores a 65°C se reducía la pérdida o reacciones de polifenoles, taninos, antocianinas y carotenos. Estos autores utilizaron un túnel de secado de aire a 60°C para la deshidratación de bagazo de manzana y de diferentes cítricos (Figuerola y col., 2005). Una vez seco el material fue molido y tamizado para eliminar las partículas más grandes. El rendimiento del secado fue 15% (el contenido original de agua del BM fue de 85%) y del tamizado 43%.

Como producto, se obtuvo un polvo aromático y de color marrón (Figura 3.1.).



**Bagazo de manzana húmedo**



**Bagazo de manzana seco**

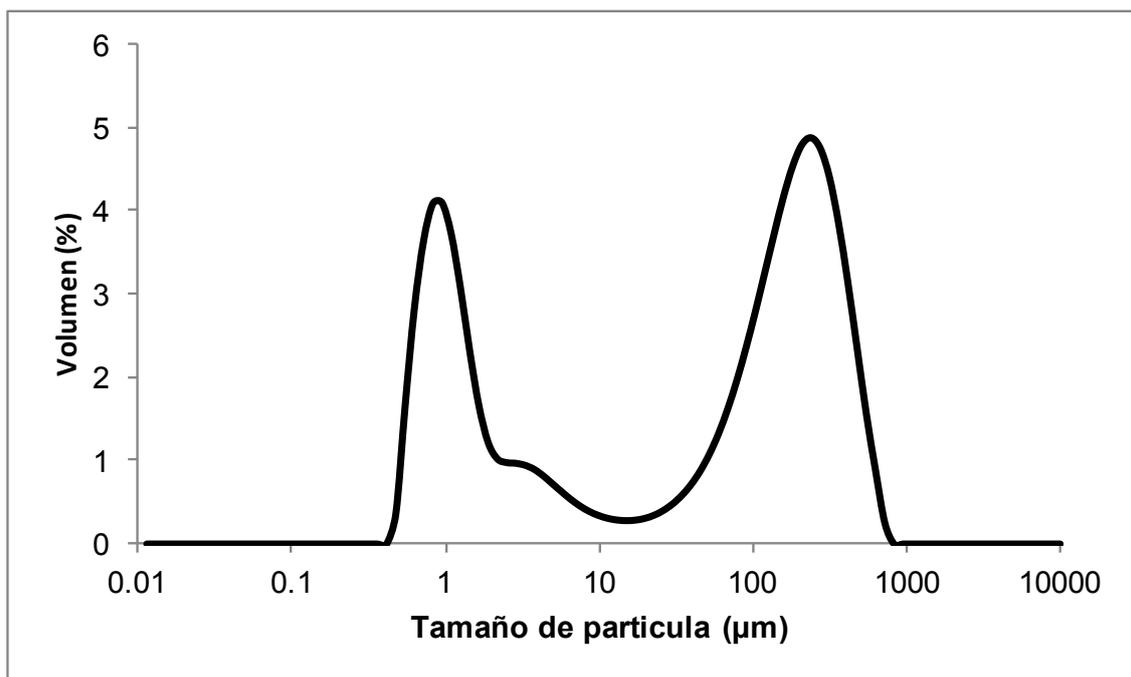
**Figura 3.1.** Bagazo de manzana húmedo y bagazo de manzana acondicionado (cosecha 2012).

### 3.1.1. Características físicas

#### Tamaño de partícula

Las muestras de bagazo de manzana fueron tamizadas para asegurar un tamaño de partícula inferior a 250  $\mu\text{m}$ , y se determinó la distribución de tamaño de partícula del BM que fue utilizado en la mayor parte del trabajo experimental de esta tesis (cosecha 2012). La distribución presentó dos poblaciones mayoritarias, con diámetros de Sauter de 0,84  $\mu\text{m}$  para la población principal y 241,03  $\mu\text{m}$  para el resto de la población de partículas, además se encontró una pequeña población que se aprecia en forma de hombro (desdoblamiento) y que corresponde a un tamaño aproximado de 2,8  $\mu\text{m}$  (Figura 3.2.).

Los valores de tamaño de partícula informados en la literatura son variables, debido a los diferentes tipos de rotura mecánica aplicados. Wu y col. (2014), que han informado valores superiores (208-525  $\mu\text{m}$ ), utilizaron un molino coloidal mientras que en el presente trabajo se utilizó un molino de martillos de escala piloto.



**Figura 3.2.** Distribución de tamaño de partícula del bagazo de manzana deshidratado, molido y tamizado (2012).

## Color

Uno de los atributos del BM deshidratado que más inciden en la calidad sensorial del producto final es su color. El BM que llega desde planta tiene una coloración parda (Figura 3.1) pero ésta se intensifica con el tratamiento.

Se determinó el color del producto obtenido con un colorímetro de superficie para las tres cosechas. Los parámetros se muestran en la Tabla 3.1.

Los bagazos de manzana del año 2010 y 2014 presentaron una luminosidad más alta que el del año 2012, de igual manera el índice de pardeamiento fue significativamente mayor para la cosecha 2012 con respecto a los otros dos años. El producto del año 2012 presentó un color más rojizo (que se evidencia en el mayor valor de  $a^*$ ) que los otros dos años, aunque no se observaron diferencias significativas en el parámetro  $b^*$  que describe el componente de color amarillo del material. Las diferencias de color en el producto final pueden deberse a la concurrencia de diferentes factores, uno de ellos es la diferencia en la materia prima (BM), que presenta variaciones en la composición química como se verá más adelante. También pueden influir ligeras diferencias que se puedan haber registrado durante en el procesamiento en el laboratorio. No obstante, los valores de luminosidad se encuentran dentro de los rangos informados por otros autores para (49,4-69,8) bagazo de manzana (Carson y col., 1994; Schieber y col, 2003; Lavelli, 2012).

**Tabla 3.1.** Parámetros de color de los polvos de bagazo de manzana acondicionados

Año de cosecha	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Índice de pardeamiento
2010	68,95±0,70 <sup>b</sup>	5,93±0,1 <sup>1b</sup>	21,86±0,37 <sup>a</sup>	43,27±1,35 <sup>a</sup>
2012	55,91±2,86 <sup>a</sup>	9,48±0,37 <sup>c</sup>	20,86±1,37 <sup>a</sup>	58,04±7,75 <sup>b</sup>
2014	67,52±0,59 <sup>b</sup>	5,60±0,06 <sup>a</sup>	21,08±0,55 <sup>a</sup>	42,36±1,65 <sup>a</sup>

± DE Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas

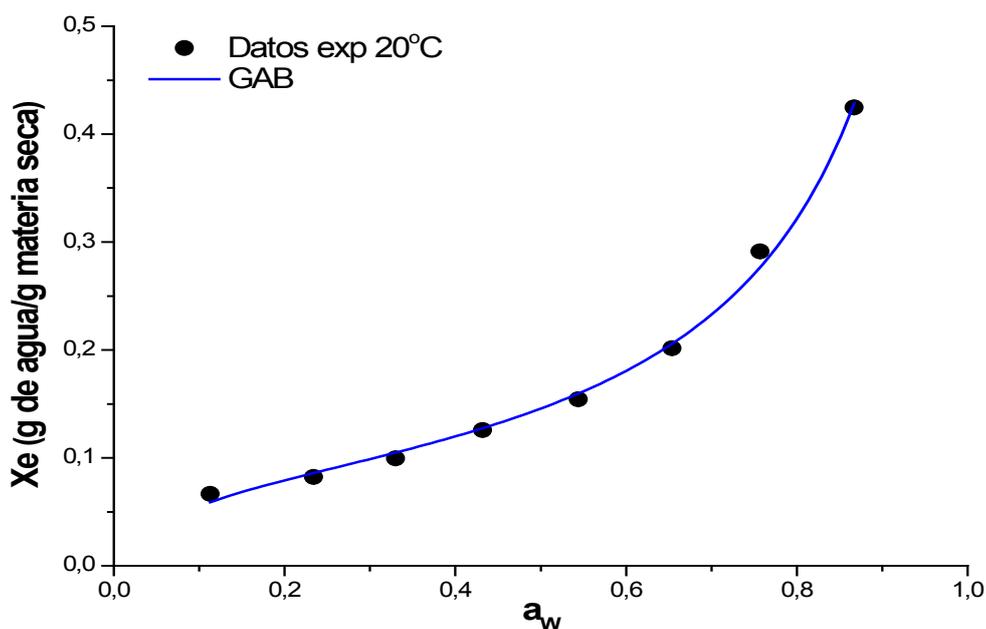
El color marrón del BM es originado por la oxidación de los polifenoles que se encuentran naturalmente en la fruta, reacción catalizada por la enzima polifenoloxidasas y que conduce al desarrollo de coloraciones entre amarillo y anaranjado durante el procesamiento de la manzana para la obtención de jugos y sidras. Es una reacción que requiere presencia de oxígeno. El primer producto de oxidación de los polifenoles son las quinonas, las cuales después sufren una serie de reacciones de polimerización que conducen a la formación de pigmentos. La floridzina,

como se mencionó en la Introducción, es el principal polifenol del BM y su oxidación enzimática conduce a la producción de pigmentos de color amarillo. Inclusive, este pigmento obtenido del BM se utiliza en la industria del té negro y productos del cacao (Nicolas y col., 1994; Ridgway y col., 1997; Bhushan y col., 2008). Además del pardeamiento enzimático, el BM podría sufrir un pardeamiento no enzimático como consecuencia de las reacciones de caramelización y Maillard las cuales ocurren frente al tratamiento térmico, en presencia de azúcares (la primera), y de azúcares reductores y aminoácidos o residuos aminados de proteínas (la segunda).

### **Actividad acuosa del producto e isotermas de sorción**

La actividad acuosa es un parámetro determinante en la estabilidad del producto. Se considera que 0,83 es el límite de seguridad microbiológica, que queda establecido por la ausencia de microorganismos patógenos en particular el *Staphylococcus aureus* el cual es uno de los patógenos humanos más resistentes (FDA, 2012). Por otro lado, por debajo de 0,5 se ve inhibido el desarrollo de microorganismos en general. Por otro lado a bajas actividades acuosas también se inhiben otras reacciones de deterioro, como las de hidrólisis y pardeamiento. La actividad de agua del BM deshidratado vario entre 0,4 y 0,5.

La isoterma de sorción de un producto a una temperatura constante, relaciona gráficamente el contenido de humedad de equilibrio de un producto con la actividad termodinámica del agua del mismo, ya que en equilibrio, este último parámetro es igual a la humedad relativa del aire que rodea al producto. Las isotermas son importantes para el análisis y diseño de varios procesos de transformación de alimentos, tales como secado, mezcla y envasado de los mismos. Igualmente la determinación de las isotermas tiene importancia para predecir los cambios en la estabilidad de los alimentos así como en la elección del material de empaque adecuado (Zhang y col., 1996; Gálvez, y col., 2006).



**Figura 3.3.** Isotermas de sorción (20°C) para el bagazo de manzana cosecha 2012

En la Figura 3.3. podemos ver los puntos experimentales y la isoterma de adsorción obtenidos para el BM y los puntos experimentales. Chen y col. (1988) compararon propiedades fisicoquímicas de diferentes tipos de producto ricos en fibra (fibra de manzana comercial, salvado de trigo y salvado de avena) y de acuerdo a las isotermas de sorción que determinaron a 20°C informaron que la fibra de manzana es considerablemente más higroscópica que los salvados de trigo y arroz; esta diferencia fue atribuida por los autores a las diferencias estructurales de los materiales de la pared celular de los salvados de cereales y las fibras de las frutas. En el presente trabajo, para un valor de  $a_w=0,87$  correspondió una humedad de producto de 0,42 g/g de materia seca. Este valor fue similar al hallado por los autores mencionados para un  $a_w$  de 0,9.

Los datos experimentales tuvieron el mejor ajuste con el modelo GAB. Las isotermas de sorción del BM obtenidas presentaron una forma típica, correspondiente a isotermas tipo II, ó tipo sigmoide según la clasificación BET, el cual es un tipo encontrado en la mayor parte de los alimentos (Mathlouthi y Rogé, 2003).

El análisis matemático de la ecuación de GAB realizado por Lewicki (1997) indica que para que el modelo describa adecuadamente un comportamiento sigmoideal y asegurar que los valores de  $X_m$  calculados y los reales no difieran más del 15.5% entre sí, los rangos de validez de las constantes K y C deben ser:  $0,24 < K(\text{GAB}) < 1,00$

y  $5,6 < C(\text{GAB}) < \infty$ . A efectos del modelado se siguió el procedimiento de Demarchi y col. (2014).

La calidad del ajuste del modelo propuesto se evaluó por medio del coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) que arrojó un valor de 0,99, indicando un buen ajuste con los valores experimentales. Los valores hallados para las constantes de la Ec. 2.8 fueron:  $X_m$  (contenido de agua de la monocapa)= 0,090; C (constante de Guggenheim) =13,293, K (factor de corrección)=0,93. Estos valores están dentro de los rangos sugeridos por Lewicki (1997) y fueron similares a los encontrados por Lavelli y col. (2012) quienes caracterizaron BM proveniente de dos variedades (Red delicious y Golden delicious) y encontraron al aplicar el modelo de GAB valores de  $K=1$  y de la constante  $C=8,2$ .

### **3.1.2. Características químicas**

Se evaluó la composición química del BM deshidratado siguiendo métodos oficiales de la AOAC (2001); los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

La variabilidad en el contenido de los diferentes componentes en los frutos en general se relaciona esencialmente con dos factores. El primero tiene que ver con características intrínsecas del fruto: tipo, calidad y estado de madurez en el momento de la cosecha. El segundo factor dependerá del proceso de industrialización, sobre todo de las condiciones de presión, temperatura, humedad y demás variables de proceso (Gasa y Catrillo, 1991). En particular, los azúcares solubles aumentan con el estadio de maduración aunque no de la misma manera en todos los casos, como ha sido documentado por Del Campo et al. (2006) para diferentes variedades de manzana. La fibra dietaria es afectada por el grado de maduración ya que durante esta etapa se sintetizan enzimas pectolíticas y celulasas que degradan estas fibras produciendo el ablandamiento del fruto (El-Zoghbi, 1994) y el tipo de procesamiento ya que calentamientos a altas temperaturas pueden depolimerizar la pectina. Por último, la separación de ciertas fracciones del fruto (semillas, piel, carpelos) durante el procesamiento inciden en la composición final del producto (Colin-Henrion et al., 2009).

De los componentes del BM, interesa particularmente el contenido de fibra dietaria total (FDT) y de fibra cruda (FC). Se encontró un contenido de FDT para la cosecha de 2012 dentro de los valores registrados por Bhushan y col. (2008) los cuales realizaron una revisión de diferentes BM caracterizados por diferentes investigadores. Para las cosechas 2010 y 2014 los valores de FDT (b.s.) fueron superiores al del 2012 y se

observó una disminución del nivel de azúcares. Esta variación registrada en el 2012 se debió probablemente a una modificación en el proceso de obtención del jugo que fue informada por los productores (comunicación personal). El BM una vez obtenido después de la primera extracción suele rehumectarse para extraer más azúcares solubles y adicionarlos al jugo. Si este paso no se efectúa queda un BM más rico en azúcares de bajo PM (y también en fibra soluble) lo que produce un efecto de disminución de la proporción de fibra sobre la masa total. Si se analizan los valores de fibra cruda (esencialmente celulosa) se observa que el porcentaje sobre la FDT varía con el año de cosecha entre 59 y 64%. El menor porcentaje correspondió a 2012, año en que no se realizó la extracción adicional del BM y por la tanto éste puede haber quedado enriquecido también en fibra soluble. El contenido de FDT para el año 2012 (47,73% , b.s.) fue algo inferior al registrado por Sudha y col. (2007) que fue de 51,10 % (b.s.) para un BM proveniente de una industria de jugo de manzana en la India. Este material fue obtenido sin separar el pedúnculo, piel y semillas por lo que el contenido de fibra sería más alto que el del presente trabajo. Los contenidos altos de fibra encontrados en tres cosechas consecutivas confirman entonces que esta materia prima (BM) podría utilizarse como una fuente alternativa de fibra en diferentes tipos de productos.

Los carbohidratos diferentes de fibra fueron calculados por diferencia. Los azúcares presentes en la manzana fresca son fructosa, y en menor grado sacarosa y glucosa, con valores típicos de 6,04; 3,78 y 1,17 % (p/p b.h.) respectivamente (Fennema, 2000). Los azúcares mencionados representan en la manzana fresca (con piel) aproximadamente el 73% del total de sólidos (considerando un 85% de agua y 15% de sólidos) mientras que la fibra constituye alrededor del 20% de los sólidos. Teniendo en cuenta el proceso de obtención del jugo, gran parte de los azúcares quedarán en el jugo extraído y eso hace que los valores encontrados en el BM sean sustancialmente menores. Aun así, son suficientes para impartir un sabor dulce al producto.

Los contenidos de proteína y cenizas en base húmeda fueron valores superiores a los reportados por Sudha *et al.* (2007) (2,06%) pero que se encuentran dentro del rango de lo hallado por Bhushan *et al.* (2008) (2,94-6,57 %, b.s.) Los lípidos son un componente minoritario en este material, variando entre 1,39 y 2,47%.

El pH de la dispersión de BM en agua fue de 3,66±0,01 (BM 2010), 4,00±0,01 (BM 2012), 3,83±0,01 (BM 2014).

**Tabla 3.2.** Composición proximal del bagazo de manzana deshidratado (en base húmeda).

Año de cosecha	humedad (g/100g)	proteína (g/100g)	Fibra dietaria (g/100g)	Fibra cruda (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Lípidos (g/100g)	carbohidratos (diferencia) (g/100g)(*)
2010	5,88±0,27	4,69±0,02	67,91±0,47	41,35±2,60	0,84±0,01	1,39±0,10	19,29
2012	14,02±0,06	4,28±0,02	41,04±1,02	24,10±1,15	1,77±0,02	2,47±0,18	36,42
2014	7,15±0,06	7,03±0,05	62,85±0,15	40,26±1,31	1,39±0,01	2,01±0,29	19,57

± DE (\*) distintos de fibra dietaria, no se tuvo en cuenta fibra cruda ya que está incluida dentro de fibra dietaria

El contenido de polifenoles del BM 2010 fue de 1,88±0,15 (mg ácido gálico equivalente/g de muestra). Este valor fue menor que lo informado por otros estudios (Sudha *et al* 2007), sin embargo, estas diferencias pueden explicarse por la variabilidad del material biológico de partida y por efecto del tratamiento térmico durante el procesamiento en la industria. Sudha *et al.* (2007) y Yan *et al.* (2013) han demostrado que temperaturas mayores a 60°C disminuyen el contenido de compuestos fenólicos, pues existe la posibilidad de que se presenten procesos de condensación oxidativa o descomposición termolábil.

Esta variabilidad debe ser tenida en cuenta a la hora de formular un producto enriquecido con BM como fuente de fibra y en caso de poder aplicarse este subproducto como componente alimentario debería plantearse su estandarización previa a la comercialización a efectos de uniformar el contenido de fibra y hacer predecible su comportamiento.

### **3.1.3. Ensayos microbiológicos sobre el bagazo de manzana**

En la Tabla 3.3. se muestran los resultados de los recuentos microbiológicos para mesófilos aerobios totales y hongos y levaduras, que son los predominantes en este tipo de productos, en bagazo de manzana sin procesar (85% de humedad) y bagazo de manzana procesado (alrededor de 14% de humedad, aw= [0,4-0,5] ). Se hicieron recuentos antes y después del autoclavado. Se observa que el tratamiento térmico produjo una disminución de más de tres ciclos logarítmicos en ambos casos. El BM

procesado por su pH y actividad acuosa resultaría un producto seguro por estar restringido el desarrollo de microorganismos patógenos; el crecimiento de los microorganismos patógenos se produce con actividades de agua superiores a 0,86. No obstante, de industrializarse el BM habría que introducir el sistema de análisis de peligros y control de puntos críticos (HACCP) en el proceso de tratamiento de este subproducto.

**Tabla 3.3.** Recuentos microbiológicos para bagazo de manzana sin procesar (BMSP), sin procesar autoclavado (BMSPA), procesado (BMP) y procesado autoclavado (BMPA).

	UFC/g			
	BMSP	BMSPA	BMP	BMPA
<b>Aerobios mesófilos totales</b>	8,80X10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>2</sup>	4,9 X10 <sup>5</sup>	<10 <sup>2</sup>
<b>Hongos y levaduras</b>	4,13X10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>2</sup>	1,9X10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>2</sup>

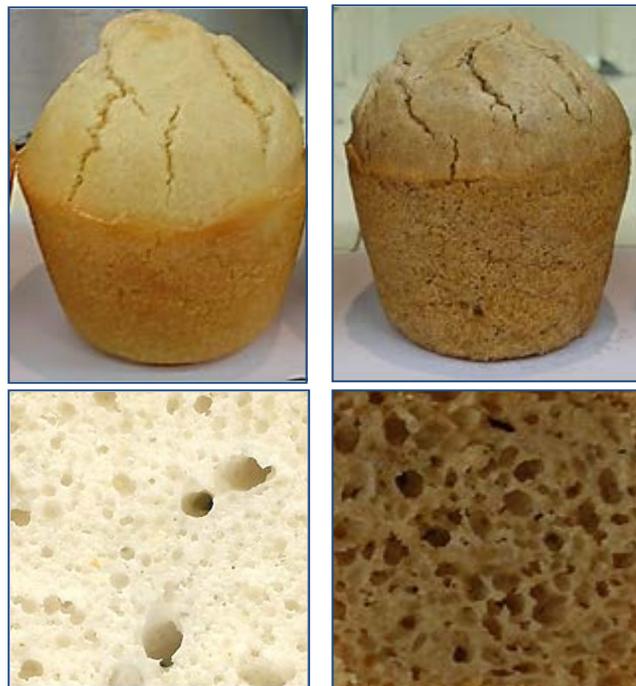
### **3.2. Ensayos preliminares para la elección de fuente proteica y perfil del producto**

En los panificados sin gluten, la calidad y cantidad de proteína agregada en la formulación es relevante ya que ésta es principalmente la responsable de reemplazar al gluten y de generar una matriz viscoelástica capaz de retener el gas generado durante la fermentación.

En una primera etapa el objetivo fue determinar cuál era la mejor fuente proteica a utilizar entre las distintas variantes disponibles comercialmente. Como fuentes proteicas se analizaron derivados lácteos y clara de huevo deshidratada (CH), por contener proteínas de buen valor biológico y funcionalidad. Como se mencionó en la introducción (sección 1.2.2.1.) existen numerosos trabajos sobre panes libres de gluten hechos con otras fuentes de proteínas, algunas de origen vegetal (como proteína de soja). En este estudio se limitó la selección entre ingredientes que contuvieran proteínas de origen animal y de fácil disponibilidad.

Los ensayos preliminares se realizaron con el primer bagazo recibido, correspondiente a cosecha 2010, conteniendo un 72 % de fibra dietaria (b.s.). Se utilizó una formulación optimizada en estudios previos (Ferrero y col. 2009). Las proporciones de los distintos ingredientes fueron 45 % de cada fécula/harina y 10% de fuente proteica

en los panes sin bagazo y 40% de cada fécula/harina, 10% de fuente proteica y 10% de BM en los panes enriquecidos con fibra. Como aditivos mejoradores se utilizaron una celulosa modificada y emulsificante (CMC y SSL). La cantidad de agua fue ajustada a 100 mL cada 100 g de fécula/harina+fuentes proteica+bagazo. Con cantidades menores de agua no se obtuvieron volúmenes y textura de miga aceptables y se produjo resquebrajamiento de la corteza superior. En las Figura 3.4. y 3.5. se muestra el aspecto de algunos de los productos obtenidos, con proteína láctea o clara de huevo (las piezas tuvieron pesos similares, entre 44 y 45 g).



**Figura 3.4.** Productos obtenidos con suero de leche bajo en lactosa sin (a) y con (b) bagazo de manzana. Las fotos inferiores muestran las características de las migas, en sección transversal.



**Figura 3.5.** Productos obtenidos con clara de huevo deshidratada sin (a) y con (b) bagazo de manzana. Las fotos inferiores muestran las características de las migas, en sección transversal.

La Tabla 3.4., exhibe la altura y volumen específico de los productos obtenidos con las diferentes fuentes proteicas. El volumen específico al utilizar leche en polvo fue significativamente inferior al resto de las formulaciones; los volúmenes obtenidos con ambos sueros de leche utilizados y clara de huevo fueron equivalentes.

**Tabla 3.4.** Parámetros de calidad panadera para panes libres de gluten con diferente fuente proteica y adición de bagazo de manzana

Fuente proteica	Peso (g)	Altura (cm)	Vol. específico (cm <sup>3</sup> /g)
Suero de leche bajo en lactosa	44,99*±0,41**	4,71±0,18 <sup>a</sup>	1,78±0,02 <sup>b</sup>
Suero de leche micro particulado	43,64±0,89	4,47±0,13 <sup>a</sup>	1,79±0,11 <sup>b</sup>
Leche en polvo	44,93±0,76	4,60±0,37 <sup>a</sup>	1,38±0,15 <sup>a</sup>
Clara de huevo	44,08±0,46	4,69±0,25 <sup>a</sup>	1,81±0,02 <sup>b</sup>

\*Los promedios corresponden a 10 piezas de pan de una misma panificación.

\*\*Desviación estándar; letras diferentes dentro de una misma serie indican diferencias significativas (p <0,05).

Un problema adicional de los productos panificados sin gluten es la tendencia que tienen a presentar un color más claro de la corteza (Gallagher y Gormley, 2002). Se ha demostrado que la inclusión de polvos lácteos en panes libres de gluten contribuye al oscurecimiento de la corteza, debido a que favorecen las reacciones de pardeamiento, tanto de Maillard como de caramelización (Gallagher y col., 2003 a).

Sin embargo, casi todas las fracciones lácteas han sido descritas como reductoras del volumen del pan; este efecto negativo disminuye si se aumenta el grado de desnaturalización que presenten estas fracciones proteicas, que varía de acuerdo al tratamiento térmico aplicado o a la utilización de altas presiones (Harper y Zadow, 1984; Erdogdu-Arnoczky y col., 1996; Kadharmestan y col., 1998; Kenny y col., 2000; Singh y col., 2003; Esteller y col., 2006). Un aspecto importante que debe ser considerado en el desarrollo de formulaciones sin gluten a base de productos lácteos es la lactosa contenida en ellos. Las personas con enfermedad celíaca pueden desarrollar intolerancia a la lactosa, lo que se debe al daño significativo de las microvellosidades intestinales, que es donde se genera la enzima lactasa (Gallagher y col., 2004). Por lo tanto, los productos que contienen alta concentración de este disacárido no serían los más adecuados para ellos.

Teniendo en cuenta los inconvenientes del uso de derivados lácteos y el hecho de que los volúmenes obtenidos con estos derivados y con CH no fueron significativamente diferentes, se optó por la clara de huevo (CH) como fuente proteica.

Diversas investigaciones (Kobyłański y col., 2004; Crockett y col., 2011; Licciardello y col., 2012) destacan el poder de la clara de huevo como agente espumante. Las proteínas globulares de la clara son usadas ampliamente en sistemas aireados para estabilizarlos y brindar características deseables; en particular son útiles en diferentes productos horneados. Yang y Foegeding (2010) compararon los cambios microestructurales producidos en un producto tipo bizcochuelo por dos fuentes proteicas, clara de huevo y aislado de suero de leche y encontraron que la clara de huevo estabilizaba el tamaño de las burbujas de los batidos, mientras que en los batidos preparados con suero de leche continuaba el crecimiento de las mismas, lo que ocasionaba una estructura de miga más rústica. Por estas razones, en productos horneados libres de gluten se ve favorecido el volumen del producto final y un adecuado alveolado con la incorporación de clara.

### 3.2.1. Perfil de producto: formulaciones con NaCl o sacarosa

Una vez elegida la fuente proteica se focalizó el desarrollo en el perfil del producto. Si bien se pensó inicialmente en un producto sin sacarosa agregada, el BM le confiere al pan un ligero sabor dulce. Por ello, con el objeto de mejorar las características organolépticas del pan y resaltar el sabor que naturalmente le confiere el BM, se ensayó una formulación con 10% bagazo de manzana (BM) + 10% sacarosa (SAC) (sin NaCl) y se comparó frente a una formulación con 10% BM+ 2%NaCl, y a un control sin bagazo de manzana (0%BM + 2%NaCl). En la Tabla 3.5., se presentan los resultados de las panificaciones realizadas utilizando el mismo contenido de agua en las tres formulaciones (100 % sobre la base HA+FM+CH).

La adición de bagazo disminuyó el volumen específico tanto en las muestras con NaCl agregada como con sacarosa, sin que se presentara diferencias significativas entre estas dos formulaciones.

**Tabla 3.5.** Panificados con bagazo de manzana sin y con agregado de sacarosa

Mezcla	Humedad final (%)	Peso (g)	Altura (cm)	Vol. específico (cm <sup>3</sup> /g)
0% BM+2%NaCl	52,57*±0,25** <sup>b</sup>	42,79±0,42	5,92±0,13 <sup>c</sup>	2,43±0,12 <sup>b</sup>
10%BM+2%NaCl	52,29±0,32 <sup>ab</sup>	44,08±0,46	4,69±0,25 <sup>a</sup>	1,81±0,02 <sup>a</sup>
10%BM+10%SAC	50,85±0,48 <sup>a</sup>	43,92±0,69	5,43±0,23 <sup>b</sup>	1,89±0,13 <sup>a</sup>

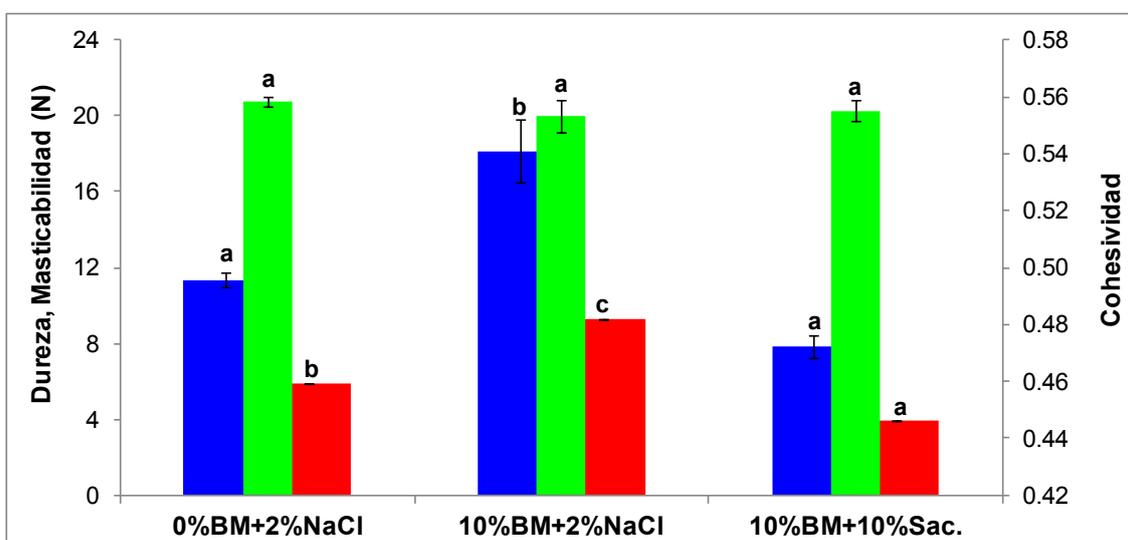
\*Los promedios corresponden a 10 piezas de pan de una misma panificación.

\*\*Desviación estándar; letras diferentes dentro de una misma serie indican diferencias significativas (p <0,05).

Se compararon además algunos atributos texturales de los dos perfiles de producto, entre sí y respecto a un control sin BM. En la Figura 3.6. se muestran los resultados obtenidos para dureza, masticabilidad y cohesividad de miga. Se encontró que la formulación con 10% de BM + 2% NaCl presentó una miga de mayor dureza y masticabilidad (dureza x cohesividad x elasticidad) respecto a la muestra 0%BM + 2% NaCl, indicando un efecto negativo del agregado de BM sobre la textura de miga. Sin embargo, el producto con 10% BM+ SAC presentó menores valores de dureza y masticabilidad, acercándose a los del producto control. La cohesividad es una propiedad relacionada con la fuerza de las uniones internas del material, en otras palabras, con la integridad del sistema (Abdelghafor y col., 2011). En el caso de la miga de pan, una baja cohesividad se relaciona con una estructura que se desgrana

fácilmente. Las distintas formulaciones no presentaron diferencias entre sí en este atributo.

De acuerdo a estos ensayos, un producto con agregado de sacarosa tendría mejores características texturales que el producto sin agregado de este azúcar, aun en presencia de la fibra aportada por el BM. Por otro lado, si bien no se realizaron estudios de análisis sensorial se percibió una mejora del perfil de sabor con la sacarosa en tanto que en los productos con sal, ésta destacaba el sabor a clara de huevo. Por lo tanto en los estudios posteriores se trabajó con formulaciones conteniendo sólo sacarosa.



**Figura 3.6.** Evaluación de los parámetros texturales de miga: dureza (N) (azul), masticabilidad (N) (rojo), cohesividad (adimensional) (verde). Diferentes letras dentro de la misma serie indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Durante la panificación de formulaciones libres de gluten existen generalmente dos etapas, la primera antes de la gelatinización del almidón, que incluye la mezcla de los ingredientes, la fermentación y la primera parte del horneado, y la segunda etapa se da después de la gelatinización del almidón. Durante la primera etapa el aire es incorporado durante el mezclado, las burbujas quedan suspendidas y estas aumentarán de tamaño durante la fermentación. Un objetivo que se debe cumplir para tener un buen volumen de pan es prevenir la coalescencia de estas burbujas. El objetivo del hidrocoloide agregado como mejorador es aumentar la viscosidad de la fase líquida de modo de evitar la coalescencia hasta que se produzca la gelatinización

del almidón durante el horneado (Schober, 2009). De los hidrocoloides que pueden cumplir con este objetivo se optó por una formulación con una celulosa modificada. Una vez elegida la fuente proteica y el perfil del producto, se evaluó la celulosa modificada a utilizar. Mezaize y col. (2009), en donde compararon la adición de distintos hidrocoloides en una formulación base de harinas libres de gluten para la obtención de un pan libre de gluten de tipo francés, los hidrocoloides utilizados fueron carboximetilcelulosa (CMC), HPMC, goma guar y goma xántica. El mayor volumen específico de pan fue obtenido con adición de HPMC (3,3 cm<sup>3</sup>/g), el cual presentó diferencias significativas con el obtenido por CMC (2,46 cm<sup>3</sup>/g). En el presente trabajo, a diferencia de los mencionados autores, con fórmulas sin BM se obtuvieron volúmenes equivalentes para las fórmulas con CMC y con HPMC (3,24 y 3,27 cm<sup>3</sup>/g, respectivamente) y en el orden de los obtenidos por Mezaize y col. (2009). Se optó por continuar los ensayos con HPMC, por su carácter no iónico y la abundante literatura sobre panes sin gluten que incluyen este hidrocoloide, lo que permitiría comparar resultados. El HPMC es un hidrocoloide que difiere de otros por la presencia de superficies activas, que son originadas por la presencia de grupos hidrofóbicos laterales (grupos metilo e hidroxopropil) sobre la cadena hidrofílica de celulosa. Las sustancias con superficies activas tienden a estabilizar espumas, ya que ayudan a dispersar el aire y de esta manera favorecer la formación de burbujas más pequeñas, y prevenir su coalescencia. Este efecto se suma al que ejerce sobre la viscosidad este hidrocoloide (Schober, 2009).



## **Conclusiones parciales**

El mínimo procesamiento aplicado al subproducto recibido de la industria brindó un polvo de color pardo, aromático, con un aw entre 0,4 y 0,5. La composición resultó variable, según el año de cosecha, fundamentalmente en el contenido de fibra y de azúcares solubles.

Al comparar las distintas panificaciones con BM como fuente de fibra y diferentes fuentes proteicas (suero de leche, leche en polvo, clara de huevo deshidratada), se encontró que los panes con mejores características (volumen, textura de miga) fueron los elaborados con clara de huevo, hecho atribuible a su capacidad como agente espumante. Cuando se compararon panificados libres de gluten sin y con bagazo de manzana, estos últimos presentaron atributos de calidad diferentes, como menor volumen, un color más oscuro y un sabor ligeramente dulce. El agregado de sacarosa mejoró el sabor del producto obtenido. A pesar de que el agregado de fibra constituye una carga adicional a la matriz sin gluten, resulta interesante que comparando con el control sin bagazo, la dureza no fue alterada significativamente por la adición de BM cuando se adicionaba además sacarosa.



**Capítulo 4**

**Caracterización de los batidos  
y productos horneados libres  
de gluten**



#### **4.1. Características microscópicas de los batidos**

En las masas a base de harina de trigo y agua, el gluten absorbe aproximadamente dos veces su peso en agua durante el amasado y genera una red tridimensional y viscoelástica que permite estabilizar las celdas de gas generadas durante el mezclado y retener los gases formados durante la fermentación. Este rol de la red proteica permite la formación de la estructura alveolar de la miga, responsable de sus principales características texturales (firmeza, elasticidad, cohesividad).

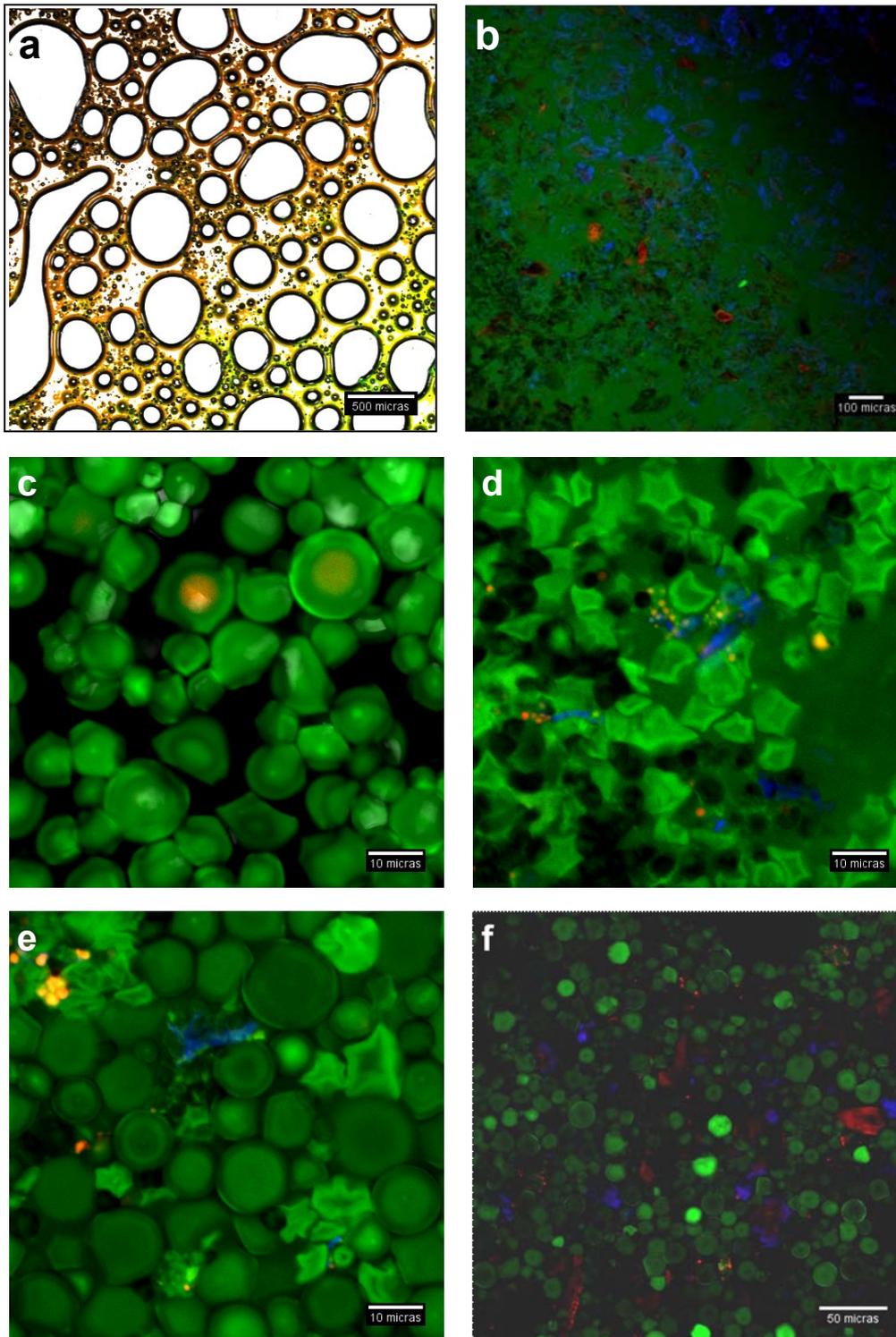
Por otro lado, en los sistemas libres de gluten, al no existir esa red viscoelástica, se debe buscar estabilizar estas celdas para evitar que se produzca su coalescencia a medida que se expanden durante la fermentación. Un punto clave en este tipo de productos es lograr un aumento de la viscosidad de la fase continua, lo que es posible debido a la utilización combinada de hidrocoloides y proteínas (Mills y col., 2003; Van Riemsdijk y Van der Goot, 2011). Es esta compleja composición la que permite que los batidos libres de gluten puedan generar, al ser horneados, una estructura esponjosa similar a la de la miga del pan convencional.

En cuanto al uso de emulsificantes, que son sustancias que por su composición química poseen características tanto lipofílicas como hidrofílicas, es ampliamente aceptado que la capacidad de reducir la retrogradación del almidón durante el almacenamiento de los productos panificados está relacionada con su capacidad para formar complejos de inclusión con la amilosa. La amilosa una vez complejada no participa en la formación de gel y en la recristalización, por lo tanto la adición de emulsificantes afecta a la estructura de la red de amilosa formada después de la cocción (Goesaert y col., 2005).

Un primer paso para el abordaje del estudio estructural de estos sistemas es la observación microscópica. El desarrollo de nuevas técnicas, en particular la microscopía láser confocal de barrido (CLSM), ha posibilitado el estudio de distintas microestructuras sin el uso de métodos de preparación de muestras complicados e invasivos que distorsionan el sistema observado. Entre las estructuras que se pueden analizar se encuentran los gránulos de almidón (Chen y col., 2009). En el presente trabajo, se analizó cualitativamente la estructura de los batidos, mediante CLSM. En una primera instancia, se analizaron los principales componentes del batido por separado para estudiar su morfología y la especificidad frente a la tinción con los diferentes fluoróforos utilizados. Para esta etapa se utilizaron concentraciones de los

componentes mayores que las correspondientes a los batidos. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

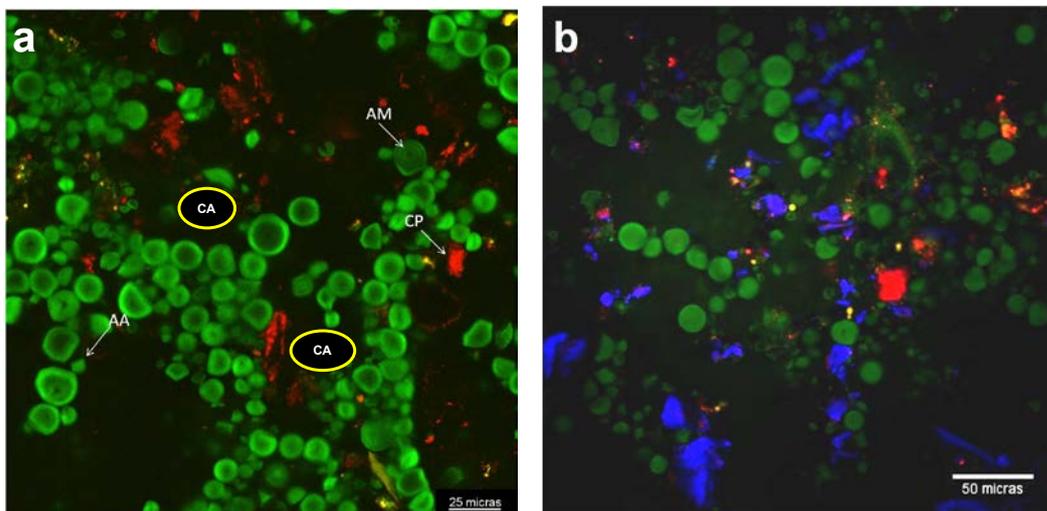
En la Figura 4.1.a se aprecia el aspecto de una espuma (dispersión de burbujas de gas dentro de un líquido) que forma la CH disuelta en agua y batida, teñida con FITC+Rodamina B. Se puede ver que la fase continua se encuentra teñida con una coloración amarillo-rojiza que es más intensa en la interfase burbujas de aire-agua. La Rodamina B es un colorante específico para proteínas pero podría también existir cierta afinidad de éstas con el FITC que explique el color observado. Debido al tratamiento térmico sufrido durante su procesamiento industrial y de acuerdo a los resultados del análisis térmico que se le realizó a la CH (que se tratará específicamente en el capítulo 5) podemos decir que la clara se encuentra parcialmente desnaturalizada; esto implica un cambio conformacional que puede favorecer sus propiedades funcionales. Así, con respecto a su rol en la formación y estabilización de una espuma, las proteínas funcionan como agentes tensioactivos mediante su adsorción en la interfase aire/agua creada durante la formación de las burbujas, que es el fenómeno que se puede apreciar en la Figura 4.1.a. Durante y después de la adsorción inicial se empiezan a establecer interacciones proteína-proteína en la interfase lo que puede resultar en la formación de una red que promueve la estabilidad de las burbujas (Foegeding, y col., 2006; Davis y Foegeding, 2007). Este tipo de estructura es muy importante para brindar textura y estructura a diferentes productos alimentarios dentro de los que se incluyen tortas, panificados o productos aireados como los merengues. El BM (Figura 4.1.b) presenta una estructura de aspecto heterogéneo; los fragmentos de la pared de la células vegetales tienen afinidad por el Calcofluor White (coloración azul-celeste) si bien también se observó afinidad por FITC (coloración verde de fondo). La presencia, aunque minoritaria, de cuerpos proteicos o conteniendo proteína se pudo detectar con tinción con Rodamina B (estructuras irregulares teñidas de rojo o amarillo-rojizo). En las micrografías c y d de la Figura 4.1. se aprecian los resultados de la tinción de FM y de HA, respectivamente, con la mezcla de los tres colorantes. Los gránulos de almidón, en ambos casos, se tiñeron selectiva y exclusivamente con FITC, de color verde. Se destaca la diferencia en la morfología de ambos tipos de gránulos, más grandes y esféricos los de mandioca y más pequeños, irregulares y poliédricos los de arroz. Estas diferencias coinciden con las informadas por otros autores (Moorthy, 2002, Singh y col., 2003). Además, en el caso de HA, se ven estructuras teñidas de color amarillo-rojizo, aisladas o agrupadas, que podrían ser proteínas insolubles de la harina.



**Figura 4.1.** Micrográficas de: a) CH batida (sólidos:agua= 1:1) (4x); b) BM (BM:agua= 1:3) (40x, zoom 4); c) FM (sólidos:agua= 1:1) (40x, zoom 4) d) HA (sólidos:agua= 1:1) (40x, zoom 4).e) FM+HA f) FM+HA+BM a: teñida con FITC y Rodamina B; b-f: teñidos con FITC, Rodamina B y Calcofluor White (sólidos:agua = 1:1)

En esta micrografía se observan además estructuras irregulares teñidas de azul-celeste, que se encuentran preferentemente ubicadas en los intersticios entre gránulos, que pueden ser asignadas a fragmentos de pared celular. Producto de la molienda, las paredes celulares del endosperma almidonoso se fragmentan y al ser ricas en  $\beta$ -glucanos pueden ser teñidas por el Calcofluor White, como ha sido informado por otros autores (Katina y col., 2006; Kamal-Eldin y col., 2009). La Figura 4.1.e muestra una mezcla de FM y HA donde se observan las estructuras antes descritas y en la Figura 4.1.f (en una escala menos ampliada) el efecto del agregado de BM que aporta, como se mencionó, fragmentos de pared vegetal (en celeste) y cuerpos proteicos (en rojo).

Las observaciones anteriores permitieron identificar los componentes en las formulaciones completas utilizadas para los productos, de las cuales se muestran dos ejemplos en la Figura 4.2. En la Figura 4.2.a se observa una formulación de batido antes de ser sometido al tratamiento térmico, donde las estructuras teñidas de rojo por la Rodamina B serían los cuerpos proteicos aportados por la harina de arroz y el bagazo y se observan los gránulos de almidón de mandioca (más grandes) y de arroz (más pequeños, formando agregados) teñidos en verde por el FITC. En la Figura 4.2.b se observa con otro aumento un batido teñido simultáneamente con los tres colorantes utilizados.



**Figura 4.2.** Micrografía de batido de dos formulaciones a) (17,8%BM, 120%A) del diseño experimental sin levadura (63x). Teñidos con FITC, Rodamina B, donde CP: cuerpos proteicos, AM: almidón de mandioca, AA: almidón de arroz, CA: celda de aire y b) batido (20%BM, 132,5%A), teñido con FITC, Rodamina B y Calcofluor White (40x).

En ambas figuras, la proteína de CH así como la HPMC se encuentran disueltas. Debido a su baja proporción no llega a visualizarse la tinción de la CH como sí pudo lograrse en los ensayos previos donde se la utilizó en una mayor concentración (Figura 4.1.a). La grasa de la margarina está emulsionada y en baja proporción y no fue específicamente teñida por lo cual no resulta visible. Las celdas de aire se aprecian como zonas oscuras, de contornos redondeados, que constituyen junto con el agua el fondo de las micrografías.

Estos ensayos corroboran que los batidos para productos horneados libres de gluten, pueden ser considerados como una combinación compleja de varios tipos de sistemas materiales: una dispersión, una solución, una emulsión y una espuma. En el caso del presente trabajo, en estado disperso se hallan suspendidos los gránulos de almidón de la fécula de mandioca; los componentes provenientes de la harina de arroz: gránulos de almidón, cuerpos proteicos, fragmentos de pared; los componentes insolubles del bagazo de manzana; y la levadura. Se encuentran disueltos: las proteínas de la clara de huevo, la sacarosa adicionada, los glúcidos solubles provenientes del bagazo de manzana (glucosa, fructosa, parte de la pectina), y el hidrocoloide utilizado como aditivo (HPMC). La fase grasa adicionada a la formulación (aceite vegetal de la margarina) quedaría en forma de emulsión aceite en agua, aunque se trata de un componente minoritario. El aire incorporado durante el batido forma una espuma estabilizada por parte de los componentes mencionados.

Estos ensayos permiten inferir que el comportamiento esperado desde el punto de vista reológico correspondería a un sistema disperso donde las proteínas de la CH, la celulosa modificada y parte de la fibra soluble del BM, aportan viscosidad a la fase continua, estabilizando la espuma y la emulsión.

## **4.2. Ensayos reológicos sobre los batidos**

La metodología de superficies de respuesta ha sido empleada en productos libres de gluten para el desarrollo y optimización de formulaciones basadas en diversos ingredientes. Gallagher y col (2004) la han aplicado en panificados compuestos por harina de arroz, almidón de papa, leche en polvo descremada y HPMC. Se ha utilizado para el análisis de la interacción entre componentes (grasa, huevo, y soja) en formulaciones libres de gluten con harina de maíz y almidón de mandioca (Milde y col., 2010). Recientemente se empleó para evaluar los efectos del bagazo de naranja y la cantidad de agua, en los parámetros de calidad de un panificado libre de gluten a base

de harina de arroz y almidón de papa (O'Shea y col., 2015). Marco y Rosell (2008) han utilizado esta metodología para evaluar la acción de la enzima transglutaminasa sobre formulaciones a base de harina de arroz enriquecidas con aislados proteicos de soja y arveja. La gran mayoría de los trabajos sobre el tema caracterizan los productos finales y no las formulaciones sin hornear (batidos).

De acuerdo con lo descrito en la sección 2.2.3.2.1. se utilizó un diseño central compuesto, con triplicado del punto central variando las proporciones de bagazo de manzana (BM) entre 5 y 20 % y de agua (A) entre 115 y 150 % (en base a 100 g de mezcla HA+FM+CH) para preparar las distintas formulaciones y se analizaron tanto los aspectos reológicos de los batidos como los atributos de los productos cocidos.

#### **4.2.1. Ensayos dinámicos oscilatorios sobre los batidos**

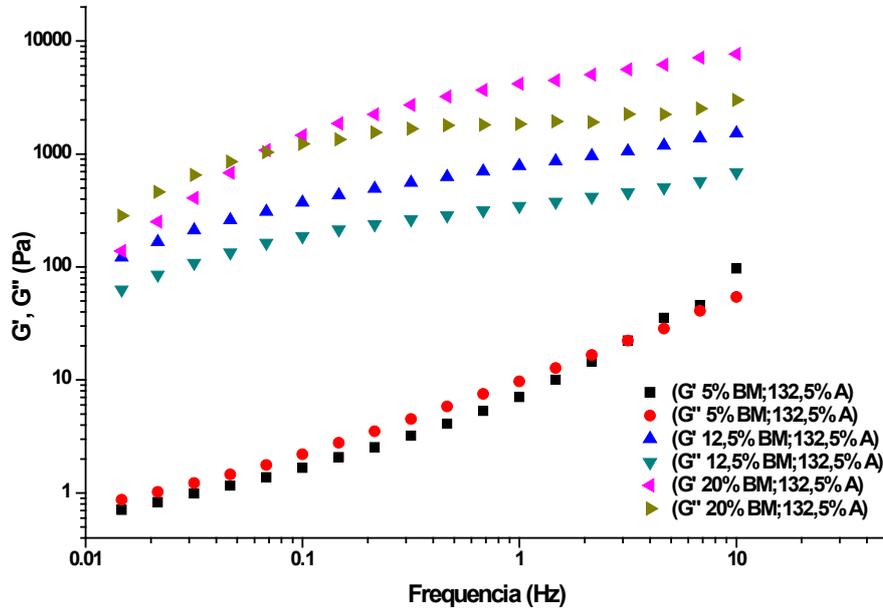
En las Figuras 4.3. a y b se muestran los espectros mecánicos de batidos seleccionados del diseño experimental obtenidos con dos niveles diferentes de agua (132,5 y 120,1 g de agua cada 100 g de FM+HA+CH) y con diferentes niveles de BM (en un rango de 5 a 20 g cada 100 g de FM+HA+CH). Los barridos de frecuencia se realizaron a un esfuerzo constante de 0,1 Pa, dentro del rango de viscoelasticidad lineal. Estos ensayos se realizaron con BM proveniente de la cosecha 2012.

El tipo de comportamiento viscoelástico de los batidos fue pronunciadamente afectado por los niveles de BM y de agua. A un nivel constante de agua, mayores cantidades de BM, condujeron a mayores valores de ambos módulos (elástico y viscoso). En los mayores niveles de BM (17,8 y 20%), ambos módulos  $G'$  y  $G''$  presentaron una dependencia de la frecuencia y además se observó un punto de cruce entre los módulos que se localiza a una frecuencia de 0,22 Hz para el sistema con 17,8% de BM y a 0,06 Hz para el sistema con 20% de BM. Este comportamiento ha sido descrito como característico de los sistemas poliméricos concentrados (Ross-Murphy, 1988). En este caso, si bien se trata en su mayor parte de un sistema particulado como se describió en la sección anterior, la presencia de fibra soluble proveniente del BM y la celulosa modificada (HPMC) así como la proteína (CH) utilizados pueden producir una respuesta típica de los sistemas poliméricos.

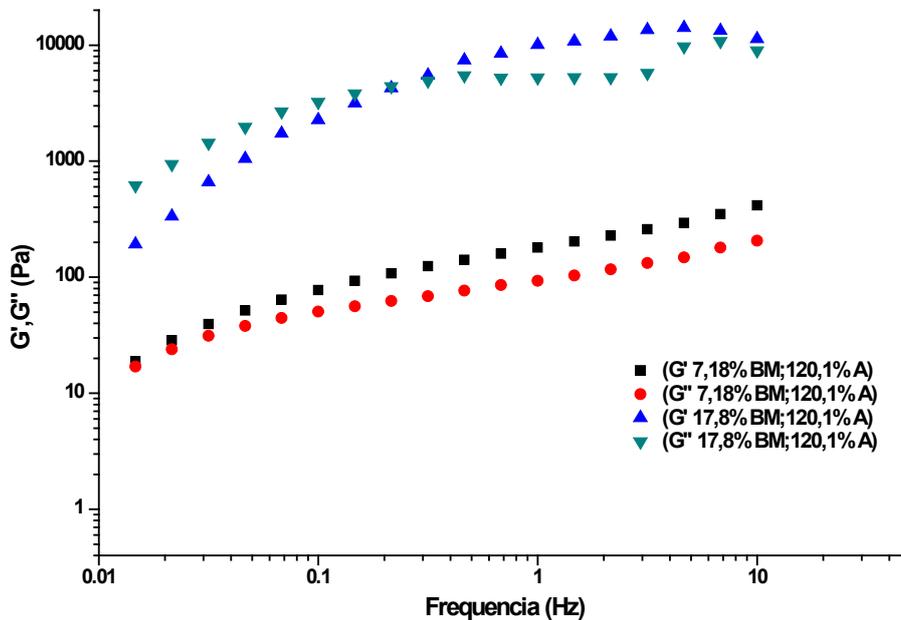
A frecuencias por debajo del punto de cruce, el módulo viscoso ( $G''$ ) fue mayor que el módulo elástico ( $G'$ ). Esta conducta se explica porque en esta zona, correspondiente a las frecuencias más bajas, el sistema puede recuperar una configuración de equilibrio dentro de la escala de tiempo del experimento, por lo que el comportamiento resulta

predominantemente viscoso (Lapasin y Pricl, 1995). Después del punto de cruce, se encontró un comportamiento opuesto y predominó el modulo elástico  $G'$ , con una

a)



b)



**Figura 4.3.** Espectros mecánicos para los batidos con diferentes niveles de bagazo de manzana (BM) y agua (A). Contenido de fibra dietaria total de BM: 41,04%.

tendencia hacia una meseta como se puede apreciar bien en la Figura 4.3.b para los sistemas con mayor contenido de fibra. La presencia de esta zona de meseta es típica de los enredamientos entre las cadenas de polímeros. El enredamiento determina una estructura que queda fijada como si fuera una red tridimensional. Este sistema, al estar “fijado” queda caracterizado por un módulo elástico prácticamente invariante (Lai y col. 2008) que es lo que ocasiona la meseta. Se puede observar al comparar los espectros obtenidos para el punto (20% BM; 132,5% A) (Figura 4.3.a) con el obtenido para el punto (17,8% BM; 120,1 % A) (Figura 4.3.b), que el punto de cruce aparece a menores frecuencias para el sistema más concentrado. Este desplazamiento del punto de cruce está indicando una tendencia a una respuesta predominantemente más elástica dentro del rango de ensayo al aumentar la concentración de sólidos en el sistema.

En niveles intermedios de BM (7,18%; 12,5 %), el módulo dinámico elástico  $G'$  siempre resultó mayor que el viscoso  $G''$ , dentro del rango de medición ensayado, aunque mostrando una ligera dependencia de la frecuencia por lo que este comportamiento se acerca más al característico de un gel. A menores niveles de BM (5%) y sin restricción de agua (132,5%), se observó un incremento tanto de  $G'$  como de  $G''$  con la frecuencia, y hubo una contribución similar de ambos módulos a la respuesta viscoelástica global del sistema.  $G''$  fue ligeramente mayor que  $G'$  durante casi todo el rango de medición, y el cruce aparece a una frecuencia mayor, alrededor 3 Hz. Estas características se acercaría más al comportamiento de un fluido viscoelástico. Estos resultados muestran una importante influencia de la concentración del bagazo de manzana y del nivel de agua sobre el tipo de comportamiento reológico de los batidos. La fibra del bagazo de manzana está compuesta principalmente por polisacáridos de la pared vegetal: celulosa, hemicelulosas, lignina, pectinas (Vendruscolo y col., 2008; Lavelli y Kerr, 2012), siendo solubles sólo parte de estos componentes (Esposito y col, 2005). Respecto a los componentes poliméricos, Lazaridou y col. (2007) estudiaron el efecto de la adición de diferentes hidrocoloides (CMC, agarosa, pectina, goma xántica y  $\beta$ -glucano de avena) en la reología de sistemas libres de gluten, y encontraron que la adición de estos polímeros implicó el uso de mayores cantidades de agua, para obtener una masa de consistencia adecuada. Sin embargo, estos autores informaron que los sistemas libres de gluten presentaban mayores valores de  $G'$  con el incremento de la concentración del hidrocoloide mostrando que es principalmente el aumento del nivel de hidrocoloide lo que afecta las propiedades reológicas del sistema, más que el incremento del contenido de agua.

El comportamiento de sistemas como el descrito en esta tesis, es decir sistemas particulados inmersos en una solución de polímeros ha sido descrito por otros autores. Mohammadifar y col. (2006) observaron un comportamiento similar al encontrado en este trabajo para dispersiones de goma tragacanto. Los sistemas con este hidrocoloide presentan la particularidad de ser una mezcla de dos fracciones, un 35% de parte soluble (tragacantina) y un 65% de parte insoluble (basorina). La mezcla de ambas fracciones da como resultado un comportamiento en donde  $G'$  es ligeramente mayor a  $G''$  en todo el rango de frecuencia estudiado. En una matriz muy diferente se encontraron tendencias similares. Lantto y col. (2006) agregaron BM (conteniendo 50% de fibra) a un homogenizado de carne de cerdo, encontrando que incrementaba el modulo elástico  $G'$ , en todos los rangos de frecuencias estudiados.

Los espectros mecánicos de cada uno de los puntos del diseño se modelaron según las ecuaciones potenciales propuestas por Steffe (1996) y descritas en la sección 2.2.4.1. de Materiales y Métodos. En muchos textos sobre viscoelasticidad, los comportamientos de sistemas reales tratan de ser descritos mediante la combinación de modelos de resorte (sólido ideal) y amortiguador (líquido ideal). Desafortunadamente esto no es muy útil ya que si bien la mayoría de los datos experimentales pueden ser ajustados con dos términos de decaimiento exponencial, esto no significa que las constantes obtenidas tengan, en general, algún significado físico. Por el contrario resulta a veces más útil comparar el comportamiento viscoelástico con espectros mecánicos registrados para sistemas típicos, como lo son las soluciones de polisacáridos y los geles (Ross-Murphy, 1988).

En la Tabla 4.1. se resumen los valores típicos de a, b, c y d correspondientes a las ecuaciones 2.19 y 2.20, informados por Steffe (1996), para un rango similar de frecuencias a las utilizadas en este trabajo (expresadas en radianes/segundo). Estas ecuaciones permiten describir globalmente el comportamiento de los sistemas clasificándolos en los tres grandes grupos: gel, sistema polimérico concentrado, solución diluida.

En la Tabla 4.2. se exhiben los parámetros obtenidos mediante regresiones no lineales aplicando las ecuaciones potenciales a los espectros de los distintos batidos del diseño experimental.

**Tabla 4.1.** Coeficientes típicos de las ecuaciones potenciales en función de la frecuencia de los módulos de almacenamiento ( $G' = a \omega^b$ ) y de pérdida ( $G'' = c \omega^d$ ) para distintos sistemas según Steffe (1996)

Material	a (Pa s <sup>b</sup> )	b (-)	c (Pa s <sup>b</sup> )	d (-)
Solución diluída	0,00028	1,66	0,01186	0,934
Solución concentrada	16,26	0,840	27,78	0,520
Gel	5626	0,0371	344,7	0,0145

**Tabla 4.2.** Tipificación del comportamiento reológico de los batidos de acuerdo a la clasificación de Steffe (1996)

BM (%); A (%)	$G' = a \omega^b$			$G'' = c \omega^d$		
	a	b	R <sup>2</sup>	c	d	R <sup>2</sup>
5;132,5	1,87±0,03	0,85±0,02	>0,97	2,84±0,05	0,69±0,03	>0,99
12,5;132,5	529±179	0,33±0,03	>0,94	320±170	0,25±0,04	>0,87
7,18;120,1	95±20	0,35±0,01	>0,99	56±14	0,30±0,02	>0,99
17,82;120,1	3977±843	0,36±0,03	>0,74	3871±1158	0,18±0,06	>0,42
12,5;115	1699±214	0,32±0,02	>0,89	884±236	0,23±0,08	>0,63
12,5;150	36±4	0,41±0,02	>0,99	22±1	0,42±0,01	>0,99
17,82;145	567±46	0,26±0,01	>0,99	232±44	0,26±0,04	>0,98
20;132,5	2019±700	0,35±0,05	>0,94	1405±184	0,16±0,01	>0,83
7,18;145	211±108	0,57±0,11	>0,95	170±82	0,51±0,12	>0,94

±DE los parámetros son promedio de al menos duplicados

Los parámetros informados son los promedios de los obtenidos al aplicar la regresión sobre cada espectro. El R<sup>2</sup> informado es el mínimo obtenido entre los triplicados de cada punto. Se observa que, en general, hubo un ajuste satisfactorio. Las desviaciones estándar fueron altas, probablemente por la falta de suficiente uniformidad entre muestras, dada la heterogeneidad del sistema. A pesar de esto, los valores permitieron evaluar el comportamiento reológico ya que las diferencias informadas por Steffe son de más de un orden de magnitud entre solución diluida, solución polimérica y gel.

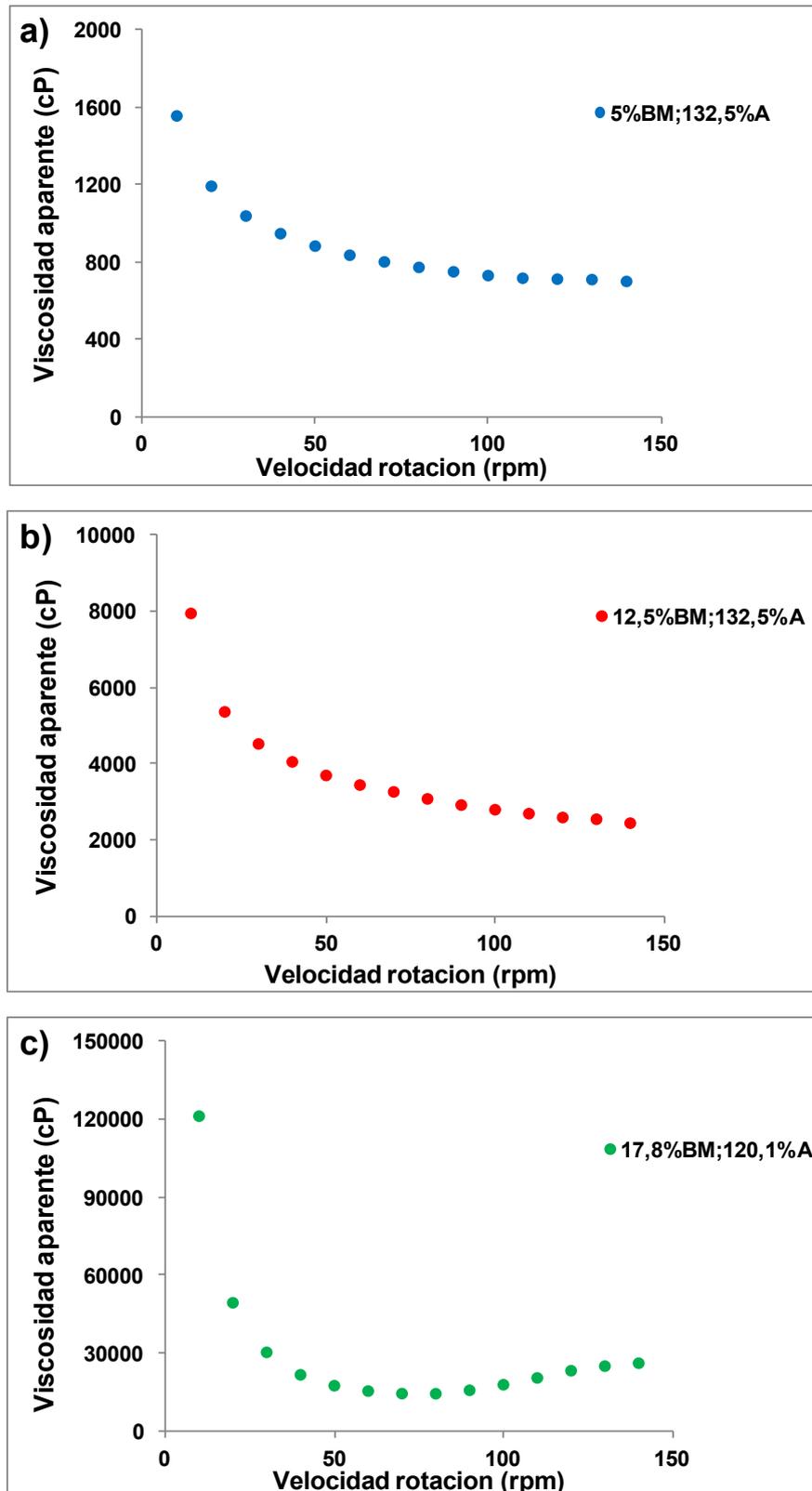
Los parámetros obtenidos, que permiten caracterizar las curvas de los espectros globalmente, difieren de acuerdo al contenido de fibra y agua. Aquellos sistemas con mayor contenido de fibra en relación al agua presente (17,8%BM; 120,1%A) (12,5%BM; 115%A) (20%BM; 132,5%A) mostraron valores altos de los parámetros **a** y **c**. A diferencia de los valores característicos para los geles (Tabla 4.1) los obtenidos en este caso para **a** y **c** fueron del mismo orden entre sí y los exponentes **b** y **d** resultaron un orden mayor que los informados por Steffe para geles. Esto indica que los sistemas tienen un comportamiento intermedio entre el de gel y el de una solución concentrada típica. Los valores obtenidos son coherentes con el tipo de estructura observado en las micrografías (Figura 4.2), de una dispersión compleja, con celdas de aire que difiere de una estructura tridimensional ordenada, con agua atrapada, característica de un gel. El sistema con menor contenido de BM y por lo tanto de fibra (5%BM; 132,5%A) fue el que presentó valores más bajos de los parámetros **a** y **c** y valor más alto de los exponentes **b** y **d** respecto a los sistemas con más fibra (mayor cantidad de BM).

Si bien se trató de obtener las superficies de respuesta con valores de  $G'$  y  $G''$  tomados a frecuencias seleccionadas (0,1 Hz, 1Hz) y con los parámetros **a** y **c** de las ecuaciones 2.19 y 2.20, se obtuvo una falta de ajuste significativa en todos los casos ( $p > 0,05$ ).

#### **4.2.2. Curvas de viscosidad**

Adicionalmente se obtuvieron los valores de viscosidad aparente en función de la velocidad de rotación (rpm) utilizando un viscosímetro rotacional (sección 2.2.4.2.) para algunos puntos del diseño. En este caso se utilizó BM del 2014, más rico en fibra (Tabla 3.2).

En la Figura 4.4., se muestran los gráficos obtenidos. Se observaron mayores viscosidades aparentes para los puntos con mayor concentración de sólidos (FM, HA, BM). Para el sistema de la Figura 4.4a la viscosidad aparente a 50 rpm fue de 880 cP; para el sistema correspondiente al punto central del diseño que presenta mayor cantidad de BM y por lo tanto con mayor cantidad de fibra, el valor encontrado para la viscosidad aparente a 50 rpm fue de 3681 cP. Hay que tener en cuenta en ambos casos que el BM utilizado tiene mayor contenido de fibra que el evaluado en los ensayos oscilatorios.



**Figura 4.4.** Viscosidad aparente de los batidos. a) (5%BM; 132,5%A); b) (12,5%BM; 132,5%A), c) (17,8%BM; 120,1%A). (BM 2014)

En las curvas de las Figuras 4.4.a y b se observa que la viscosidad disminuye (fluidificación) al aumentar la velocidad de cizallamiento lo que corresponde al comportamiento de un fluido no newtoniano tipo pseudoplástico. Este mismo comportamiento de fluidificación por cizalla se ha informado en batidos libres de gluten utilizados para la elaboración de galletas (Turabi y col., 2008). El comportamiento pseudoplástico ocurre cuando hay alineación de los componentes poliméricos en la dirección del flujo (Song y col., 2006). Al principio (bajas velocidades de cizalla) el sistema presenta resistencia al flujo al encontrarse las moléculas poliméricas entrelazadas pero a medida que aumenta la velocidad de cizallamiento los componentes se van alineando y la viscosidad disminuye.

Con una mayor concentración de bagazo de manzana (17,8%BM) y con restricción de agua (120,1%) (Figura 4.4.c), o sea en sistemas más concentrados, se observó un aumento considerable de la viscosidad aparente (17399 cP a 50 rpm) y el comportamiento resultó pseudoplástico hasta aproximadamente 70 rpm pero a mayor velocidad de cizalla se observó dilatancia (aumento de la viscosidad con el incremento del gradiente de velocidad de cizallamiento es decir, espesamiento por cizalla). De acuerdo a Boersma y col. (1990) para que aparezca dilatancia debe haber una transición de orden a desorden. Este tipo de comportamiento de flujo, menos frecuente que el pseudoplástico en alimentos, ha sido encontrado en suspensiones de almidón de trigo. En general, el comportamiento dilatante en sistemas a base de almidón ha sido atribuido a la rigidez que pueden presentar los gránulos, la suficiente para resistir el cizallamiento sin deformarse, con el consiguiente aumento de viscosidad (por mayor fricción) (Bagley y Christianson, 1982; Barrera y col., 2013).

### **4.3. Panificación con la fuente proteica seleccionada y bagazo de manzana**

En estos ensayos se utilizó el mismo BM que en los realizados con reómetro oscilatorio sobre los batidos; las formulaciones utilizadas en la panificación fueron las mismas que las de la sección 4.2.2. excepto que en la presente sección se incorporó la levadura.

#### 4.3.1. Caracterización de los panes

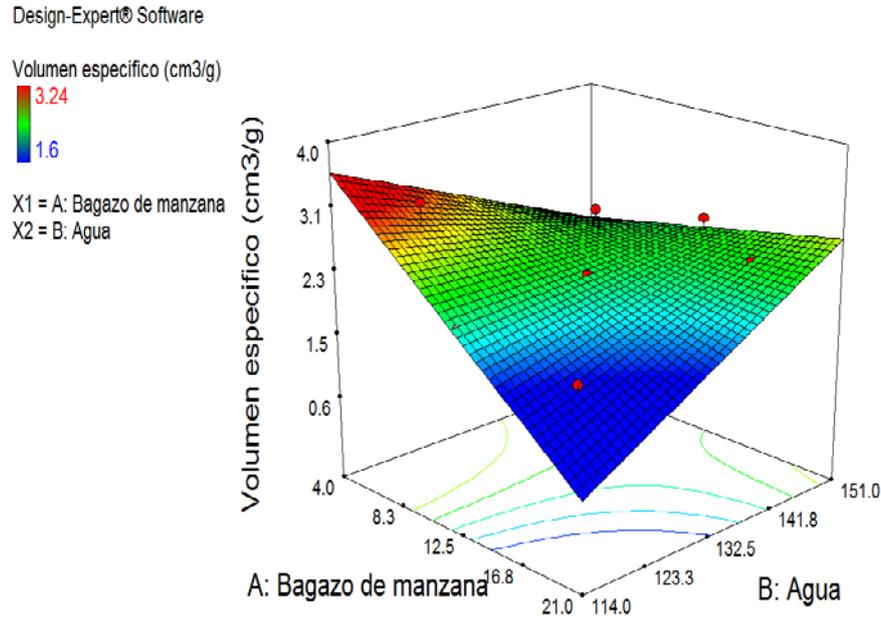
Debido a la ausencia de una red proteica como la presente en las masas de harina de trigo (gluten), la retención de CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación es difícil en los panes libres de gluten, esto conduce por lo tanto a productos con bajos volúmenes específicos y migas compactas (Brites y col., 2010; O'shea y col., 2015).

En la Figura 4.5., se muestra la superficie de respuesta para el volumen específico (Ve) de los panes. El modelo polinomial correspondiente presentó un R<sup>2</sup> ajustado superior al 70% (Tabla 4.3.). Como se puede observar en la Tabla el modelo polinomial para Ve contiene un término no significativo (b<sub>2</sub>) que corresponde al efecto del agua. Para la eliminación de términos en los modelos se siguió el principio jerárquico, por el cual se mantuvieron en el polinomio todos los términos que corresponden a efectos principales que intervienen en interacciones significativas (p<0,05), aun cuando el término principal no fuera significativo (p>0,05). En este caso existe un término de interacción significativo (b<sub>12</sub>) por lo cual se mantuvieron tanto b<sub>1</sub> como b<sub>2</sub>. La tendencia observada a través de la superficie indicó que incrementando el nivel de BM y reduciendo el nivel de agua, disminuía el volumen específico.

De acuerdo a diferentes autores, los volúmenes específicos obtenidos para panes libres de gluten, varían ampliamente en función de los diferentes ingredientes y el procedimiento de elaboración; se han informado valores entre 1,3 cm<sup>3</sup>/g y 1,6 cm<sup>3</sup>/g utilizando mezclas de harina de arroz con harina de amaranto y con harina de trigo sarraceno, respectivamente (Alvarez-Jubete y col., 2010) y 4,5 cm<sup>3</sup>/g utilizando mezclas de zeína y almidón de maíz (Andersson y col., 2011). Los volúmenes específicos obtenidos en la presente tesis oscilaron en el rango entre 1,6 y 3,2 cm<sup>3</sup>/g, valores que están en el orden de los informados para panes libres de gluten elaborados a partir de almidones de maíz y de arroz (Sabanis y Tzia, 2011a, b) y harinas comerciales de quinua, avena, teff, arroz, trigo sarraceno, maíz y sorgo (Hager y col., 2012). El volumen del pan depende de muchos factores tales como la viscosidad del batido, la relación amilosa/amilopectina y la presencia de componentes que pueden actuar en interfase como HPMC (con actividad superficial) o la agregación de proteínas por calentamiento (Schober, 2009).

La misma tendencia que para el Ve fue obtenida para la altura de pan, la cual varió en un rango de 3,8 cm a 6,2 cm, siendo las formulaciones con mayores niveles de BM las que presentaron menor altura. Las formulaciones con altos niveles de BM y bajos niveles de agua, presentaron una estructura compacta y corteza irregular en la parte

superior. Como el BM absorbe gran cantidad de agua, la falta de suficiente hidratación en el sistema puede conducir a que se produzcan migas y cortezas más secas.



**Figura 4.5.** Superficie de respuesta para el volumen específico (cm<sup>3</sup>/g) del pan libre de gluten en función de las cantidades de bagazo de manzana (BM) y agua (A)

**Tabla 4.3.** Coeficientes de regresión para el modelo empleado en la evaluación de los atributos de volumen específico (Ve)

Términos	Y (Variable dependiente)	
	Ve (cm <sup>3</sup> /g)	p
b <sub>0</sub>	11,70	
b <sub>1</sub>	-0,84	0,0052
b <sub>2</sub>	-0,06	0,2994
b <sub>11</sub>		-----
b <sub>12</sub>	5,81E-03	0,0165
b <sub>22</sub>		-----
<b>R<sup>2</sup> (ajustado)</b>	0,71	
<b>p-falta de ajuste</b>	0,05	

1: BM; 2: agua

### 4.3.2. Textura de la miga

Uno de los principales atributos que caracterizan la textura de la miga de un producto panificado es la dureza. Una miga demasiado dura ya sea por la formulación o debido a un proceso de envejecimiento del producto resulta inaceptable para el consumidor.

En los productos analizados, la falta de ajuste del modelo polinomial fue significativa para este atributo, por lo tanto no fue posible obtener una superficie de respuesta. Se analizaron entonces mediante ANOVA las diferentes formulaciones del diseño. En la Tabla 4.4. se informan los valores encontrados.

**Tabla 4.4.** Valores de dureza y masticabilidad para los distintos puntos del diseño experimental.

BM (%); A (%)	Dureza (N)	Masticabilidad (N)
20;132,5	25,42 <sup>e</sup>	11,49 <sup>d</sup>
17,8;120	27,71 <sup>e</sup>	12,57 <sup>d</sup>
12,5;132,5	2,55 <sup>bc</sup>	1,44 <sup>b</sup>
17,8;145	2,66 <sup>bc</sup>	1,69 <sup>bc</sup>
7,18;120	1,98 <sup>a</sup>	1,25 <sup>ab</sup>
7,18;145	2,12 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>a</sup>
12,5;150	3,21 <sup>cd</sup>	1,62 <sup>bc</sup>
12,5;115	2,37 <sup>ab</sup>	1,58 <sup>bc</sup>
5;132,5	3,90 <sup>d</sup>	2,06 <sup>c</sup>

BM: Bagazo de manzana, A: agua

Para la mayoría de los puntos del diseño la dureza varió entre 1,98 y 3,90 N, con diferencias significativas entre ellos; en las formulaciones con mayores niveles de BM y con restricción de agua (17,8%BM; 120,1%A) y (20%BM; 132,5%A), la dureza resultó más elevada alcanzando valores de 25,42 N hasta 27,71 N. Estos valores indican un efecto de endurecimiento por el agregado de BM y la simultánea restricción de agua.

Estos valores son comparables con los informados por Alvarez-Jubete y col. (2010) quienes encontraron durezas de miga entre 15 y 30 N para panificados libres de gluten elaborados a partir de mezclas de harina de arroz con distintas harinas de pseudo cereales (amaranto, quinua y trigo sarraceno). Crockett y col. (2011) informaron menores valores para dureza, entre 1 y 9 N en formulaciones elaboradas a base de

una mezcla de harina de arroz y almidón de mandioca y la adición diferentes cantidades de aislado proteico de soja o de clara de huevo deshidratada.

Además de la dureza, la masticabilidad suele utilizarse para describir globalmente las características de la miga. Se obtiene multiplicando dureza x elasticidad x cohesividad. Una masticabilidad demasiado alta puede resultar motivo de rechazo. Se halló para la masticabilidad una tendencia similar a la registrada para la dureza (Tabla 4.4.) encontrándose una variación entre 1,05 y 12,57 N. Otros autores, como Sabanis y col. (2009) encontraron un efecto de endurecimiento similar cuando elaboraron panes libres de gluten adicionados con fibras de diferentes fuentes (trigo, maíz, avena y cebada). Estos autores observaron que al emplear fibra de trigo se incrementaba la dureza, esto lo atribuían la mayor capacidad de absorción de agua de la fibra de trigo en comparación con las otras. La capacidad de absorción de agua de la fibra depende de su estructura, en particular de los grupos hidroxilo presentes (Wang y col., 2002).

Las superficies de respuesta para los atributos texturales de cohesividad y resiliencia se muestran en la Figura 4.6. a y b, respectivamente. Los coeficientes de los modelos se informan en la Tabla 4.5. Como se explicó anteriormente, se siguió el principio jerárquico para la eliminación de coeficientes no significativos.

La cohesividad está relacionada con la fuerza de los enlaces internos entre los componentes, y por lo tanto con la capacidad del sistema para mantener su integridad. En las migas es deseable una cohesividad relativamente alta para que no se produzca su desgranamiento frente a un corte. En las formulaciones estudiadas, este parámetro varió entre 0,504 y 0,582. La superficie de respuesta para este atributo muestra que para niveles altos de BM la cohesividad aumenta al incrementarse el nivel de agua pero cuando el nivel de BM es bajo se observa lo contrario, aumentar el agua reduce la cohesividad. Se puede ver que el coeficientes vinculado a la interacción entre el bagazo de manzana y agua es significativo.

La resiliencia, llamada también elasticidad instantánea, expresa la capacidad o habilidad del material para retornar a su forma original después de someterlo a un esfuerzo, es decir su capacidad de recuperación. Lo valores experimentales variaron entre 0,299 y 0,385 para este parámetro. Como en el caso de la cohesividad, a niveles altos de BM la resiliencia aumentó al incrementarse el contenido de agua pero a bajos niveles de BM se verificó el efecto contrario; de hecho las migas más resilientes fueron las de menor cantidad de BM y menor contenido de agua.

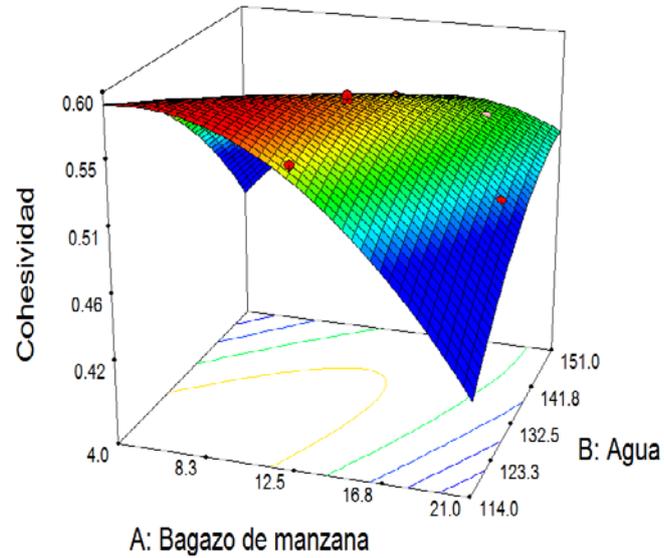
a)

Design-Expert® Software

Cohesividad



X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua



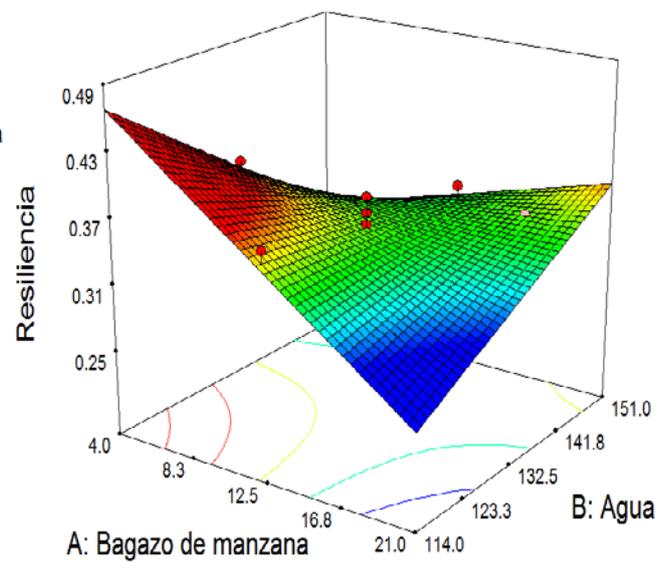
b)

Design-Expert® Software

Resiliencia



X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua



**Figura 4.6.** Superficies de respuesta para los atributos de textura: cohesividad (a), resiliencia (b) del pan libre de gluten en función de las cantidades de BM y agua.

**Tabla 4.5.** Coeficientes de regresión para el modelo empleado en la evaluación de los atributos textura: cohesividad y resiliencia

Términos	Y (Variables dependientes)			
	Cohesividad	p	Resiliencia	p
b <sub>0</sub>	0,05		1,25	
b <sub>1</sub>	-0,04	0,0007	-0,06	0,0218
b <sub>2</sub>	0,01	0,0440	-6,45E-03	0,2516
b <sub>11</sub>	-6,63E-04	0,0005	-----	
b <sub>12</sub>	3,77E-04	0,0003	4,60E-04	0,0165
b <sub>22</sub>	-6,46E-05	0,0085	-----	
R <sup>2</sup> (ajustado)	0,95		0,63	
p-falta de ajuste	0,61		0,29	

1: BM; 2: agua

### 4.3.3. Color

El color es una importante característica para los productos horneados ya que contribuye a la preferencia de los consumidores. En particular, en el caso de los panificados, el color dependerá de la formulación y de las reacciones que puedan ocurrir, además de las condiciones de horneado. Además de la oxidación enzimática, el BM se oscurece al deshidratarlo, por reacciones de pardeamiento no enzimático como Maillard, que ocurre por la presencia de azúcares, y compuestos aminados (aminoácidos y proteínas) (Kent y Evers, 1994; Gallagher y col., 2003 b) y reacciones de caramelización. En estas reacciones se forman melanoidinas.

Como fuera descrito en el Capítulo 3, el BM tiene un color pardo característico que contribuye al color de la miga en el producto final. Además del aporte de color del BM, durante el horneado se produce, como en otros productos panificados, pardeamiento en la corteza debido a la reacción de Maillard y a la caramelización.

En la Figura 4.7. se muestran las superficies de respuesta para el parámetro L\* (luminosidad) para corteza y miga. En la Figura 4.8. se muestran los parámetros a\* y b\* de miga. Los modelos que representan la superficie fueron lineales y sus coeficientes son mostrados en la Tabla 4.6.

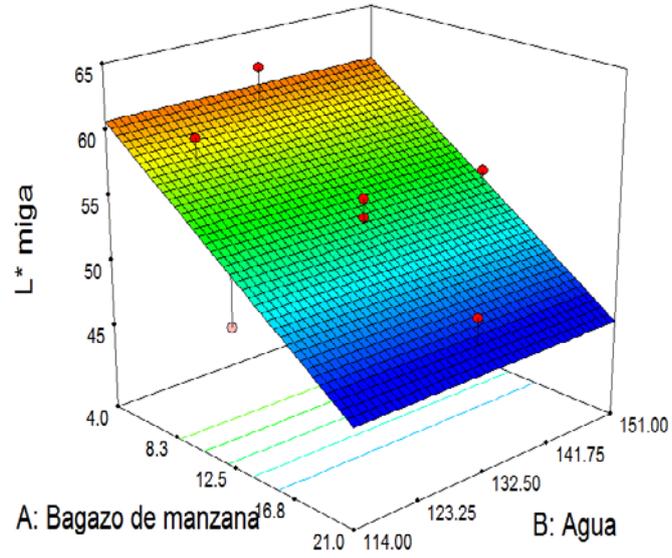
Los valores experimentales L\*, variaron en miga de 47,2 a 62,6, mientras que en corteza (más oscura) resultaron entre 28,4 y 38,7. Estos valores fueron similares a los informados por Demirkesen y col. (2010) en panes libres de gluten elaborados con

a)

Design-Expert® Software

L\* miga  
62.61  
47.24

X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua

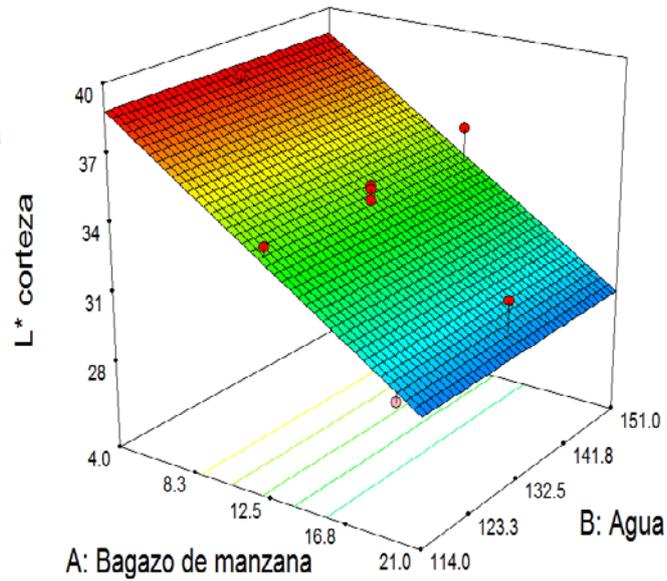


b)

Design-Expert® Software

L\* corteza  
38.7  
28.42

X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua



**Figura 4.7.** Superficies de respuesta para los el atributo de luminosidad de miga (a) y corteza (b) en función de las cantidades de bagazo de manzana (BM) y agua.

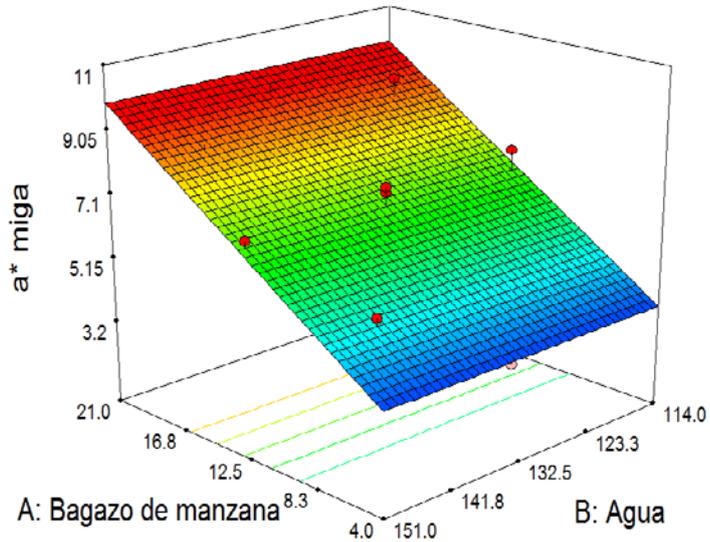
a)

Design-Expert® Software

a\* miga



X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua



b)

Design-Expert® Software

b\* miga



X1 = A: Bagazo de manzana  
X2 = B: Agua

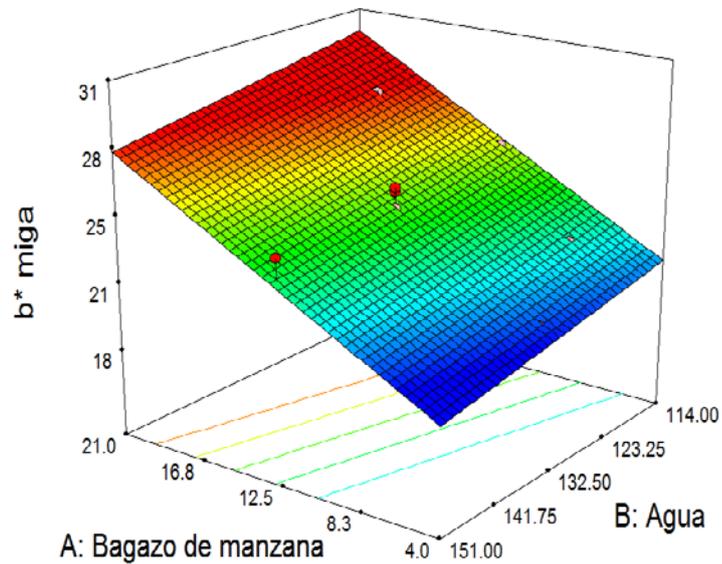


Figura 4.8. Superficies de respuesta para los atributos de color de la miga en función de las cantidades de BM y agua.

distintas relaciones de harina de arroz y harina de castaña, esta última de color pardo. Estos autores también encontraron una coloración marrón más intensa en la corteza y atribuyeron el mismo a reacciones de Maillard y caramelización, promovidas por la alta presencia de azúcares en la harina de castaña.

Tanto para miga como para corteza se encontraron similares tendencias: cuando se incrementa el nivel de bagazo de manzana el parámetro luminosidad (L) disminuye. La cantidad de BM influye mucho más marcadamente que la variación en la cantidad de agua. Por este motivo en los modelos de L para corteza y miga (Tabla 4.6.) se observa como único término significativo además de  $b_0$ , el que corresponde a BM ( $b_1$ ).

En formulaciones con altos niveles de BM, se obtuvieron valores positivos y elevados de los parámetros a y b para miga (Figura 4.8.), indicando por lo tanto un mayor pardeamiento. En el caso de a, también se observó un efecto significativo de BM y no del agua agregada.

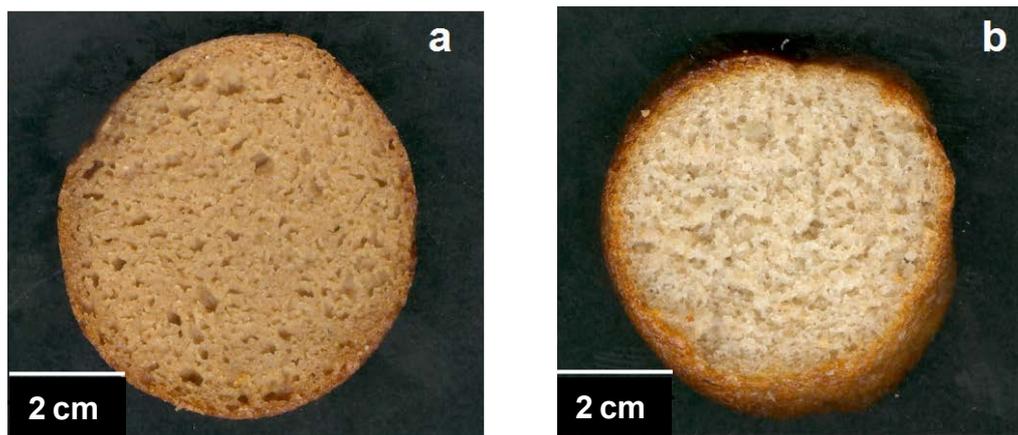
**Tabla 4.6.** Coeficientes de regresión para el modelo empleado en la evaluación del color

Términos	Y (Variables dependientes)							
	miga				corteza			
	L*	p	a*	p	b*	p	L*	p
$b_0$	64,26		2,28		25,98		36,73	
$b_1$	-0,88	0,006	0,36	0,0001	0,51	0,0001	-0,54	0,0002
$b_2$	-----		-----		-0,06	0,0234	-----	
$R^2$ (ajustado)	0,72		0,89		0,92		0,78	
p-falta de ajuste	0,16		0,42		0,32		0,05	

1: BM; 2: agua

#### 4.3.4. Análisis macroscópico y microscópico del alveolado de la miga

En la Figura 4.9., se muestra un ejemplo de la miga obtenida con dos niveles de BM y el mismo nivel de agua, se observa una miga más compacta y oscura (a) en el punto con mayor cantidad de BM (20%).



**Figura 4.9.** Fotografías de rodajas de pan libre de gluten correspondientes a dos puntos del diseño: a) 20%BM;132,5%A; b) 5%BM;132,5%A

Las características de los alvéolos en la miga no pudieron ajustarse a un modelo polinomial, por tal razón se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las diferentes formulaciones del diseño experimental (Tabla 4.7.). El menor tamaño promedio y la mayor densidad alveolar ( $\rho$ ) fueron obtenidos en las formulaciones con niveles altos de BM (17,8-20%) y de agua variando entre 120-132,5%. Estas formulaciones presentaron una miga más compacta, con menor fracción de aire (31,96 y 37,61 %). Estos resultados estarían señalando que en estas formulaciones el agua se encuentra en menor proporción que la necesaria.

En la Tabla 4.7. se observa que con ciertas proporciones de BM y agua (como en los casos de 12,5%BM; 132,5%A - punto central- y 17,8%BM; 145%A) se obtenían mejores características: una tendencia a mayores tamaños promedio de los alveolos (5,86 y 5,85 mm<sup>2</sup>), una menor densidad alveolar (10,01 y 9,20 alveolos/cm<sup>2</sup>) y la fracción de aire aumentaba significativamente (superando 50 % del total del área de miga). La miga resultante fue menos compacta, indicando que estas condiciones son de mejor balance BM/agua.

Estos resultados están confirmando una fuerte dependencia de las características de la miga respecto a la proporción entre BM y agua. La microestructura de los batidos discutida previamente explica estas observaciones. Al tratarlos térmicamente, y gelatinizar el almidón que es su componente sólido mayoritario, estos sistemas quedan estructurados como una dispersión de aire en sólido (una esponja), cuyas características dependerán de la composición y localización de los componentes en la pared interalveolar. Las formulaciones con mayor agregado de BM, y por lo tanto mayor cantidad de fibra y azúcares de menor PM, si no tienen agua suficiente resultan

demasiado viscosas y no permiten la expansión de las celdas de aire durante la fermentación, conduciendo, después de la cocción a migas más compactas.

**Tabla 4.7.** Análisis alveolar de la miga para las formulaciones del diseño experimental

BM (%); A (%)	Tamaño promedio (mm <sup>2</sup> )	Densidad (ρ) (alveolos/cm <sup>2</sup> )	% fracción aire
20;132,5	1,39 <sup>a</sup>	24,53 <sup>c</sup>	31,96 <sup>a</sup>
17,8;120	1,80 <sup>ab</sup>	23,61 <sup>c</sup>	37,61 <sup>ab</sup>
12,5;132,5	5,86 <sup>d</sup>	10,01 <sup>a</sup>	52,31 <sup>d</sup>
17,8;145	5,85 <sup>d</sup>	9,20 <sup>a</sup>	50,27 <sup>cd</sup>
7,18;120	2,85 <sup>c</sup>	15,00 <sup>b</sup>	41,28 <sup>abc</sup>
7,18;145	3,00 <sup>bc</sup>	11,79 <sup>ab</sup>	34,43 <sup>ab</sup>
12,5;150	4,35 <sup>cd</sup>	13,20 <sup>b</sup>	50,03 <sup>cd</sup>
12,5;115	4,27 <sup>cd</sup>	11,57 <sup>ab</sup>	47,20 <sup>bcd</sup>
5;132,5	2,88 <sup>c</sup>	15,10 <sup>b</sup>	42,17 <sup>abc</sup>

BM: bagazo de manzana; A: agua

Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05);\* basado en 100 g (HA+FM+CH)

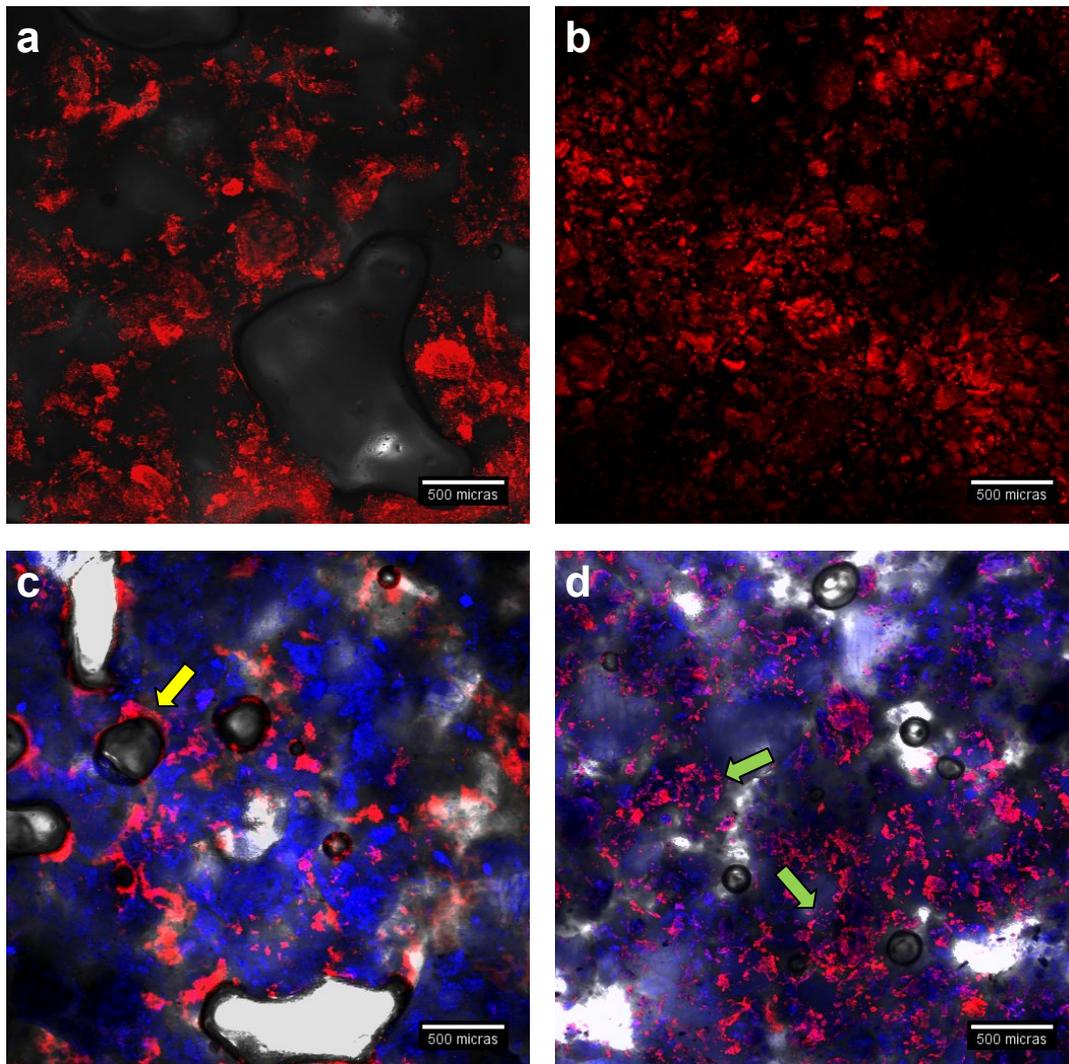
### Microscopía

Mediante CLSM, según el procedimiento descrito en la sección 2.2.6.1.6., se analizaron migas de pan control, sin BM agregado y de un pan con alto contenido de BM (20%). El bagazo utilizado fue del 2014. Los resultados se muestran en la Figura 4.10.

En las distintas micrografías se ven espacios, no teñidos, en negro (a y b) y en blanco o gris (c y d) que se pueden asignar a las celdas de aire de la miga. Entre ellos se encuentran las paredes de las celdas de aire de la miga (o sea el espacio interalveolar) constituido fundamentalmente por almidón gelatinizado. En estas paredes se aprecian estructuras teñidas en rojo (a y b) o azul y rojo (c y d). En primer lugar, se observa que las migas control sin BM (a y c) tienen una estructura de alveolos más grandes en comparación con las migas que contienen BM (b y d) que resultan más compactas, lo que se relaciona, como se dijo anteriormente, con la presencia de fibra. Como se vio en la sección 4.2. los batidos tienen mayor viscosidad aparente y mayores módulos dinámicos al aumentar el nivel de BM. Lau y Dickinson (2005) estudiaron sistemas aireados que contenían clara de huevo y azúcar y

encontraron que cuando se disminuye el nivel de azúcar disminuía la viscosidad de la fase continua lo que permitía una más fácil incorporación de aire en el batido y más rápida difusión del mismo.

Los cuerpos teñidos de rojo en las cuatro micrografías son proteínas de las diversas fuentes que la aportan en la formulación (HA, CH, BM), ya sea la aportada por harina de arroz y el bagazo como la de CH que ha coagulado al producirse la cocción. Se observa agregación en estos cuerpos proteicos, debido principalmente al efecto del tratamiento térmico sobre la CH.



**Figura 4.10.** a) Micrografía de miga de pan control (sin bagazo de manzana) teñida con Rodamina B (4x); b) miga de pan con 20%BM teñida con Rodamina B (4x); c) miga control teñida con Rodamina B y Calcofluor White (4x) d) miga de pan con 20%BM teñida con Rodamina B y Calcofluor White (4x)

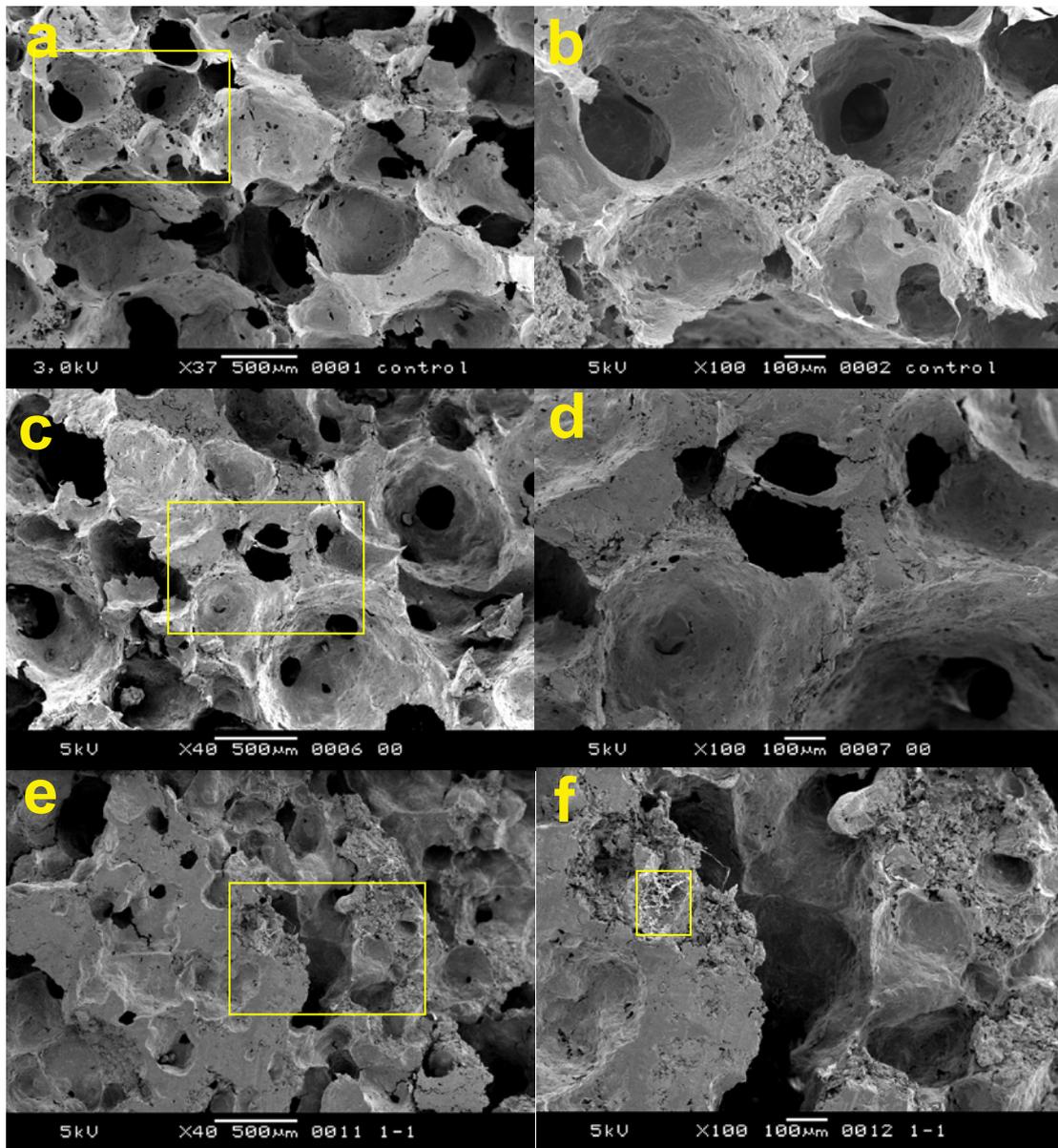
Cuando la CH es sometida a calentamiento, en primer lugar la proteína nativa se convierte en desnaturalizada y luego construye agregados insolubles de alto peso molecular a través de la interacción intermolecular de hoja plegada  $\beta$ . Esta coagulación térmica de las proteínas de la CH es mediada por enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Kaewmanee y col., 2011).

En la micrografía c) observamos la miga control teñida con Rodamina B y con Calcofluor White donde se ven las proteínas teñidas de rojo, que se encontrarían formando agregados, y estructuras teñidas en azul, que corresponderían a los restos de paredes celulares del endosperma almidonoso provenientes de la HA ya que no hay BM presente en este caso. En particular, se ven proteínas en la interfase de las celdas de aire (señaladas con una flecha amarilla). Esta tendencia a localizarse en la interfase se había visto para una solución de CH:agua batida en la sección 4.1.

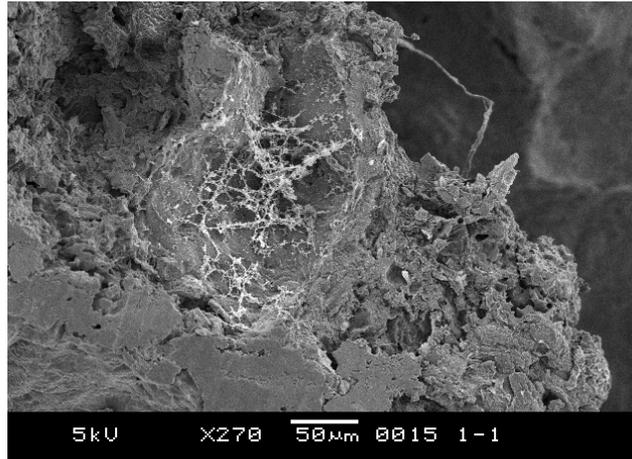
En la micrografía d) se han teñido tanto las proteínas como los materiales ricos en fibra (paredes celulares del endosperma almidonoso y BM). En muchos sitios, como los señalados con flechas verdes se encuentran colocalizados los dos fluoróforos, dando como resultante una coloración magenta.

Se tomaron además micrografías de la miga de panes control (sin BM) y con BM (2014) con microscopio electrónico de barrido (SEM). Se seleccionaron dos puntos del diseño con distintos niveles de BM y agua (12,5%BM; 132,5%A) y (17,8%BM; 120,1%A) que fueron los utilizados para el análisis sensorial.

En las micrografías se observan las paredes interalveolares y los espacios vacíos corresponden a los alveolos. En la micrografía a) (miga sin BM) se observa una estructura de alveolado relativamente uniforme, con alveolos bien definidos, regulares, con predominancia de contornos redondeados. La micrografía b) es una ampliación de la zona marcada con un rectángulo amarillo en la micrografía a). Se aprecian bien las superficies de las paredes alveolares, con escasa rugosidad y los espacios interalveolares, más heterogéneos. La micrografía c) y la ampliación d) corresponden a una formulación con BM; se ven características de alveolado similares a las anteriores pero las superficies de las paredes alveolares resultan más rugosas. Finalmente, en la micrografía e) correspondiente a una formulación con alto contenido de BM se observa una miga más compacta, con alveolado irregular y de menor tamaño y las superficies de las paredes alveolares muy rugosas. Los espacios interalveolares son más gruesos y heterogéneos. En la ampliación f) se recuadra una estructura fibrosa del espacio interalveolar, cuyo detalle se muestra en la Figura 4.12.



**Figura 4.11.** Micrografías de miga de pan control (sin bagazo de manzana) (37x, a) (100 x, b); b) miga de pan con 12,5%BM (40x, c) (100 x, d); c) miga de pan con 17,8%BM (40x, e) (100 x, f)



**Figura 4.12.** Detalle de estructura fibrosa en el espacio interalveolar en miga de pan con alto contenido de BM (270x)

#### **4.3.5. Correlación de Pearson entre las distintas variables**

Para analizar la existencia de relaciones entre los parámetros que caracterizan los batidos y los productos finales obtenidos se realizó el análisis de correlación de Pearson cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.8.

Se observa una correlación significativa y negativa entre las variables tamaño promedio y  $\rho$  alveolar ( $r=-0,827$ ;  $p<0,05$ ) y la fracción de aire correlaciona positivamente con el tamaño promedio ( $r=0,870$ ;  $p<0,05$ ) y negativamente con la densidad alveolar ( $r=-0,741$ ;  $p<0,05$ ). Estos resultados corroboran las tendencias observadas en la Tabla 4.7. Indican que una miga más aireada tendrá menor número de alveolos pero éstos serán de mayor tamaño.

Por otro lado, la densidad alveolar correlacionó positivamente con los módulos dinámicos ( $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$ ) del batido (medidos a 1Hz) indicando que cuanto mayor es el valor de éstos, mayor será el número de alveolos, ya que como fue mencionado, el grado de fluidez del batido determina la posibilidad de expansión y eventual colapso de las celdas de aire. Un aumento de la consistencia generó mayor número de celdas y de menor tamaño. Asimismo, los módulos dinámicos correlacionaron ( $p<0,05$ ) negativamente ( $r=-0,671$ ,  $-0,627$ ,  $-0,663$ ) con el volumen específico y positivamente ( $r=0,797$ ;  $0,781$ ;  $0,794$ ) con la dureza y masticabilidad del producto.

**Tabla 4.8.** Coeficientes de correlación de Pearson (r) para los parámetros  $V_e$  ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ); Dureza (N), Cohesividad, Resiliencia, Masticabilidad (N), Tamaño promedio ( $\text{mm}^2$ );  $\rho$  alveolar (alveolos/ $\text{cm}^2$ ), fracción de aire de la miga (%) y módulos dinámicos de los batidos  $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$  (Pa) medidos a 1 Hz

Características		Volumen específico	Dureza	Cohesividad	Resiliencia	Masticabilidad	Tamaño promedio	$\rho$ alveolar	Fracción de aire	Módulo elástico- $G'$	Módulo viscoso- $G''$	Módulo complejo- $G^*$
del producto horneado	Ve	1,000										
	Dureza	-0,696	1,000									
	Cohesividad	0,438	-0,652	1,000								
	Resiliencia	0,498	-0,650	0,909	1,000							
	Masticabilidad	-0,692	0,998	-0,635	-0,623	1,000						
	Tamaño promedio	0,193	-0,515	0,375	0,385	-0,509	1,000					
	$\rho$ alveolar	-0,499	0,797	-0,555	-0,534	0,795	-0,827	1,000				
	Fracción de aire	0,051	-0,432	0,430	0,392	-0,426	0,870	-0,741	1,000			
del batido	$G'$	-0,671	0,797	-0,537	-0,456	0,800	-0,384	0,655	-0,346	1,000		
	$G''$	-0,627	0,781	-0,532	-0,449	0,782	-0,380	0,630	-0,340	0,990	1,000	
	$G^*$	-0,663	0,794	-0,537	-0,455	0,797	-0,384	0,650	-0,345	0,990	0,990	1,000

En rojo se muestran aquellos coeficientes de correlación que son significativos ( $p < 0,05$ ).

El volumen específico del producto final no correlacionó significativamente con los parámetros de alveolado de la miga pero si con la dureza y masticabilidad. La correlación fue negativa en los dos casos ( $r = -0,696$  y  $-0,692$ , respectivamente). La dureza correlacionó positivamente con la densidad alveolar ( $r = 0,797$ ;  $p < 0,05$ ), mayor densidad (alveolos pequeños y numerosos, miga más compacta) conducen a una mayor dureza. Como era esperable, se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros texturales, la dureza correlacionó alta y positivamente con la masticabilidad ( $r = 0,998$ ) y negativamente con la cohesividad ( $r = -0,652$ ) y la resiliencia ( $r = 0,650$ ). Cohesividad y resiliencia tuvieron una alta correlación ( $r = 0,909$ ).

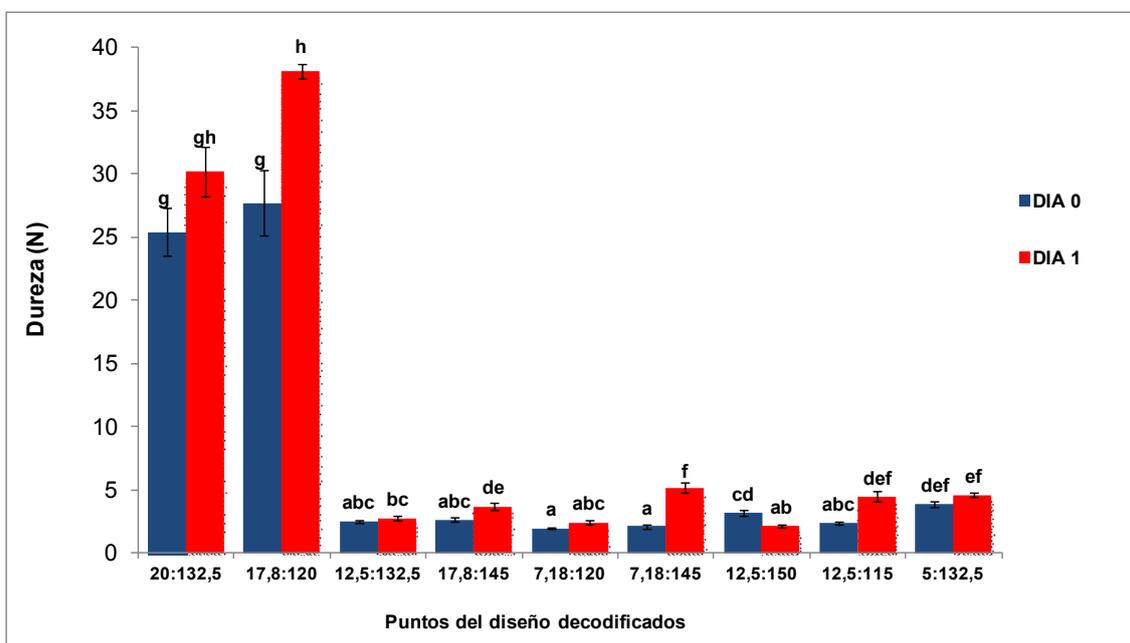
#### **4.3.6. Ensayos de Almacenamiento**

Los panificados tradicionales con gluten suelen sufrir cambios durante el almacenamiento relacionados con migración de agua, la retrogradación del almidón y la cristalización de materia grasa, lo que produce un desarreglo de la estructura original, cambiando atributos de textura como la dureza (que aumenta) y la cohesividad que disminuye (Esteller y col., 2004).

Las formulaciones empleadas para elaborar panificados libres de gluten suelen sufrir modificaciones similares pero más rápidamente que las de los panes con gluten. Moore y col. (2004) compararon panes con gluten frente a unos elaborados con harinas libres de gluten y encontraron que estos últimos fueron quebradizos después del segundo día de almacenamiento, detectándose fracturabilidad en la miga y disminución en la elasticidad y cohesividad. Esto hace que su vida útil sea más limitada; de todas maneras por el hecho de que aún la producción de panificados libres de gluten sigue siendo un proceso a pequeña escala y los productos se consumen a las pocas horas de su elaboración, el almacenamiento se realiza en plazos más breves.

En el presente trabajo se realizó un ensayo de almacenamiento por un periodo breve, de 24 h, para evaluar la tendencia de la miga al endurecimiento y a la pérdida de cohesividad. La humedad de la miga recién cocidos varió entre 52,02% y 56,99% y al día siguiente se había registrado una pérdida de humedad porcentual, referida a la inicial de cada miga fresca, entre 2,17 y 4,86%. La humedad final de la miga varió entre 49,64 y 55,71%.

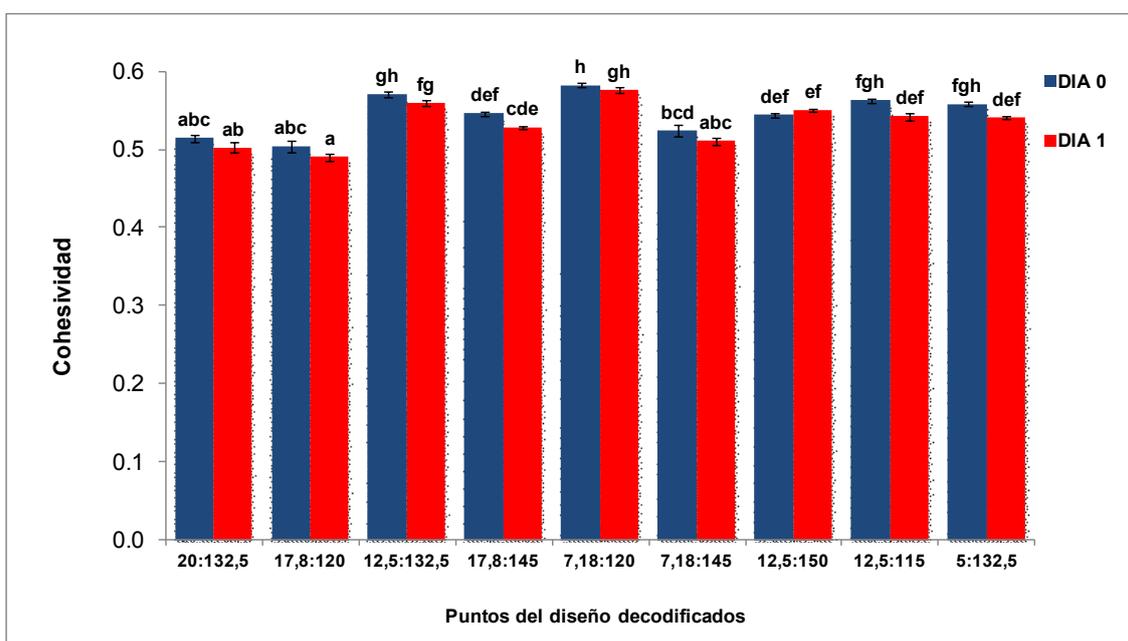
En la Figura 4.13., se muestra la variación de la dureza después de 24 h a temperatura ambiente para todos los puntos del diseño. Se observa una tendencia a aumentar la dureza en casi todos los casos. Sin embargo los mayores cambios se registran para los sistemas (7,18%BM; 145%A) que aumenta un 146% su dureza y el (12,5%BM; 115%A) que incrementa un 89%. En el primer caso se tiene una situación de exceso de agua y en el segundo de restricción en relación con la cantidad de BM. Los panes con alta dureza inicial, tuvieron porcentajes de aumento relativamente menores, entre 19 y 38% pero ya su calidad de miga fue inferior, por la excesiva dureza, el día 0.



**Figura 4.13.** Evaluación de la dureza de la miga en función del tiempo de almacenamiento, día 0: día de la panificación, día 1: almacenamiento por 24 h, diferentes letras entre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 4.14. se muestra la variación en la cohesividad durante las 24 h de almacenamiento. Se observó en general una tendencia a la disminución de la cohesividad pero que no llega a ser significativa ( $p < 0,05$ ). En panes con harina de trigo el envejecimiento es causado por una combinación de fenómenos como la retrogradación del almidón, la migración del agua hacia la corteza del pan, así como también del tiempo y la temperatura del tratamiento (Zobel y Kulp, 1996; Majzoubi y col., 2011). En panes libres de gluten la ausencia del gluten y la adición de otros

componentes hidrofílicos (hidrocoloides y/o fibra adicionada) podrían inducir una distribución y retención de agua diferente, lo que podría favorecer el envejecimiento. Se ha sugerido que la ausencia de la red de gluten podría incrementar el movimiento de agua desde la miga hasta la corteza del pan, conduciendo a una miga más dura y una corteza más suave (Gallagher y col., 2003). El envejecimiento del pan también reduce la cohesividad (Ronda y Roos, 2011) por lo general debido a la pérdida de atracciones intermoleculares entre componentes lo que provoca desgranamiento de la miga y que se asocia generalmente con la pérdida de agua.



**Figura 4.14.** Evaluación de la cohesividad de la miga en función del tiempo de almacenamiento, día 0: día de la panificación, día 1: almacenamiento por 24 h, diferentes letras entre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.7. Composición de panificados libres de gluten

En la Tabla 4.9. se muestran los resultados del análisis de composición efectuado sobre dos puntos del diseño (17,8%BM;120,1%A y 12,5%BM;132,5%A) formulados con BM 2012. El pH de la miga fue de 5,52 y 5,67 para la formulación más rica en fibra y la menos rica, respectivamente. Tanto la fibra dietaria total (FDT) como los otros componentes minoritarios se determinaron sobre el pan deshidratado, es decir en base seca según lo explicado en materiales y métodos. Los resultados se llevaron a

base húmeda utilizando los valores determinados experimentalmente por método indirecto. Finalmente los carbohidratos diferentes de fibra se obtuvieron por diferencia.

**Tabla 4.9. Composición centesimal de los panes**

BM (%); A (%)	humedad	FDT	proteína	cenizas	lípidos	Carbohidratos distintos de fibra (*)
(17,8;120,1)	52,13±0,11	6,69±0,17	5,12±0,06	0,48±0,02	0,46±0,01	35,12
(12,5;132,5)	54,86±0,10	3,66±0,04	4,68±0,003	0,40±0,06	0,49±0,13	35,91

BM: bagazo de manzana; A: agua; FDT: fibra dietaria total

±DE (\*) calculados por diferencia

Para los dos puntos analizados se obtuvo un valor elevado de fibra dietaria. El Código Alimentario Argentino establece en su artículo 1386 que se entiende por alimentos modificados en fibra los que contengan un mínimo de fibra alimentaria de 3g /100 g de alimento sólido. De acuerdo a la FDA cualquier alimento rotulado como rico en fibra debe contener al menos 4 g de FDT / 100 g (Yadav y col., 2010; Gularte y col., 2012). Según la Resolución 1924/2006 de la Unión Europea los denominados “fuente de fibra” deben contener al menos 3 g de FDT / 100g de alimento y los catalogados como altos en fibra, al menos 6 g de FDT/ 100g de alimento.

El contenido de fibra fue similar a los encontrados por otros autores. Korus y col., (2012) los que elaboraron panes libres de gluten con adición de semillas de grosella y fresa desgrasada como ingredientes funcionales, adicionaron hasta un 15% de estos materiales en la formulación y el contenido de FDT varió entre 2,99-8,71 g/100 g. Segura y Rosell (2011) analizaron la FDT de 12 marcas comerciales de panes libres de gluten, en los que se utilizaba como base de la formulación, almidón de maíz, de papa, harina de arroz o mezclas de estos ingredientes y encontraron valores de FDT entre 1,30-7,20 g/100g. Para los dos puntos presentados en la Tabla 4.9., el punto con mayor contenido de BM presento una mayor cantidad FDT.

Las diferencias en la composición proximal observada entre las dos formulaciones seleccionadas, además del contenido de BM tiene que ver con la restricción de agua la cual es mayor en el caso del punto (17,8%B; 120,1%A) que en el de (12,5%B; 132,5%A). El contenido de proteína para los dos panificados fue de alrededor del 5%. El nivel de proteína en panes libres de gluten es altamente variable en bibliografía. Algunos autores han logrado obtener productos con mayor contenido proteico seleccionando ingredientes particularmente ricos en proteína. Calderón de la Barca y

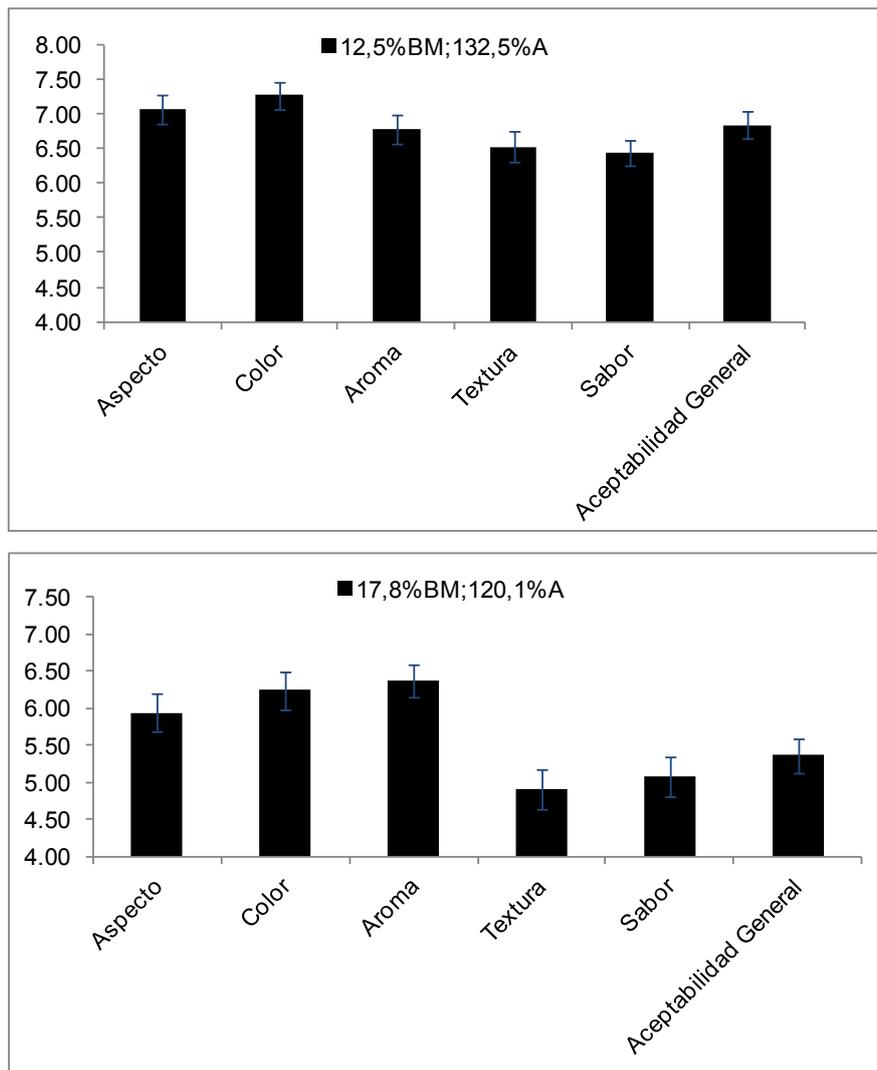
col. (2010) elaboraron panificados libres de gluten a partir de harina de amaranto y obtuvieron panes con un contenido proteico del 18%. Figueira y col., (2011) quienes elaboraron panes libres de gluten con adición de una microalga, *Spirulina platensis* obtuvieron, para el máximo nivel de Spirulina adicionado 9,90 % de proteína.

#### **4.3.8. Evaluación sensorial de dos formulaciones con distinto nivel de fibra**

Aunque diversas investigaciones sobre desarrollo de panificados libres de gluten se han desarrollado a lo largo del tiempo, la evaluación sensorial se ha realizado a través de dispositivos o involucrando personas no celiacas (Laureati y col., 2012). Esto en parte puede explicarse por el hecho que para lograr un producto libre de gluten se debe contar con las instalaciones adecuadas para evitar tener riesgos con consumidores celiacos. Sin embargo Laureati y col. (2012) realizaron una evaluación sensorial entre sujetos celiacos y no celiacos en donde se evaluaban distintas formulaciones en panificados libres de gluten y no encontró diferencias significativas entre los dos grupos basándose en los mismos atributos sensoriales. Sin embargo, hay que tener en cuenta, para el análisis de los resultados del panel realizado en el presente trabajo, con personas no celiacas, que pudiera haber un sesgo y por lo tanto su carácter es orientativo. Todas las panificaciones se realizaron el mismo día del ensayo sensorial. El ensayo fue de aceptabilidad, utilizando una escala hedónica, sobre un total de 50 panelistas no entrenados, de ambos sexos, en una franja de edad de 25 a 55 años. En la Figura 4.15., se muestran los resultados obtenidos para las dos formulaciones, de diferentes características de textura y color, una más rica en fibra que la otra. Por cuestiones de disponibilidad, el BM utilizado fue de la cosecha 2014, por lo que los panes obtenidos tuvieron mayor contenido de fibra que los de los ensayos precedentes, analizados en este capítulo.

Polizzoto y col. (1983) utilizaron una escala para la evaluación sensorial de muffins enriquecidos con fibra dietaria de diferentes fuentes, donde la escala iba de 1 (me disgusta mucho) hasta 9 (me gusta mucho), una puntuación mayor o igual a 5 fue utilizada arbitrariamente para indicar que un producto es aceptable. En la presente tesis utilizamos el mismo criterio para los diferentes atributos sensoriales.

Se observa que para las dos formulaciones los atributos fueron aceptables por parte de los consumidores, sin embargo los menores valores para todos los atributos fueron para el panificado con mayor cantidad de fibra (17,8%BM;120,1%A), en donde el único parámetro que no superó los 5 puntos en la escala fue la textura, precisamente una de



**Figura 4.15.** Evaluación de los atributos sensoriales de dos formulaciones de panificados libres de gluten, por parte de un panel no entrenado de 50 consumidores (la barra sobre cada atributo sensorial corresponde al error estándar)

las observaciones que pusieron los evaluadores fue que esta formulación tenía una miga demasiado húmeda, y esto se explicaría por la capacidad de retención de agua de la fibra. Otra observación destacable por parte de los evaluadores, fue que se podría acentuar el sabor dulce del producto para definir mejor el sabor para cada panificado.



## **Conclusiones parciales**

Se observó que los batidos libres de gluten son sistemas complejos, con parte de sus componentes en solución y otros dispersos (gránulos de almidones en suspensión, cuerpos proteicos y partículas ricas en fibra insoluble aportados por la HA). Las celdas de aire se encuentran formando una espuma que dará origen a la estructura esponjosa de la miga después del tratamiento térmico. Los batidos presentaron un aumento de la viscosidad al incrementar el nivel de BM. A través de los ensayos dinámicos oscilatorios se pudo caracterizar a los sistemas como fluidos viscoelásticos, cuyo comportamiento fue altamente dependiente del contenido de BM y de agua. Estas características incidieron en los atributos de calidad de los productos panificados obtenidos.

El aumento de la cantidad de BM llevó a un incremento en la dureza y disminución en la cohesividad y resiliencia en los productos obtenidos, sin embargo la cantidad de agua añadida fue fundamental para moderar estos efectos. Hasta con 12,5 g de BM por cada 100 g de la mezcla (HA+FM+CH) se obtuvieron volúmenes específicos superiores a 2,0 cm<sup>3</sup>/g, mediante la adición de cantidades variables de agua (115-150 g cada 100 g de mezcla HA+FM+CH). Los puntos del diseño que presentaron disminución en el volumen específico exhibieron migas más compactas, con menor tamaño de alveolos, y una fracción de aire en la miga reducida. Las características del batido influyen directamente en las características de la miga, como se comprobó en el análisis de correlación de Pearson. Al aplicar un mayor nivel de BM y restricción de agua se obtuvieron batidos con módulos dinámicos más elevados, que condujeron a migas más compactas, es decir con mayor densidad alveolar.

Respecto al almacenamiento, cuando el BM fue adicionado en los mayores niveles, la dureza de la miga aumento significativamente durante las primeras 24 h de almacenamiento.

El análisis sensorial mostró que una alta cantidad de BM rico en FDT en formulaciones con restricción de agua disminuía la aceptabilidad del producto. Por otro lado, mayores niveles de agua mejoraron el volumen de la pieza sin embargo hay que tener en cuenta que estas formulaciones contienen menor cantidad de fibra por efecto de dilución. A su vez, un factor importante es la variación en el contenido de fibra que pueden presentar las distintas partidas de BM y que afectan el resultado final. La elección de una formulación deberá por lo tanto conjugar el enriquecimiento con fibra con características organolépticas aceptables. Panes obtenidos con agregado de BM (con 41% de FDT) entre 12,5% y 17,8 % (cada 100 g de HA+FM+CH) y adición de

agua entre 120 y 132,5% presentan características aun aceptables y niveles de fibra mayores al 3%, lo que permitiría tipificar a estos panificados como alimentos modificados en fibra, según el CAA (art. 1386).

## **Capítulo 5**

**Estudio de sistemas modelo  
almidón- bagazo de manzana**



## **5.1. Interacción entre componentes: comportamiento en sistemas modelo almidón-bagazo de manzana**

Las formulaciones libres de gluten tienen como componente predominante el almidón que gobierna en gran medida las características del sistema. En literatura los sistemas a base de almidón suelen ser descriptos como pastas o geles, aunque la distinción entre una pasta y un gel no siempre es clara. En los trabajos sobre almidón una pasta por lo general se refiere al sistema caliente, recién preparado y un gel es el sistema después de enfriado, y a menudo, posterior a su almacenamiento. Los dos son materiales viscoelásticos. Una pasta caliente se compone de una fase continua de moléculas, principalmente amilosa y de amilopectina de bajo peso molecular disueltas y una fase discontinua o dispersa de gránulos hinchados (de la que se han lixiviado diferentes cantidades de amilosa y amilopectina) y fragmentos granulares. Las propiedades de la pasta son determinadas por los tamaños y la naturaleza (principalmente la rigidez) de las partículas en la fase discontinua, de la composición y naturaleza de la fase continua (tamaños y estructura fina de moléculas de amilosa y amilopectina, así como su grado de interacción), y de las interacciones entre las dos fases. Se ha propuesto que el comportamiento de sistemas de almidón tipo pasta quedaría determinado principalmente por el volumen de la fase de gránulos hinchados y su deformabilidad (BeMiller, 2011).

Según BeMiller (2011), hay dos maneras básicas para preparar una pasta o gel de almidón-hidrocoloides. La primera consiste en una sustitución o reemplazo; una pasta o gel de almidón al 100% es comparada con una hecha con  $(100-x)\%$  almidón +  $x\%$  de hidrocoloide. Cuando el hidrocoloide que reemplaza el almidón produce una solución de menor viscosidad que la del almidón disminuye la viscosidad de la mezcla de ambos y viceversa cuando el hidrocoloide produce soluciones de mayor viscosidad que la cantidad equivalente del almidón reemplazado. La segunda forma de preparación es por adición, un 100% de gel o pasta de almidón es comparado con uno hecho con 100% de almidón +  $x\%$  de hidrocoloide. En este caso, ya sea que el hidrocoloide produzca una solución de menor viscosidad que la cantidad equivalente de almidón o una solución de mayor viscosidad, siempre incrementará la viscosidad global del sistema.

En esta sección se realizaron ensayos sobre sistemas modelo, es decir, sistemas con BM y solamente algunos de los otros componentes (HA, FM, CH) de las

formulaciones con el objeto de caracterizar el comportamiento e inferir interacciones entre los mismos.

### **5.1.1. Perfil viscoamilográfico**

Los amilogramas permiten estudiar el comportamiento de los almidones frente a la acción simultánea del calor y el cizallamiento en sistemas donde no hay restricción de agua. Las diferentes partes del amilograma están vinculadas con los cambios estructurales que sufre el gránulo de almidón durante el proceso de gelatinización y de posterior gelificación de la pasta (Figura 2.13 en la sección de Materiales y Métodos). En la primera parte del amilograma se observa un aumento de la viscosidad, correspondiente al hinchamiento de los gránulos y lixiviación de amilosa, hasta alcanzar un máximo de viscosidad (viscosidad de pico).

El mantenimiento a 95°C con cizallamiento generan una ruptura de los gránulos y esta fragmentación produce un descenso de viscosidad respecto a la viscosidad máxima (inestabilidad). La etapa de enfriamiento permite la formación del gel a través de uniones puente de hidrógeno y por eso la viscosidad vuelve a aumentar, reflejándose en el parámetro asentamiento.

Si bien la concentración utilizada en estos ensayos es menor (3 g de sólidos/ 25 mL agua) que la correspondiente a las formulaciones de batidos libres de gluten, la información obtenida permite analizar el efecto del procesamiento y de otros componentes sobre los parámetros amilográficos y así poder obtener conclusiones respecto a las posibles interacciones. En la Figura 5.1., se muestran los viscoamilogramas para el bagazo, harina de arroz, fécula de mandioca y su mezcla (BM, HA, FM, HA+FM) y en la Tabla 5.1., los valores medios de los parámetros obtenidos.

El ciclo de calentamiento/enfriamiento aplicado generó distintos perfiles viscoamilográficos de acuerdo a la composición del sistema. El BM (Figura 5.1. a) no mostró desarrollo de viscosidad. En particular, el perfil viscoamilográfico de la FM (Figura 5.1. b) se caracterizó por una inestabilidad (breakdown) pronunciada, relacionada con la falta de resistencia de este almidón a la aplicación combinada de temperaturas elevadas y fuerzas de cizalla. Este resultado concuerda con los obtenidos por Ceballos y col. (2007) quienes estudiaron diferentes variedades genéticamente modificadas de mandioca y encontraron valores de inestabilidad en el rango de 490-290 cP. Los almidones de cereales (como el que está presente en la HA) son más resistentes a las condiciones de calentamiento-cizallamiento y por lo tanto, la

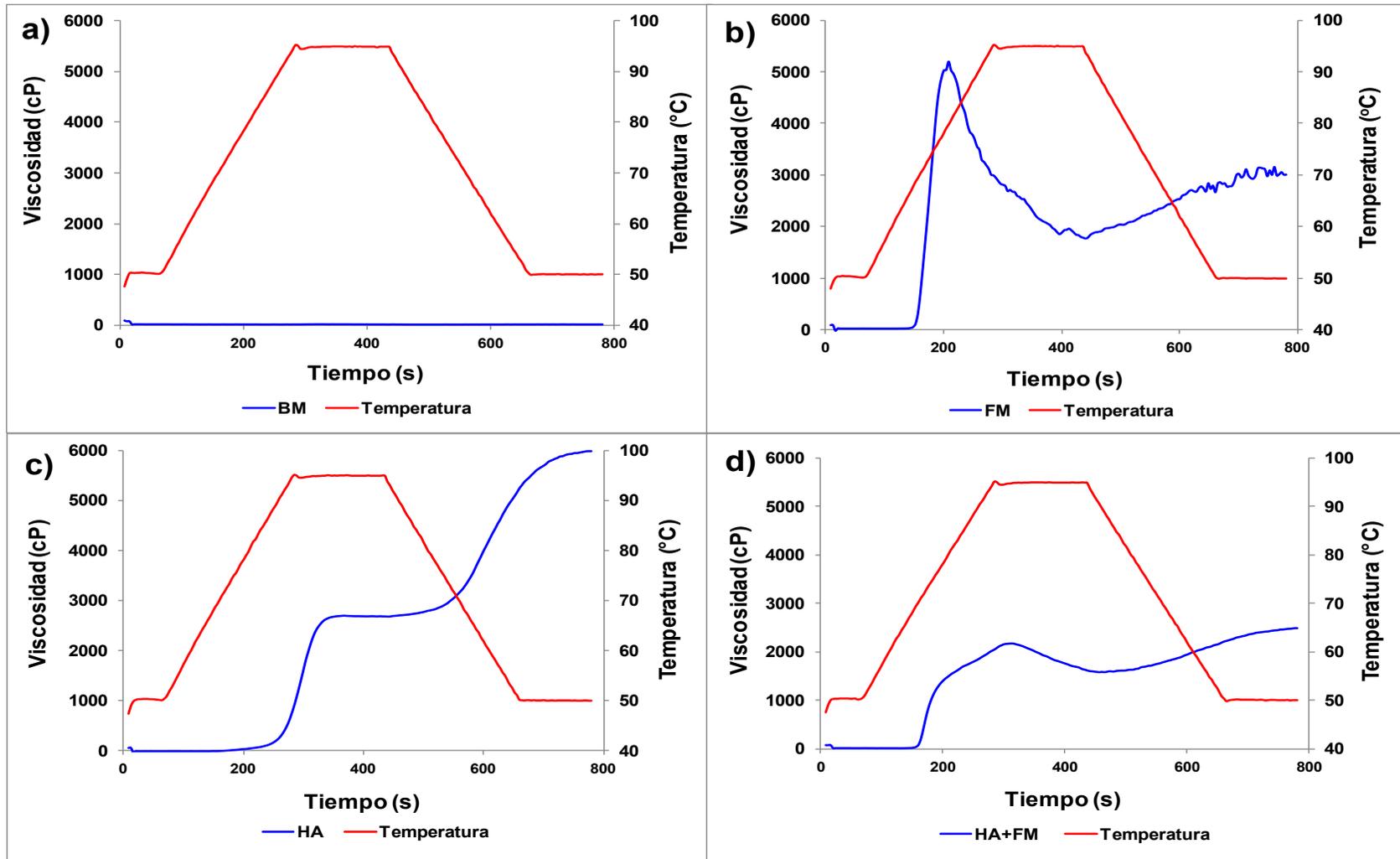
inestabilidad hallada en este caso fue menor (Figura 5.1. c). Respecto a la mezcla de FM y HA (Figura 5.1. d) se observa un perfil característico, debido a la superposición de ambos picos de gelatinización, el de la FM que aparece primero y el de la HA posterior, por lo que el perfil presenta un hombro aproximadamente a 80°C, antes del máximo que aparece en la etapa isotérmica de 95°C.

Como se observa en la Tabla 5.1., la FM presentó la menor temperatura de formación de la pasta ( $T_p$ ), 67,0°C, siendo este valor concordante con los obtenidos por Ceballos y col. (2007), que informaron un rango para las distintas variedades estudiadas entre 65,4-68,3°C. La  $T_p$  de la HA fue de 88°C, y está de acuerdo con lo informado por Sandhya Rani y Bhattacharya (1995). Estos autores trabajaron con diferentes variedades de arroz y encontraron temperaturas de empastado dentro de un rango de 83°C hasta 94°C. Sin embargo en la literatura no hay completo acuerdo sobre los valores de los parámetros viscoamilográficos en el caso de harina de arroz. Cappa y col. (2013) sugirieron que las diferencias entre los resultados informados por diferentes investigadores están relacionados con variaciones en la composición de la muestra (contenido de amilosa, humedad, proteínas, lípidos y fibra) que pueden afectar el comportamiento durante el calentamiento. La mezcla FM+HA arrojó un valor de  $T_p$  mucho más cercano al de FM ya que es este almidón el que comienza a gelatinizar primero y define la localización de la temperatura de empastado de la mezcla.

**Tabla 5.1.** Parámetros viscoamilográficos obtenidos por RVA

Muestra	Parámetros				
	VP (cP)	B (cP)	VF (cP)	S (cP)	$T_p$ (°C)
FM	5109±84 <sup>c</sup>	3418±56 <sup>c</sup>	2940±54 <sup>b</sup>	1250±32 <sup>b</sup>	67,0±0,1 <sup>a</sup>
HA	2447±25 <sup>b</sup>	42±22 <sup>a</sup>	5309±65 <sup>c</sup>	2904±38 <sup>c</sup>	88,0±1,0 <sup>c</sup>
HA+FM (1:1)	2164±23 <sup>b</sup>	614±26 <sup>b</sup>	2462±22 <sup>b</sup>	912±2 <sup>a</sup>	69,45±0,1 <sup>b</sup>
BM	24±1,4 <sup>a</sup>	-----	21,5±0,7 <sup>a</sup>	-----	-----

VP (viscosidad de pico); B (inestabilidad-breakdown); VF (viscosidad final); S (asentamiento 1 -setback);  $T_p$  (temperatura de empaste); Media ± DE; diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )



**Figura 5.1.** Viscoamulogramas de los diferentes muestras a) BM; b) FM; c) HA; d) Mezcla HF+FM (1:1). Todas las concentraciones son 3g sólidos/25 mL agua. Las líneas rojas indican la temperatura medida.

Una mayor temperatura de gelatinización en almidones nativos refleja una mayor estabilidad interna del gránulo de almidón, esta estabilidad está relacionada con un mayor empaquetamiento en las zonas cristalinas de los gránulos, como consecuencia de la co-cristalización que se produce entre la amilosa y la amilopectina cuando la primera queda alojada en los clusters que definen la región cristalina del gránulo de almidón (Jenkins y Donald, 1995). Por lo tanto, pueden relacionarse las menores temperaturas de gelatinización de raíces y tubérculos con su menor contenido de amilosa (Alvis y col., 2008). Al respecto, Swinkels (1985) informó que los contenidos de amilosa y amilopectina para féculas de mandioca son de 17% y 83% respectivamente, mientras que el contenido de amilosa para cereales como el maíz y el trigo es de aproximadamente 28%. Además, este autor también reportó que la relación entre moléculas de amilosa y moléculas de amilopectina en fécula de mandioca es de 150, mientras que los almidones de maíz y trigo (cereales) tienen una mayor relación (=1000), lo que explica que el rango de temperatura de empastado para la mandioca fuera menor (65-70)°C que el rango para los cereales mencionados (75-85°C).

Como se señaló, la viscosidad de pico está relacionada con el grado de hinchamiento granular durante el calentamiento. Los almidones con mayor capacidad de hinchamiento muestran mayores viscosidades de pico. En el presente trabajo, la mayor viscosidad de pico correspondió a la FM (5109 cP), seguida por la HA (2447 cP) y la mezcla de ambas, HA+FM (1:1) (2164 cP). La mayor inestabilidad (B) correspondió a la FM (3418 cP) y la menor a la HA (42 cP); como era de esperar la mezcla presentó un valor localizado entre ambos (614 cP). La viscosidad final (VF) y el asentamiento (S) fueron mayores para la HA (5309 cP, 2904 cP, respectivamente) en comparación con los valores hallados para FM. Un valor elevado de asentamiento es un parámetro indicativo de una mayor tendencia a la retrogradación relacionada a su vez con un mayor contenido de amilosa (Thao y Noomhorm, 2011).

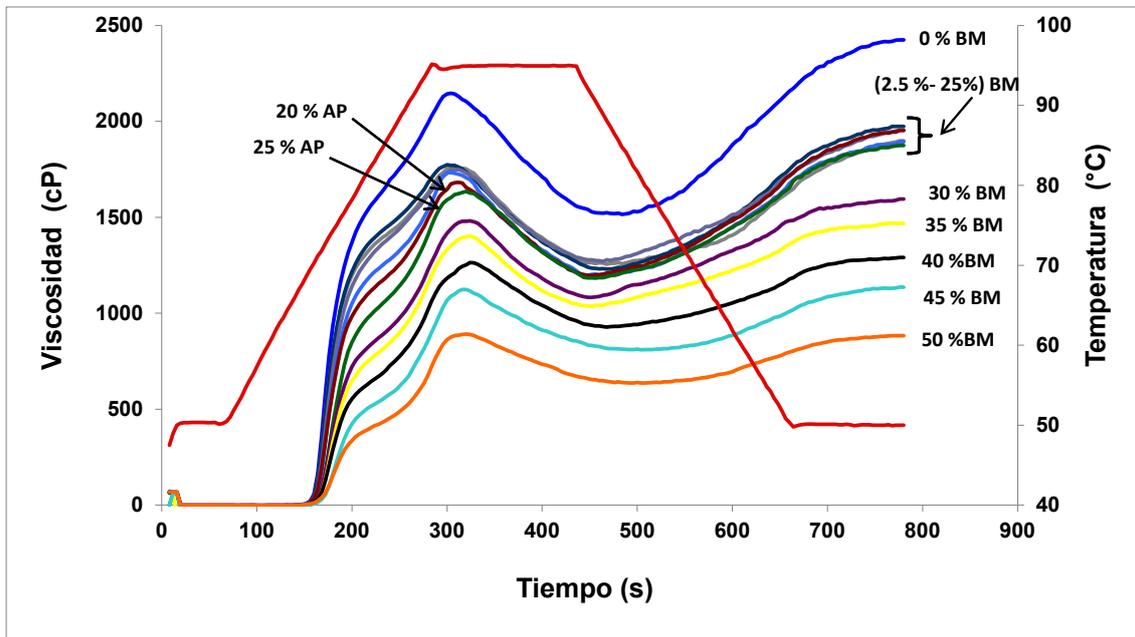
#### **5.1.1.1. Resultados de las series experimentales con RVA**

Se realizaron tres series de experimentos de acuerdo con lo descrito en la sección 2.2.7.1.1.

##### **Serie a: influencia del nivel de reemplazo con bagazo de manzana**

En la Figura 5.2. se muestran los viscoamilogramas para la mezcla HA+FM (1:1) en la que se hicieron reemplazos con cantidades crecientes de BM (0-50%), según la

primera forma de preparación que se menciona en el citado trabajo de BeMiller (2011). Los parámetros viscoamilográficos correspondientes se muestran en la Tabla 5.2.



**Figura 5.2.** Viscoamilogramas de los distintos niveles de remplazo de (HA+FM) con BM a diferentes concentraciones (serie a). La línea roja indica la temperatura medida.

Se observa que cuando parte de la mezcla HA+FM fue sustituida por BM, el perfil amilográfico fue similar, con el característico desdoblamiento parcial que se mencionó en el punto anterior pero las viscosidades de pico y final (VP, VF) disminuyeron progresivamente. La disminución observada se puede relacionar, por un lado con la menor cantidad de almidón disponible para la gelatinización y por otro, con un efecto de restricción en la gelatinización atribuible a que el BM presente puede reducir en cierta medida el agua disponible en el sistema para el proceso.

Una disminución del agua disponible restringiría el hinchamiento del gránulo, por lo tanto explicaría las menores viscosidades de pico en las pastas (Symons y Brennan, 2004). Sudha y col. (2007) encontraron resultados similares cuando se reemplazó almidón de trigo con cantidades crecientes de BM; estos autores atribuyeron el descenso de la VP a la disminución del poder de hinchamiento del almidón en presencia del BM.

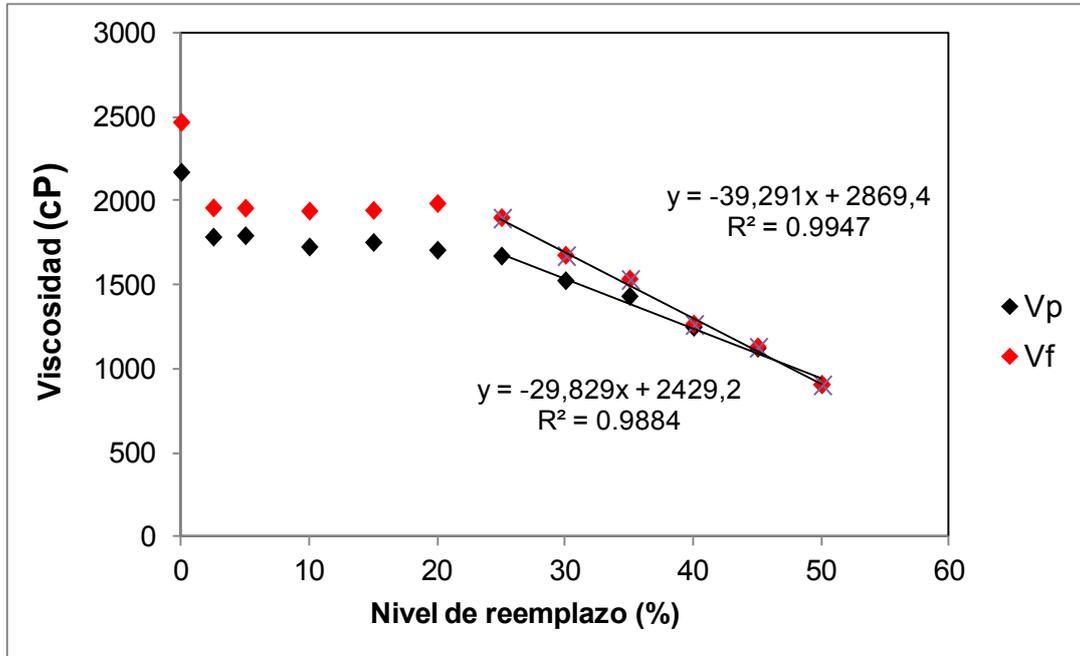
**Tabla 5.2. Parámetros viscoamilográficos para distintos niveles de remplazo con BM**

Nivel BM (%)	Parámetros				
	VP (cP)	B (cP)	VF (cP)	S (cP)	T <sub>P</sub> (°C)
0	2164±23 <sup>g</sup>	614±26 <sup>f</sup>	2462±52 <sup>e</sup>	912±2 <sup>f</sup>	69,5±0,1 <sup>a</sup>
2,5	1778±25 <sup>ef</sup>	532±40 <sup>ef</sup>	1952±75 <sup>d</sup>	706±89 <sup>de</sup>	69,4±0,0 <sup>a</sup>
5	1786±17 <sup>f</sup>	536±11 <sup>ef</sup>	1950±35 <sup>d</sup>	700±63 <sup>de</sup>	69,4±0,1 <sup>b</sup>
10	1719±42 <sup>ef</sup>	487±11 <sup>de</sup>	1933±30 <sup>d</sup>	701±23 <sup>de</sup>	69,4±0,1 <sup>a</sup>
15	1746±18 <sup>ef</sup>	515±29 <sup>e</sup>	1937±61 <sup>d</sup>	706±14 <sup>de</sup>	69,4±0,1 <sup>a</sup>
20	1700±25 <sup>ef</sup>	480±8 <sup>de</sup>	1978±35 <sup>d</sup>	758±1 <sup>ef</sup>	69,4±0,0 <sup>a</sup>
25	1665±42 <sup>e</sup>	463±15 <sup>de</sup>	1894±28 <sup>d</sup>	691±0 <sup>de</sup>	69,8±0,6 <sup>a</sup>
30	1518±5 <sup>2d</sup>	414±21 <sup>cd</sup>	1670±105 <sup>c</sup>	565±74 <sup>cd</sup>	70,3±0,1 <sup>ab</sup>
35	1425±31 <sup>d</sup>	369±4 <sup>bc</sup>	1528±85 <sup>c</sup>	472±57 <sup>bc</sup>	70,2±0,0 <sup>ab</sup>
40	1241±33 <sup>c</sup>	312±34 <sup>ab</sup>	1260±43 <sup>b</sup>	331±45 <sup>ab</sup>	70,6±0,6 <sup>abc</sup>
45	1116±12 <sup>b</sup>	296±27 <sup>ab</sup>	1124±18 <sup>b</sup>	304±33 <sup>ab</sup>	70,6±0,5 <sup>abc</sup>
50	899±11 <sup>a</sup>	256±1 <sup>a</sup>	900±23 <sup>a</sup>	257±14 <sup>a</sup>	71,8±0,1 <sup>c</sup>

Media ± DE; diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas (p < 0,05).

A pesar de la tendencia decreciente en la viscosidad observada en la Figura 5.2., los valores de los parámetros VP, B, VF y S en muestras con niveles de remplazo entre 2,5% y 25% no presentaron diferencias significativas. Esto indicaría que la pérdida de viscosidad cuando se reemplaza parte del almidón en este rango podría ser compensada al menos parcialmente por la presencia de los componentes solubles del BM así como de las partículas insolubles. Sin embargo niveles mayores de remplazo con BM (>25%) dieron lugar a una reducción drástica del perfil de viscosidad viscosidades (VP y VF) como se observa en la Tabla 5.2. La representación de VP y VF en función del nivel de remplazo (Figura 5.3.) muestra claramente el

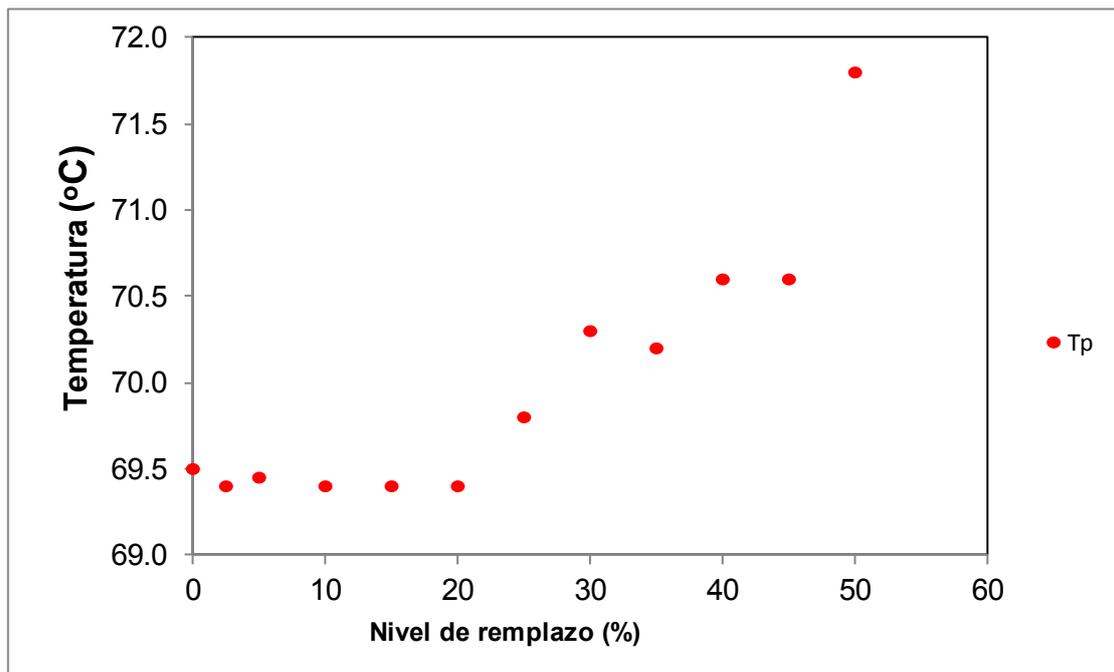
comportamiento señalado: los valores de viscosidad fueron similares hasta 25% de reemplazo con BM, y el posterior aumento de los niveles de reemplazo produjo un descenso gradual de la viscosidad. Además se observó una disminución significativa de la viscosidad cuando se reemplazó 2,5 % de las harinas por BM.



**Figura 5.3.** Efecto del reemplazo con cantidades crecientes de BM sobre la VP y VF de las mezclas de FM+HA En las ecuaciones, x: nivel de reemplazo; y: viscosidad

Además de la fibra soluble e insoluble, es probable que los azúcares solubles de bajo PM (peso molecular) del BM estén también jugando un papel compensatorio en el mantenimiento de la viscosidad cuando los niveles de reemplazo no exceden el 25% de los sólidos totales. Respecto al rol de los azúcares durante la gelatinización, Richardson y col. (2003) encontraron que la adición de sacarosa retardaba la liberación de amilosa en el almidón de trigo y además causaba un aumento de viscosidad al producirse una expansión más grande del gránulo de almidón a elevadas temperaturas sin evidenciarse fragmentación. Otros autores (Kim y Walker, 1992) han sugerido que estos cambios ocasionados por el azúcar en la viscosidad de la pasta tienen que ver con el entrecruzamiento de las moléculas de almidón en las regiones amorfas del gránulo a través de la formación de puentes de azúcar. Al estar la estructura del gránulo reforzada, éste sería menos susceptible al hinchamiento, la lixiviación de amilosa y la desintegración; por lo tanto según estos autores, la pasta resultante es menos propensa a la fluidificación por cizalla y más viscosa. Es

necesario destacar, sin embargo, que los autores mencionados han utilizado en los ensayos amilográficos, concentraciones de azúcar superiores a las presentes en nuestros sistemas. Richardson y col. (2003) usaron concentraciones del orden de 12-24% (p/p) de sacarosa y de 8% de almidón mientras que Kim y Walker (1992) llegaron hasta 50% de concentración de sacarosa u otros azúcares en presencia de 4% de almidón. En el ensayos de RVA realizado en presente trabajo la concentración de almidón fue de 12 % pero la de los azúcares solubles del BM variaron entre 0,11 y 2,33%, es decir mucho menores que los de los trabajos citados. Sin embargo, al efecto de los azúcares hay que sumar el de la fibra soluble y partículas insolubles aportados por el BM, que también contribuyen a la viscosidad total del sistema. Si bien las temperaturas de empastado no presentan diferencias significativas (Tabla 5.2.) se verifica una tendencia al aumento de la  $T_p$  con el reemplazo con BM a partir del 25 % (Figura 5.4.).



**Figura 5.4.** Efecto del reemplazo con cantidades crecientes de BM sobre la  $T_p$  de mezclas de FM+HA

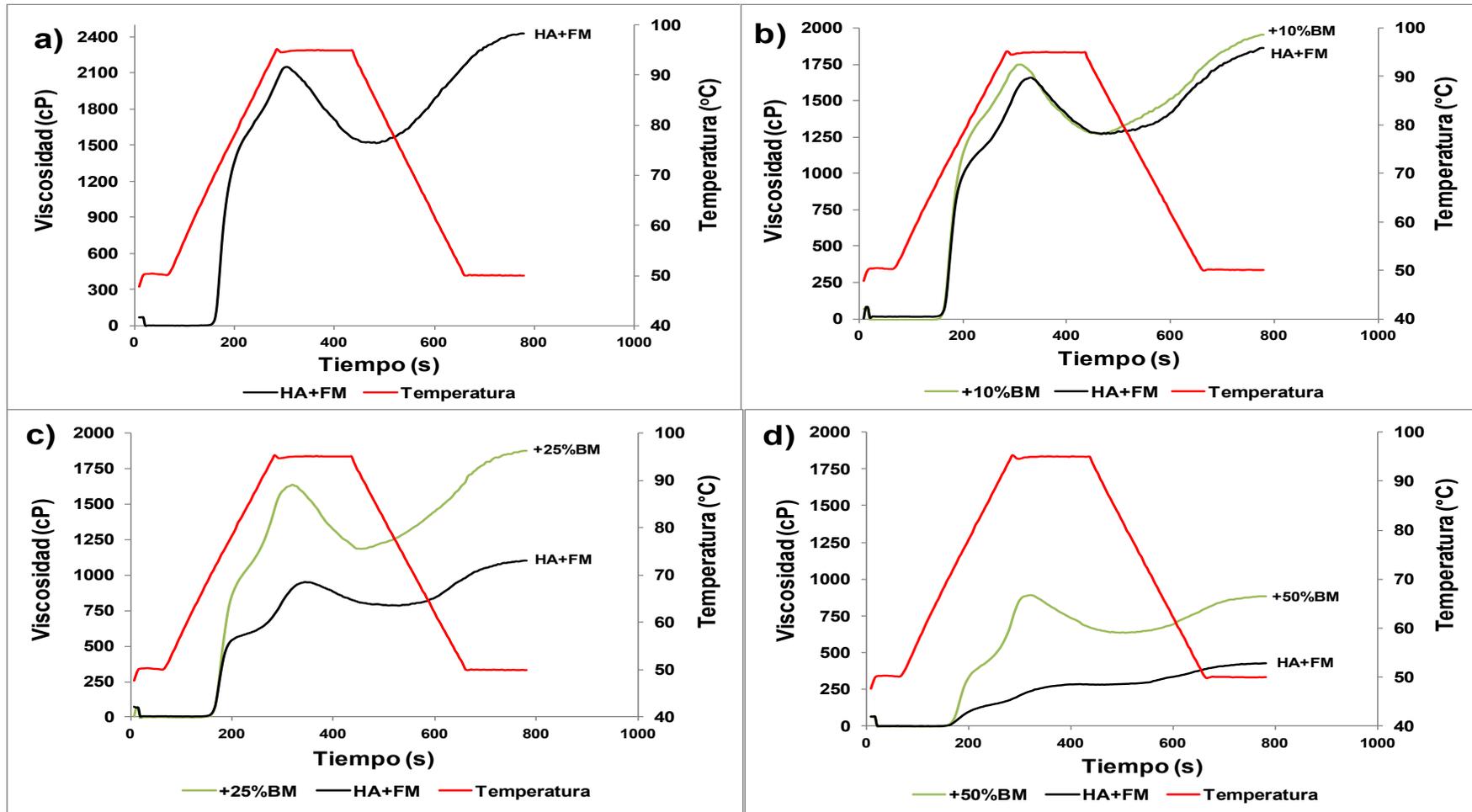
Finalmente, se observa en la Figura 5.2., una disminución del valor de S a medida que se incrementa el reemplazo con BM (de 912 a 257 cP). Esto indica una menor tendencia a gelificar cuando disminuye la temperatura y por extensión, una menor tendencia a la retrogradación. Las partículas de BM y la fibra solubilizada podrían estar

impidiendo el acoplamiento de cadenas de amilosa, a través de la formación de puentes de hidrógeno, que es necesario para la gelificación.

**Serie b: evaluación de la contribución de BM y de los almidones a la viscosidad global del sistema**

Para evaluar la contribución de cada componente (HA+FM, BM) en el comportamiento global del sistema, se compararon los viscoamilogramas de algunas de las mezclas HA+FM de la **serie a** con diferentes niveles de reemplazo de BM (10%, 25%, 50%) con los obtenidos para la misma cantidad de HA+FM pero sin BM (**serie b**). Estos resultados se muestran en la Figura 5.5. Los viscoamilogramas de las muestras de HA+FM sin BM (Figura 5.5. a) y con 10% de BM (Figura 5.5. b) presentaron perfiles similares, indicando que los valores de viscosidad están casi totalmente relacionados con el almidón, con una menor contribución del BM.

En sistemas con niveles 25% ó 50% de reemplazo, se observa una mayor contribución de las partículas de BM a la viscosidad global del sistema lo que se infiere al comparar los amilogramas de sistemas con BM con los amilogramas de los sistemas sin este componente los cuales exhiben viscosidades notablemente menores (Figura 5.5. c y Figura 5.5. d). En las pastas con un mayor nivel de reemplazo con BM (50%), este componente contribuiría principalmente a la viscosidad global del sistema, ya que la viscosidad de pico (VP) disminuye a menos de la mitad cuando el BM no es adicionado (desde 899 cP hasta 284 cP).



**Figura 5.5.** Mezclas de HA+FM (1:1) con y sin 3 concentraciones de BM (10%, 25%, 50%). **a)** 3g HA+FM; **b)** curva superior: 2.7 g HA+FM y 0,3 g BM, curva inferior: 2,7 g HA+FM; **c)** curva superior: 2,25 g HA+FM y 0,75 g BM, curva inferior: 2,25 g HA+FM; **d)** curva superior: 1,5 g HA+FM y 1,5 g BM, curva inferior: 1,5 g HA+FM. Las líneas rojas indican la temperatura medida.

**Serie c: evaluación del agregado de bagazo de manzana a una cantidad constante de harina y fécula**

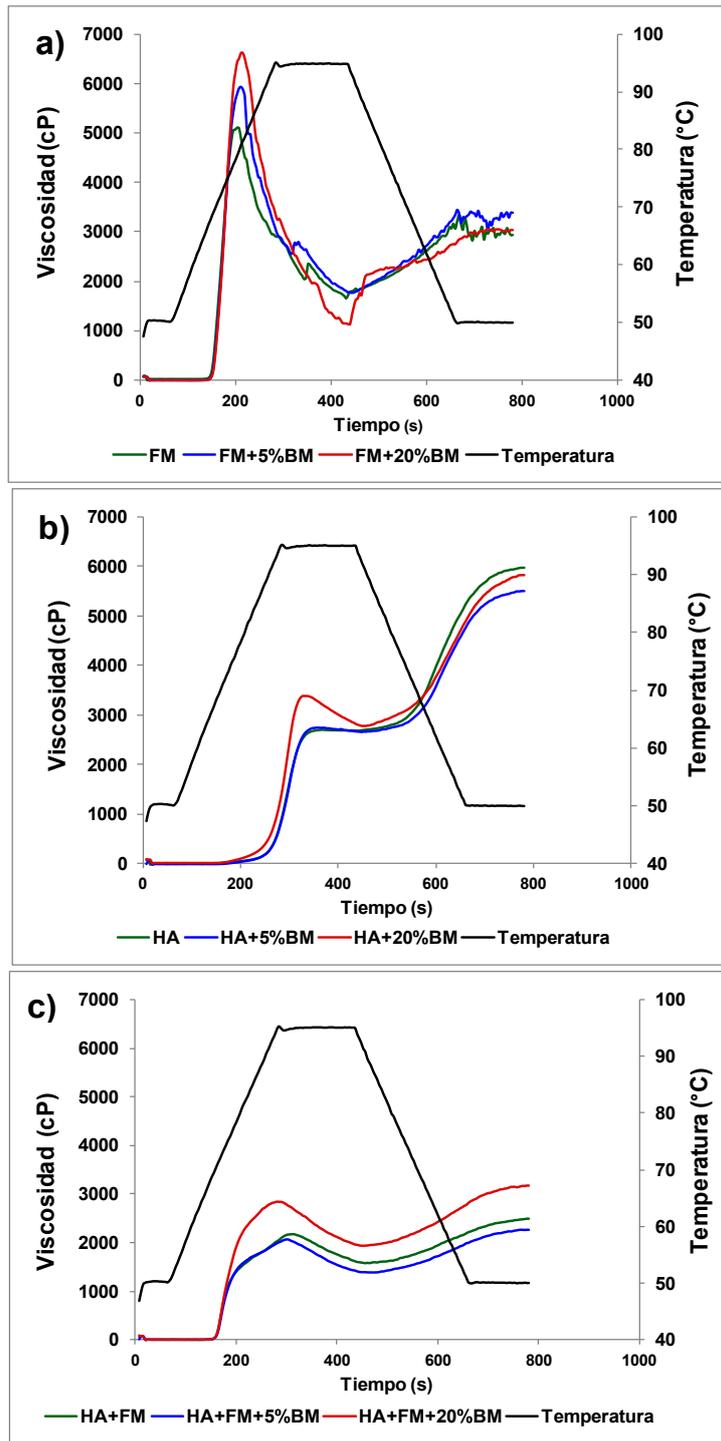
En la tercera serie de experimentos (**serie c**) se trabajó con una cantidad constante de los materiales que contienen almidón: HA, FM, HA+FM adicionando BM en forma creciente. Se trata del segundo caso tipificado por BeMiller (2011).

La mayor adición de BM (20%), condujo a un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de los valores de VP (Tabla 5.3.) (Figura 5.6.) con respecto al control en todos los casos (HA, FM, HA+FM) sugiriendo un efecto de sinergismo ya que el BM solo no presentó desarrollo de viscosidad con el calentamiento (Figura 5.1.a). También se observó una tendencia a aumentar en la VF, aunque no siempre significativa. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la Tp cuando se adicionó BM.

Las mismas tendencias fueron encontradas por Chaisawang y Supphantharika (2006) cuando adicionaron diferentes cantidades de goma xántica y goma guar a una suspensión de almidón de mandioca, ya que se observaron incrementos en VP, B, S y VF. Cuando realizaron viscoamilogramas con los hidrocoloides solos, no observaron desarrollo de viscosidad, análogamente al comportamiento del BM en el presente estudio. Este efecto, que se puede considerar sinérgico fue interpretado por los autores asumiendo que el sistema es bifásico, con la goma localizada en la fase continua y cuya concentración aumenta drásticamente a medida que el almidón se hincha durante la gelatinización y reduce el volumen de la fase accesible a la goma. Esto explicaría el aumento de viscosidad de las mezclas.

Weber y col. (2009) propusieron dos posibles explicaciones para los cambios causados por los hidrocoloides sobre los parámetros viscoamilográficos: a) la asociación de la goma con el almidón hinchado o con la amilosa soluble y fracciones de amilopectina de bajo peso molecular de la pasta; b) la competencia de la goma con el almidón por el agua libre del sistema. En los sistemas almidón-BM, teniendo en cuenta que gran parte de sólidos del BM son fibra insoluble, la primera explicación estaría limitada a la cantidad de fibra soluble que puede interactuar aunque no se pueden descartar interacciones entre la superficie de las partículas insolubles de BM y la superficie de los gránulos de almidón. El segundo mecanismo de competencia por el agua estaría también involucrado dada la capacidad de hidratarse tanto de la fibra como de los gránulos.

El otro fenómeno que puede influir sobre los perfiles amilográficos es la presencia de azúcares del BM. Según Gunaratne y col. (2007) la presencia de azúcares como



**Figura 5.6.** Viscoamilogramas de los distintos niveles de adición de BM (serie c). **a)** FM con 5 y 20% de BM; **b)** HA con 5 y 20% de BM; **c)** HA+FM con 5 y 20% de BM. La línea verde representa el ingrediente sin adición de BM, línea azul (adición de 5% BM), línea roja (adición 20% BM). La línea negra indica la temperatura medida.

sacarosa, glucosa, glicerol e hidroxipropil  $\beta$  ciclodextrina afecta las propiedades térmicas y de viscosidad en almidones de trigo y de papa, encontrando que la VP es mayor con la adición de los azúcares y va incrementando con la concentración de estos.

En general el comportamiento observado con la adición de azúcares es atribuido por los autores a un más estrecho empaquetamiento de los gránulos de almidón hidratados en presencia de los azúcares, lo que afecta la viscosidad. Además atribuyen que el incremento de VF al adicionar diferentes azucares se debería a la posibilidad de los azúcares de crear zonas de unión entre las cadenas de amilosa, lo que facilitaría el realineamiento de las cadenas de amilosa al enfriarse la pasta.

**Tabla 5.3.** Parámetros viscoamilográficos de pastas de Fécula de mandioca (FM), harina de arroz (HA) y mezcla de ambas (HA+FM) para dos niveles de BM adicionado

Muestra	Parámetros				
	VP (cP)	B (cP)	VF (cP)	S (cP)	T <sub>p</sub> (°C)
FM	5109±84 <sup>a</sup>	3418±56 <sup>a</sup>	2940±54 <sup>b</sup>	1250±32 <sup>a</sup>	67±0,1 <sup>a</sup>
+ 5%BM	5907±41 <sup>b</sup>	4118±72 <sup>a</sup>	3307±117 <sup>ab</sup>	1518±148 <sup>a</sup>	66,98±0,04 <sup>a</sup>
+20%BM	6627±22 <sup>c</sup>	5233±349 <sup>b</sup>	3014±30 <sup>b</sup>	1620±400 <sup>a</sup>	67±0,07 <sup>a</sup>
HA	2447±252 <sup>a</sup>	42±22 <sup>a</sup>	5309±65 <sup>a</sup>	2904±38 <sup>a</sup>	88±1 <sup>a</sup>
+ 5%BM	2814±86 <sup>b</sup>	89±2 <sup>a</sup>	5613±14 <sup>a</sup>	2888±60 <sup>a</sup>	83,95±2 <sup>a</sup>
+20%BM	3416±45 <sup>c</sup>	630±31 <sup>b</sup>	5835±3 <sup>a</sup>	3049±11 <sup>a</sup>	83,95±3 <sup>a</sup>
HA+FM(1:1)	2164±23 <sup>a</sup>	614±26 <sup>a</sup>	2462±22 <sup>a</sup>	912±2 <sup>a</sup>	69,45±0,1 <sup>a</sup>
+ 5%BM	2032±54 <sup>a</sup>	654±44 <sup>a</sup>	2232±52 <sup>a</sup>	854±42 <sup>a</sup>	69,08±0,1 <sup>a</sup>
+20%BM	2884±54 <sup>b</sup>	955±66 <sup>b</sup>	3233±76 <sup>b</sup>	1304±87 <sup>b</sup>	69,1±0,1 <sup>a</sup>

Media  $\pm$  DE; diferentes letras dentro de cada grupo, en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

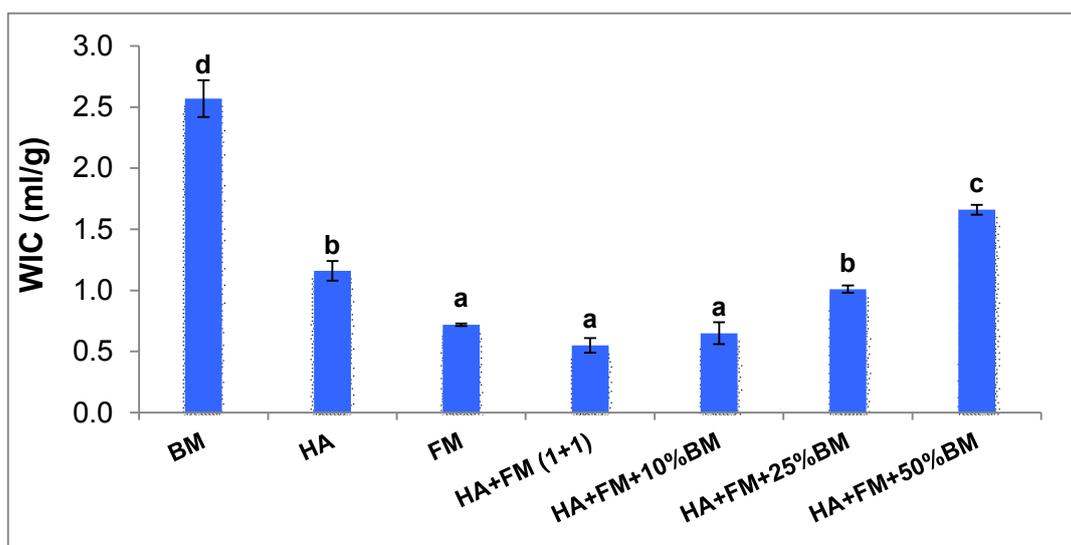
### 5.1.2. Ensayo de absorción de agua (WIC)

Para evaluar el grado de competición por el agua del BM respecto a lo almidones, se realizó un ensayo de WIC, el cual se ha definido como la cantidad de agua que es espontáneamente imbibida por la matriz analizada. Esta cantidad de agua es medida a través del dispositivo de Bauman (Figura 2.3), el cual funciona por capilaridad (Torgersen y Toledo, 1977). Esta técnica en general se emplea para evaluar las propiedades funcionales de las proteínas, en particular se ha ensayado en Añon y col. (2001). Entre los trabajos que han empleado esta técnica se pueden mencionar los

realizados sobre aislados proteicos de soja, harinas de poroto caupí sometidos a diferentes tratamientos térmicos (Avanza y col., 2012) y concentrados proteicos de girasol con diferente contenido fenólico, obtenidos a partir de la torta de aceite de girasol (Salgado y col., 2012).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran en la Figura 5.7.

Cuando se comparan los materiales de manera individual, se encontró que el BM presentó el mayor valor de WIC (2,6 mL/g sólidos) lo que está probablemente relacionado con la hidrofiliidad de sus componentes, principalmente pectinas, celulosas y hemicelulosas (polisacáridos de la pared vegetal). Por otra parte la HA y FM presentaron menores valores de WIC que el BM. La FM tiene el menor valor (0,72 mL/g sólidos), mientras que la HA presentó un valor mayor (1,16 mL/g sólidos). La HA arroja valores mayores probablemente debido a la presencia en cantidades significativas de componentes hidrofílicos diferentes al almidón como proteínas y fibra. La mezcla de HA+FM (1:1) presentó un valor más bajo (0,55 mL/g sólidos) pero no significativamente diferente al de FM, a pesar de que se esperaría un valor intermedio entre HA y FM. Esto podría sugerir una imbibición preferencial por parte de uno de los componentes, probablemente la HA. Cuando se reemplazó la mezcla HA+FM con cantidades crecientes de BM el valor del WIC aumentó progresivamente de 0,65 hasta 1,66 mL/g sólidos. Esto podría indicar que la absorción de agua por parte del BM prevalecería sobre la absorción del almidón.



**Figura 5.7.** Evaluación de la capacidad de imbibición de agua (WIC) de los ingredientes (BM, HA, FM), mezcla HA+FM (1:1) y mezcla con tres diferentes niveles de reemplazo con BM (10%, 25%,50%).

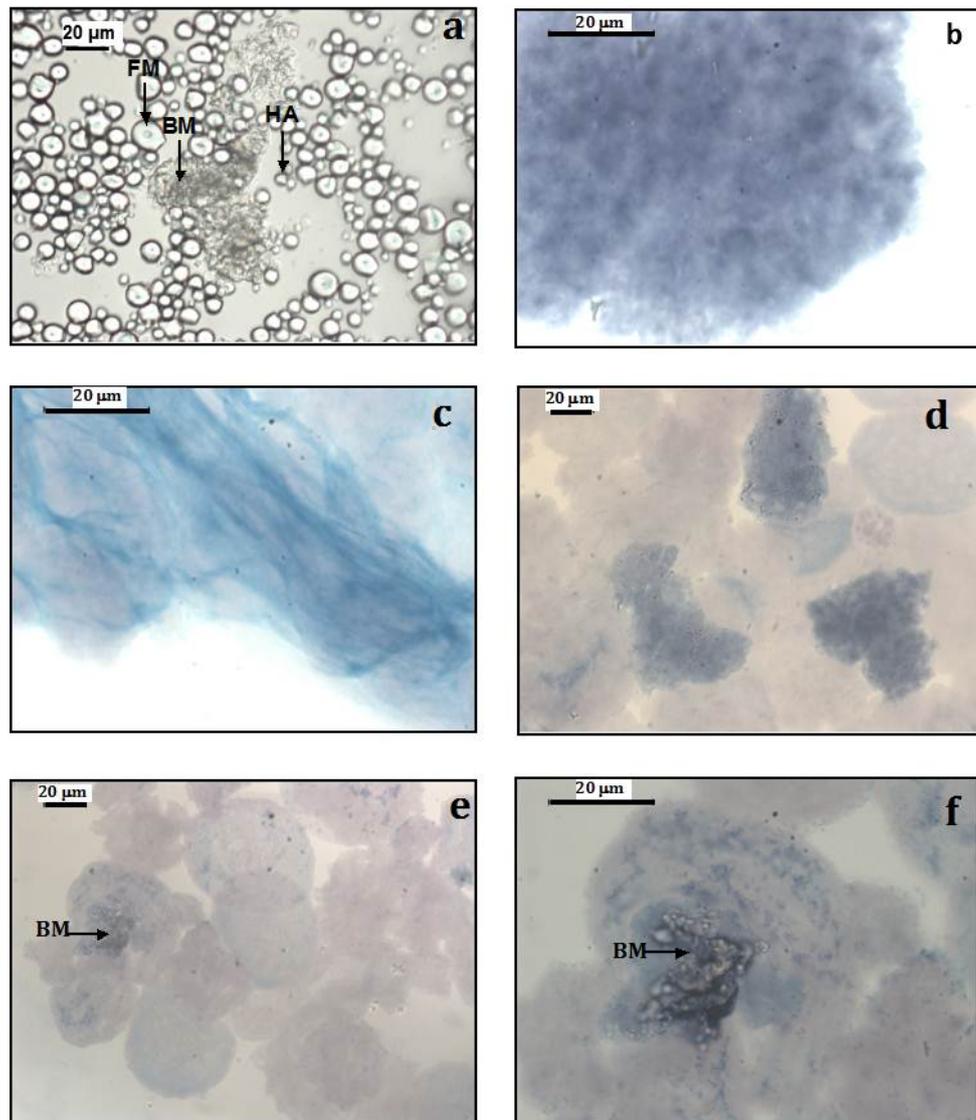
Linlaud y col. (2009) encontraron que la mezcla de harina de trigo con cantidades crecientes (de 0,25 a 1,5%) de diferentes hidrocoloides (goma xántica, galactomananos, pectina) incrementaba progresivamente los valores de WIC. En concordancia, Correa y col. (2012) encontraron que la adición de un nivel de 2% de pectina incrementaba los valores de WIC en harina de trigo. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos con el RVA. La mayor capacidad del BM para absorber agua puede disminuir la disponibilidad de la misma para el hinchamiento de los gránulos de almidón. La restricción del hinchamiento del almidón, especialmente a niveles altos de BM puede contribuir a la disminución de la viscosidad del sistema. Yildiz y col. (2013) propusieron que la adición de fibra insoluble a una matriz alimenticia causa una distribución desigual del agua debido a una tendencia competitiva de hidratación por parte de las fibras, lo cual afecta la capacidad de hinchamiento del almidón.

### **5.1.3. Microscopía de campo claro de los sistemas modelo**

Se observaron en microscopio de campo claro alícuotas de los sistemas analizados con el RVA. En la Figura 5.8. se muestran las micrografías antes y después de la gelatinización en los sistemas (HA+ FM +BM). En la Figura 5.8. a) se puede apreciar el tamaño relativo de las partículas de BM en comparación con los gránulos de almidón. Esta micrografía puede ser comparada con la micrografía f) de la Figura 4.1. En este caso las partículas de BM pueden apreciarse mejor ya que en la foto mencionada del capítulo 4, la tinción puede haber sido parcial, sobre los componentes más afines con el fluoróforo. Cabe recordar, como se vio en el Capítulo 3 que la distribución de tamaños de partícula presenta dos poblaciones principales con tamaños medios de 0,84  $\mu\text{m}$  y 241,03  $\mu\text{m}$  (Figura 3.2).

Respecto al almidón se puede observar que los gránulos provenientes de HA son menores que los de FM, como se observara en la Sección 4.1 en las micrografías tomadas con CLSM. Esto está de acuerdo con lo informado por Thomas y Atwell (1999) en donde describen que los gránulos de almidón de arroz tienen un rango de diámetro entre 1-5  $\mu\text{m}$ , mientras que los de mandioca están entre 4-35  $\mu\text{m}$ .

Después de la gelatinización de HA (Figura 5.8. b) y FM (Figura 5.8. c), se observan diferencias en la estructura de la red. HA exhibe una matriz continua agregada donde se pueden apreciar los pequeños gránulos hinchados, que fueron uniformemente teñidos con lugol. Si bien en esta micrografía sólo se pueden apreciar los gránulos, en



**Figura 5.8.** Microscopia de campo claro para los sistemas modelo almidón-bagazo de manzana, sistemas con sólidos constantes 0.5 g (2%p/V). **a)** Mezcla HA+FM (1:1) con 2.5% de remplazo con BM (40 X), geles de: **b)** HA (100 X), **c)** FM (100 X) **d)** mezcla de HA+FM (40 X), **e)** HA+FM con 50% de remplazo con BM (40 X), **f)** HA+FM con 50% de remplazo con BM (100X). Las barras en las microfotografías corresponden a una escala de 20 µm.

la matriz existen otras estructuras (fragmentos de pared del endosperma, cuerpos proteicos) como se describió en la sección 4.1. En el gel de mandioca, los gránulos todavía pueden ser visualizados como estructuras discretas, no completamente desintegradas, rodeadas de filamentos de amilosa, la que se observa teñida de color azul intenso.

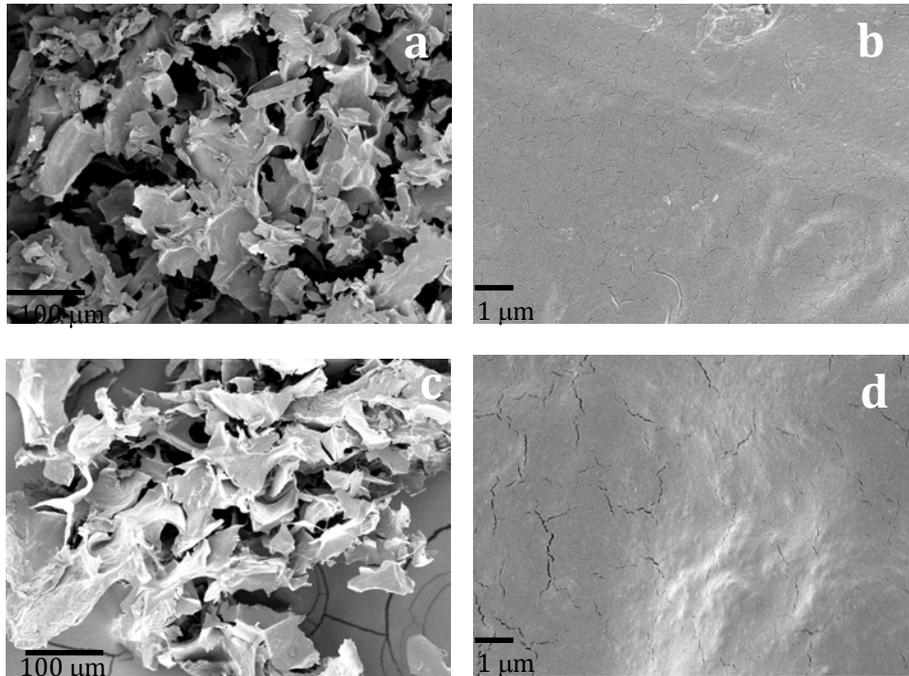
Ribotta y Rosell (2010), encontraron que la estructura granular del almidón de mandioca puede ser completamente desintegrada por agitación durante el proceso de empastado, dando lugar a la formación de una fase dispersa continua de amilosa/amilopectina. Karam y col. (2006) también observaron que los gránulos de almidón en geles de almidón de mandioca habían perdido su integridad y la matriz de amilosa podía ser observada con tinción con lugol.

En los sistemas binarios, una buena integración de las dos redes de almidón, depende en gran medida de la posibilidad de co-gelatinización como han informado Karam y col. (2006). En la Figura 5.8. d) el gel de HA+FM presenta dos regiones diferentes: la formada por los gránulos de almidón de mandioca hinchados (ligeramente teñidos), y la región que tiene los gránulos de arroz aglomerados (azul oscuro). La formación de esta estructura heterogénea puede explicarse por la diferencia en la temperatura de empastado de los materiales (Tabla 5.1.). Puesto que la temperatura de gelatinización de la FM es menor que la de HA, los gránulos de mandioca comienzan a absorber agua y gelatinizar antes que los gránulos de arroz. Por lo tanto esta dispersión de gránulos hidratados de mandioca confinaría a los pequeños gránulos de almidón de arroz de la harina en determinadas zonas, que quedan así enriquecidas con ellos. Las partículas de BM no se hinchan de la manera que lo hacen los almidones, y para la población mayoritaria de partículas de BM sus tamaños fueron menores a los gránulos de FM. Cuando el BM fue incluido en la mezcla HA+FM Figura 5.8. (e, f) se formaron (al igual que con el almidón de arroz) agregados distribuidos al azar e inmersos en una matriz continua de FM. A partir de las observaciones con microscopía de campo claro podrían describirse las suspensiones de HA+FM+BM como una matriz de FM gelatinizada relativamente predominante en donde están inmersos y agregados los gránulos gelatinizados de almidón de arroz y las partículas de BM.

#### **5.1.4. Microscopia electrónica de barrido de los sistemas modelo gelificados**

La parte final del perfil viscoamilográfico obtenido a través del RVA y especialmente la VF, refleja el comportamiento de los sistemas de almidón durante el enfriamiento y

permite predecir su estabilidad durante el almacenamiento. Para evaluar las interacciones entre los principales componentes durante el almacenamiento, se prepararon sistemas modelo basados en HA, FM, BM y agua para efectuar el análisis a través de SEM. Los resultados se muestran en la Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Microscopia electrónica de barrido para los sistemas modelo HA+FM sin y con BM, con nivel de sólidos constante (3 g). **a)** Mezcla HA+FM (1:1) (200X), **b)** HA+FM (1:1) (10.00 K X), **c)** Mezcla de HA+FM reemplazada en un 50% por BM (200X), **d)** Mezcla de HA+FM reemplazada en un 50% por BM (10.00 K X).

La Figura 5.9. (a y b) muestra la apariencia del sistema obtenido por la mezcla de los ingredientes con almidón sin la presencia de bagazo de manzana, después del almacenamiento, bajo dos aumentos diferentes. Se puede observar que el almidón gelatinizado muestra una estructura de red abierta (a), con sólidos agregados en forma de láminas. Con una amplificación mayor (Figura 5.9. b) se pueden observar pequeñas grietas sobre la superficie de estas laminas.

En las pastas obtenidas cuando se reemplaza la mezcla HA+FM con un 50% de BM (Figura 5.9. c y d) se aprecia una estructura más agregada, y la superficie de las láminas también se ve diferente, más rugosa y exhibiendo grietas más grandes (Figura 5.9. d). Esta diferencia en la apariencia en las superficies de las estructuras de los

geles se puede relacionar con las observadas entre las migas sin y con BM en la Figura 4.11. El BM conducía a paredes alveolares más rugosas e irregulares.

Lai y col. (2011) encontraron que en mezclas de almidón gelatinizado de arroz con fibra dietaria, esta última tenía la capacidad de retener agua alrededor de los gránulos de almidón, acelerando la reasociación de las moléculas de amilosa y amilopectina. Sasaki y col. (2004) informaron que cuando el almidón de trigo fue mezclado con fracciones insolubles de polisacáridos no almidonosos, se observó un mayor poder de hinchamiento que en el caso del almidón solo, indicando que estas fracciones insolubles tienen una alta capacidad para retener agua alrededor de los gránulos acelerando por lo tanto la reasociación de las moléculas.

En las pruebas realizadas en el presente trabajo, la notable capacidad del BM para hidratarse, también podría aumentar la concentración efectiva del almidón y promover la agregación, aunque este hecho no se reflejaría en un aumento de la viscosidad final amilográfica (VF) (Figura 5.2.), debido a la menor concentración de almidón.

#### **5.1.5. Propiedades térmicas de los componentes analizados por calorimetría diferencial de barrido**

Aunque la gelatinización del almidón en sistemas acuosos está muy estudiada, mucho menos conocimiento se tiene acerca de las transiciones térmicas en sistemas como las masas o batidos libres de gluten, debido a la complejidad e interacciones entre el almidón y los ingredientes (Kobyłański y col., 2004).

Con el objeto de entender las interacciones que ocurren durante el horneado del batido, se analizaron las propiedades térmicas de los sistemas descritos en Materiales y Métodos (2.2.7.4), conteniendo ingredientes almidonosos (FM, HA), fuente de fibra (BM) y proteína (CH). El BM utilizado en estos ensayos correspondió a la cosecha 2010, más rico en fibra que el correspondiente a 2012 (Tabla 3.2 y 3.3).

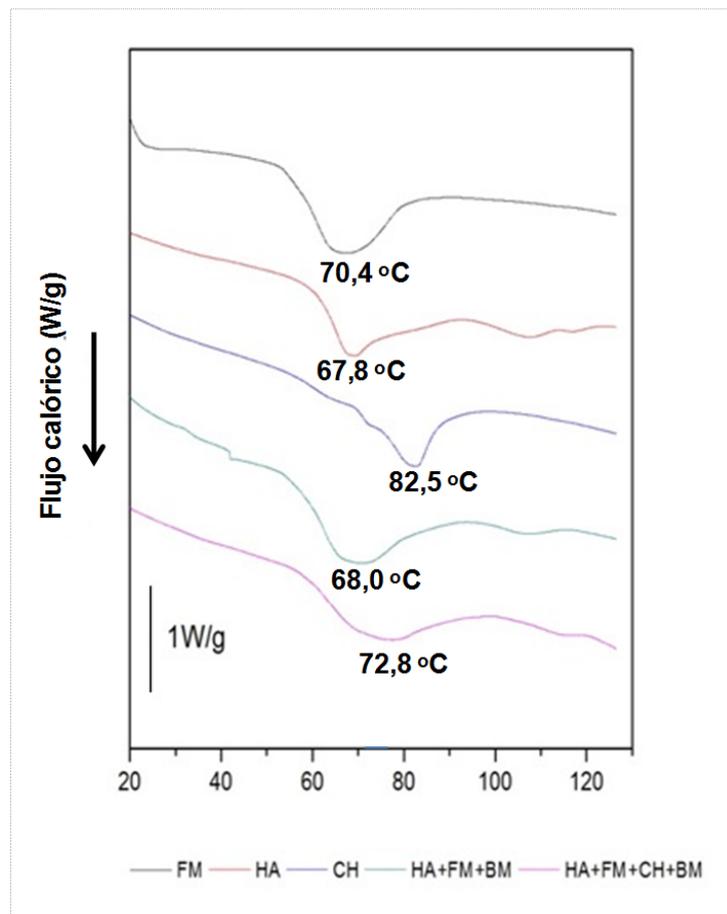
Las propiedades térmicas del almidón como la temperatura de gelatinización y los cambios de entalpía son importantes para entender mejor las interacciones que ocurren durante el proceso de horneado. Estas propiedades dependen de la fuente de almidón, del contenido de humedad y de la relación amilosa/amilopectina.

En cuanto a la fuente botánica del almidón, esta influencia puede ser atribuida a la distribución del tamaño de los gránulos, a la cristalinidad (grado y/o forma polimórfica) a la organización de moléculas dentro del granulo o a la naturaleza química de los polímeros de almidón, que varían de acuerdo a la fuente. Por otra parte en sistemas con un contenido de humedad alto o intermedio, la temperatura inicial y de pico son

independientes del contenido de agua, mientras que la temperatura final es mucho más influenciada por el agua disponible durante la gelatinización. Además en función del contenido de agua, se puede presentar más de un pico endotérmico al realizar el análisis calorimétrico (Fredriksson y col., 1998; Waigh y col., 2000; Liu y col., 2006). Como se dijo en la Introducción (Sección 1.2.1.1.) el proceso de gelatinización en condiciones de restricción de agua deja de ser cooperativo y se produce un desdoblamiento de la endoterma.

En la Figura 5.10. los tres primeros termogramas corresponden a las materias primas principales (HA, FM, CH) en sistemas con una relación sólidos: agua de 1:1. Esta relación fue elegida teniendo en cuenta que es similar a la que se tiene en las formulaciones de los batidos descritas en el capítulo anterior (el diseño abarcó formulaciones entre 41 y 47% de sólidos totales). En todos los casos se observó una única endoterma. En el caso del BM no se hallaron endotermas en el rango de trabajo (resultado no mostrado).

En la Tabla 5.4., se muestran las temperaturas inicial, de pico y final y entalpías de gelatinización (HA, FM) o desnaturalización proteica (CH) para cada componente puro. La concentración de sólidos en todas las muestras ensayadas varió entre el 45 y 50,5 % (p/p). Para la FM se encontró un rango de gelatinización entre 59,79 y 95,33°C. Estas temperaturas concuerdan con los rangos informados por otros autores (Wootton y Bamunuarachchi, 1979; Moorthy y col. 2002), quienes informaron una variación de la T inicial entre 63,4°C y 68°C y T final entre 73,4°C y 98°C, según la variedad. Para HA los valores encontrados en este trabajo, que varían entre 61°C y 91,78°C concuerdan con los estudios de Kim y col. (2010) quienes informaron valores de T inicial entre 53,9°C y 65,5°C y T de pico entre 60,8 y 75,6°C para estudios hechos con una relación almidón: agua de 1:3. Por otro lado, estudios de Chávez-Murillo y col. (2012), informan valores de T de pico entre 64,2°C y 75,1°C (para una relación sólido:agua de 1:2). En general, las temperaturas finales informadas en este trabajo son algo superiores a las encontradas en literatura debido al mayor nivel de sólidos usado que conduce a una restricción de agua que dificulta en cierto grado la gelatinización. Debido a esto, el corrimiento típico a valores más altos, en la temperatura final de la endoterma de gelatinización (Fredriksson y col., 1998) fue evidente. Las entalpías obtenidas también concuerdan con las informadas por estos autores. Las variaciones encontradas pueden vincularse con la relación amilosa/amilopectina y con el diferente patrón cristalino de los almidones según se describe en los trabajos mencionados.



**Figura 5.10.** Termogramas típicos y temperaturas de pico promedio para diferentes sistemas e ingredientes con una relación sólidos:agua 1:1 (BM cosecha 2010)

**Tabla 5.4.** Parámetros obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para los ingredientes puros en agua con una relación 1:1

Muestra	Concentración (% p/p)	T inicial (°C)	T pico (°C)	T final (°C)	$\Delta H$ (J/g)
FM	45,55±1,85*	59,79±0,02	70,37±0,03	95,33±4,91	13,13±0,46
HA	46,04±0,24	61,00±0,19	67,85±0,15	91,78±0,97	9,03±1,30
CH	50,49±1,16	72,18±0,53	82,46±0,19	94,81±0,52	6,56±0,06

\* Desviación estándar; los promedios corresponden a duplicados. La entalpía se informa respecto a g de sólido

En diferentes trabajos que se han realizado para conocer las propiedades térmicas de la clara de huevo y su interacción con diferentes hidrocoloides (Kobylański y col., 2004; Ibanoglu y Erçelebi, 2007) se han informado dos picos endotérmicos. Kobylański

y col., (2004) han reportado las temperaturas de pico de 72°C y 85,4°C para las proteínas conalbúmina + lisozima y ovoalbúmina, respectivamente, mientras que Ibanoglu y Ercelebi (2007) informaron temperaturas algo inferiores, 68,5°C y 84,1°C respectivamente. En el presente trabajo y como se observa en la Figura 5.10., y en la Tabla 5.4., en la CH analizada se encontró una endoterma con T pico= 82,46°C, coincidente con la temperatura informada para la proteína más estable, la ovoalbúmina. Se observan sin embargo, a menores temperaturas dos picos más pequeños aproximadamente a 65°C y 72°C, que podrían corresponder a otras proteínas no desnaturalizadas. La desnaturalización sufrida por las proteínas de CH es atribuible al tratamiento térmico sufrido a nivel industrial por el material, lo que podría haber afectado principalmente a la proteína más termolábil (conalbúmina).

En la Figura 5.10. se muestran asimismo, los termogramas de los sistemas modelo complejos constituidos por las distintas fuentes de almidón y el bagazo de manzana (HA+FM+BM); y de almidones, bagazo de manzana y clara de huevo (HA+FM+BM+CH). Los termogramas obtenidos para los sistemas modelo con combinación de los distintos componentes no mostraron desdoblamiento de la endoterma, observándose un único pico. En algunos casos, en aquellos sistemas conteniendo HA se observaron endotermas menores entre 100 y 120°C, asignables al complejo amilosa-lípido. En la Tabla 5.5. se muestra la variación de los parámetros calorimétricos, de los distintos sistemas combinados de HA, FM, BM y CH.

En los casos en que había más de una transición térmica (gelatinización + desnaturalización proteica) no se pudo calcular la entalpía en base a g de almidón.

Al agregar CH, las temperaturas inicial y de pico se encuentran corridas a mayores valores (59,43 y 69,91°C) respecto al sistema de HA+FM (56,83 y 66,23°C (Figura 5.10.)). Aunque la entalpía de desnaturalización de las proteínas de CH es menor que la de gelatinización, la entalpía global obtenida (14,26 J/g) no es significativamente diferente a la del sistema sin CH, probablemente porque se compensa con la menor proporción de almidón en la mezcla.

**Tabla 5.5.** Propiedades térmicas de sistemas modelo con relación sólidos: agua 1:1

Relación de sólidos	T inicial (°C)	T pico (°C)	T final (°C)	ΔH global (J/g)	ΔHg (*) (J/g)
HA+FM (1:1)	56,83±0,40 <sup>a</sup>	66,23±1,39 <sup>a</sup>	93,23±0,51 <sup>a</sup>	14,14±0,52 <sup>ab</sup>	14,73±0,55 <sup>a</sup>
HA+FM+CH (4:4:1)	59,43±0,23 <sup>bc</sup>	69,91±1,00 <sup>bc</sup>	93,32±2,48 <sup>a</sup>	14,26±0,75 <sup>ab</sup>	nd
HA+FM+BM (4:4:1)	57,77±0,95 <sup>ab</sup>	67,96±0,76 <sup>ab</sup>	94,34±2,07 <sup>a</sup>	11,98±2,90 <sup>ab</sup>	14,09±3,41 <sup>a</sup>
HA+FM+BM+CH (4:4:1:1)	57,32±0,25 <sup>ab</sup>	72,84±0,88 <sup>c</sup>	97,19±1,05 <sup>a</sup>	11,67±1,20 <sup>ab</sup>	nd

promedio±DE Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (\*) corregido respecto al total de almidón.

Al adicionar BM a HA+FM no se observaron corrimientos significativos en las temperaturas, a pesar de que el BM aporta, por su composición tanto fibra como azúcares de bajo PM. El agregado simultáneo de BM y CH incrementó significativamente la temperatura de pico, respecto al sistema HA+FM.

Los resultados mostrados en la Figura 5.10 y las Tablas 5.4 y 5.5 corresponden a sistemas con relación sólidos:agua de 1:1 que es aproximadamente la relación que se tiene en las formulaciones de los panes sin gluten antes del horneado.

Adicionalmente, se realizaron ensayos con menores y mayores contenidos de sólidos para los sistemas sin clara de huevo (HA+FM+BM) en una relación de ingredientes 4:4:1. Los niveles de sólidos comparados fueron 26, 36, 64 y 83 % (p/p). Para los dos últimos niveles no se observaron transiciones térmicas en el rango estudiado, debido a que la restricción de agua es tal que impide la gelatinización. Para los sistemas con mayor nivel de agua (26-36% de sólidos) los valores de temperaturas inicial (56,05-55,07°C), de pico (66,78-67,06°C) así como las entalpías totales (11,46-11,03 J/g) no mostraron diferencias significativas con los valores de HA+FM+BM de la Tabla 5.5. Sin embargo, si se encontraron diferencias en la temperatura final (81,30-81,44°C) que dio valores significativamente menores en los sistemas con mayor cantidad de agua.

Randzio y col. (2003) estudiaron el efecto de la adición de fibra de soja en diferentes cantidades sobre un sistema de almidón de trigo - agua, encontraron que el principal pico endotérmico, siempre aparece a las mismas temperaturas, independientemente de la cantidad de fibra o agua adicionadas. Este pico, a la luz de investigaciones hechas con <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR (resonancia magnética nuclear) y difracción de rayos X se originaría más en la pérdida del orden molecular de la doble hélice de la amilopectina que en la pérdida de cristalinidad del gránulo de almidón. Estos autores

informaron la desaparición de la endoterma a bajos contenidos de agua (< 50%) y altos contenidos de fibra (> 50% sobre los sólidos totales) lo que se debería a la capacidad de embeber agua de la fibra, y la consecuente deshidratación parcial del almidón. En los sistemas modelo analizados en el presente trabajo, la cantidad de fibra que aporta el bagazo al sistema no llega a impedir la transición del almidón y por lo tanto la desaparición de la endoterma.

Los sistemas HA+FM+BM+CH en niveles de sólidos inferiores al 50% (30-38%) mostraron entalpías (11,54 y 11,19 J/g) que no diferían significativamente de las del sistema con relación sólidos:agua 1:1 (Tabla 5.5). Sin embargo, las temperaturas de pico y final fueron significativamente más bajas (68,54-69,42°C y 84,69-88,14°C para 30 y 38% de sólidos, respectivamente). No se observaron transiciones térmicas en niveles de 67 y 83 % de sólidos en sistemas con HA+FM+BM+CH.

Finalmente se realizó el análisis calorimétrico de formulaciones seleccionadas de batidos (se tomaron solo tres puntos representativos del diseño) y se observaron valores similares a los obtenidos con los sistemas HA+FM+BM+CH descritos anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6.** Parámetros de las transiciones térmicas en batidos seleccionados (BM 2014)

BM (%); A (%)	% sólidos	T inicial (°C)	T pico (°C)	T final (°C)	ΔH global (J/g)
5;132,5 (4,5:4,5:1:1)*	43	64,29±0,99 <sup>a</sup>	71,88±0,50 <sup>a</sup>	88,93±1,49 <sup>a</sup>	12,25±0,42 <sup>a</sup>
12,5;132,5 (4,5:4,5:1,25:1)	44	63,86±0,30 <sup>a</sup>	71,49±0,86 <sup>a</sup>	88,22±1,20 <sup>a</sup>	13,40±3,70 <sup>a</sup>
17,8;120,1% (4,5:4,5:1,8:1)	47	65,47±0,86 <sup>a</sup>	73,70±0,18 <sup>b</sup>	91,98±3,35 <sup>a</sup>	9,33±0,52 <sup>a</sup>

BM: Bagazo de manzana, A: agua

promedio±DE Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (\*) Entre paréntesis se muestra la relación entre HA, FM, BM y CH

Estos ensayos se hicieron con BM 2014, de composición similar al 2010 en cuanto a contenido de fibra y azúcares. Si bien BM 2010 y BM 2014 presentaron un contenido de fibra mayor que el BM 2012 utilizado en los ensayos reológicos y de panificación

descritos en el Capítulo 4 y 5, la comparación de tres puntos diferentes del diseño permite evaluar la variación de los parámetros calorimétricos frente a cambios en el contenido de BM y agua en presencia de otros componentes.

Los valores de temperaturas algo mayores obtenidos en los batidos pueden relacionarse con la presencia de otros ingredientes que completan la formulación, en particular el azúcar agregada (sacarosa).

Kobyłański y col. (2004) encontraron que realizando combinaciones óptimas de HPMC, agua y CH se podían obtener batidos libres de gluten con distintos comportamientos térmicos. Estos autores informaron que la interacción HPMC-agua controlaba principalmente la temperatura inicial de gelatinización del almidón. Por otro lado, las temperaturas de pico y final fueron influenciadas por el aditivo y efectos opuestos del agua y la CH. Estos autores señalaron que a niveles de agua de 80% y con 0,5% de HPMC en combinación con 10% de CH se producía un aumento tanto de la temperatura de gelatinización inicial como de las de pico y final. Esta situación sería similar a la encontrada en el punto del diseño con mayor cantidad de BM y menor cantidad de agua donde se observó un corrimiento general de las temperaturas hacia valores más altos.

#### **5.1.5.1. Retrogradación**

Durante el almacenamiento de los panes sin gluten ocurre, como en el caso de los panes convencionales, el crecimiento cristalino y la reorganización de la amilopectina (Demirkesen y col., 2014), proceso que se puede evaluar a través de la entalpía obtenida a diferentes tiempos de almacenamiento.

Con el punto del diseño correspondiente a la mayor restricción de agua y nivel alto de BM (17,82%BM; 120,1%A) se realizó un ensayo de almacenamiento para analizar la evolución de la cristalización (retrogradación) de amilopectina. La entalpía de retrogradación es de igual magnitud pero signo contrario que la entalpía registrada, que es la involucrada en el proceso de fusión de los cristales formados. Los resultados se muestran en la Tabla 5.7.

Para el día 0 no se registraron transiciones térmicas en el rango estudiado, indicando que las temperaturas alcanzadas en el proceso de horneado fueron suficientes para gelatinizar el almidón y desnaturalizar la CH presente. A partir del día 1 se observó un incremento de la entalpía de retrogradación hasta llegar a 6,61 J/g en el día 9.

**Tabla 5.7.** Parámetros de las retrogradación para la miga del punto (17,82%BM; 120,1%A)

Día almacenamiento	T inicial (°C)	T pico (°C)	T final (°C)	ΔH (J/g)
1	45,00±0,33 <sup>a</sup>	58,90±1,50 <sup>a</sup>	71,45±0,89 <sup>a</sup>	1,14±0,22 <sup>a</sup>
3	45,93±0,01 <sup>ab</sup>	59,01±0,52 <sup>ab</sup>	73,44±0,11 <sup>a</sup>	3,75±0,60 <sup>b</sup>
6	46,24±1,31 <sup>ab</sup>	59,19±0,71 <sup>a</sup>	73,06±1,04 <sup>a</sup>	4,46±0,68 <sup>b</sup>
9	48,73±1,09 <sup>b</sup>	61,87±0,67 <sup>b</sup>	77,71±1,16 <sup>b</sup>	6,61±1,14 <sup>c</sup>

promedio±DE Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas

Demirkessen y col (2014) obtuvieron en panes sin gluten a base de harina de arroz y harina de castaña, adicionados con diferentes hidrocoloides y sometidos a distintas condiciones de horneado, valores de entalpía de retrogradación de 1 a 2 J/g a las 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente. Después de 4 días de almacenamiento en las mismas condiciones el rango de entalpías de retrogradación varió entre 1,7 y 3 J/g. Estos valores están en el orden de los informados en la Tabla 5.7.

Santos y col. (2008) informaron que el reemplazo de parte de harina de trigo con fibra puede tener efecto sobre la retrogradación del almidón, por un lado disminuyendo por “dilución” el almidón gelatinizado lo que disminuirá la disponibilidad del mismo para la cristalización. Por otro lado, los autores informaron que la cinética de retrogradación se ve afectada, y que según el tipo de fibra podrá ser incrementada o disminuida.

Existen diferentes estudios acerca del efecto de la sacarosa en la retrogradación de los almidones; en algunos de ellos se encontró que la sacarosa acelera la retrogradación (Chang y Liu, 1991), y en otros que la retrogradación fue reducida por su presencia durante tratamientos de congelación-descongelación (Arunyanart y Charoenrein, 2008).



## **Conclusiones parciales**

La adición de BM a las mezclas de FM y HA modificó el perfil reológico obtenido por RVA. Cuando el bagazo de manzana reemplazó parcialmente los ingredientes almidonosos (HA y FM), se obtuvieron menores viscosidades (VP, VF). El BM, ingrediente rico en fibra dietaria, tiene una importante habilidad para captar agua como se comprobó mediante las mediciones de WIC. Este comportamiento puede permitir la reducción del agua disponible en el sistema, afectando de esta manera la gelatinización del almidón (menor hinchamiento de los gránulos, y menor viscosidad en la pasta caliente) y el comportamiento durante la gelificación (menores viscosidades finales después del enfriamiento). La presencia de fibra y azúcares solubles en el BM, jugarían un papel compensatorio y evitarían el descenso de la viscosidad en el sistema (VP, VF) en el rango de sustitución de almidón de 2,5-25%. Cuando en lugar de reemplazar almidón, el BM es adicionado a mezclas manteniendo constante la cantidad de HA+FM, la viscosidad incrementa de manera significativa sugiriendo un sinergismo entre los componentes.

Las partículas de BM siguen siendo en su mayoría insolubles durante el calentamiento y no desarrollan viscosidad durante el ensayo en el RVA. Los análisis de microscopia en las pastas de HA+FM+BM revelaron que los geles obtenidos no son sistemas uniformes, y que exhiben una matriz predominante de FM en la cual quedan embebidos los gránulos gelatinizados y agregados de la HA y las partículas de BM. Esto se debería a que la FM comienza a gelatinizar primero y por tanto regula la formación de la estructura de la pasta, induciendo a la agregación de las partículas más pequeñas, como las de HA y del BM. El estudio de SEM sugirió que la presencia de BM tiene influencia sobre la estructura de los geles durante el almacenamiento. Mediante análisis térmico se verificó que el BM no modificó las temperaturas significativamente al ser adicionado a las mezclas de los otros componentes (HA+FM ó HA+FM+CH) aunque sí influyó la CH en las temperaturas inicial y de pico. Cuando se realizaron los análisis térmicos en sistemas modelo con diferente concentración de sólidos, se observó una fuerte dependencia de la temperatura final con el contenido de sólidos, cuando mayor es el contenido de sólidos (mayor restricción de agua) mayor es la temperatura final de la endoterma. Las formulaciones completas (batidos) obtuvieron parámetros térmicos un tanto superiores, probablemente por la presencia de los otros componentes. El análisis de retrogradación de amilopectina durante el almacenamiento en una formulación con alto contenido de BM, estaría indicando que no hay inhibición de la misma por la presencia de BM.

Estos resultados confirman que el BM adicionado interacciona con el almidón e influye tanto en la reología de los sistemas durante el calentamiento como en su estructura final al enfriarse. La heterogeneidad de las paredes interalveolares de la miga observadas por SEM en el Capítulo 4, se puede explicar en función del tipo de gel obtenido, el cual presenta más de una fase (rica en FM o rica en HA y fibra). Estas interacciones aunque analizadas en este Capítulo en sistemas con una mayor cantidad de agua también tendrían lugar en una matriz con mayor concentración de sólidos como la de los batidos y podrían explicar las altas viscosidades que restringen hasta cierto punto la expansión de la celdas de gas conduciendo a productos de menor  $V_e$ . Por otro lado el análisis calorimétrico indica que las temperaturas de tratamiento térmico durante la panificación son suficientes para obtener las transiciones en el almidón y la posterior retrogradación (de amilopectina) transcurre aun en presencia de fibra y es un factor que contribuye al endurecimiento observado en los panes durante el almacenamiento.

## **Capítulo 6**

# **Conclusiones Generales**



## 6.1. Conclusiones

A partir de bagazo de manzana sin procesar se pudo obtener, aplicando secado a temperatura moderada, molido, tamizado y esterilización un producto de baja humedad, estable, con aroma y color agradables, los niveles de fibra variaron según la cosecha: 67,91% para 2010; 41,04 % para 2012; 62,85% para 2014.

Como fuente proteica para panificados libres de gluten con bagazo de manzana, se encontró que la clara de huevo presentaba ventajas sobre otras fuentes proteicas como las de origen lácteo, lo que en parte es debido a sus propiedades como agente espumante. La adición de sacarosa en la formulación permitió resaltar el sabor a manzana y mejoró el perfil sensorial del producto final.

La cantidad de agua y bagazo de manzana influyen sobre el comportamiento reológico de los batidos y la calidad del producto final en formulaciones libres de gluten. La expansión de la masa y la retención del gas durante el desarrollo del proceso requieren de una matriz elástica. Es posible analizar las tendencias y encontrar un balance adecuado entre estas dos variables para lograr este tipo de matrices aplicando la metodología de superficie de respuesta.

De acuerdo a las observaciones por distintas técnicas microscópicas se pudo determinar que la clara de huevo juega un papel fundamental en la estabilidad de la espuma en el batido pues se ubica en la interfase aire agua y protege las celdas de aire evitando la coalescencia. Bajo estas condiciones, el paso de una espuma a una esponja que se produce en el horneado generara una miga de mejores características alveolares.

Los batidos presentaron comportamiento viscoelástico y la viscosidad aumentó con el incremento del nivel de bagazo de manzana. En los mayores niveles de BM (17,8 y 20) %, tanto el modulo viscoso como el modulo elástico mostraron una dependencia de la frecuencia y además se observó un punto de cruce entre los módulos. Este comportamiento ha sido descrito como característico de los sistemas poliméricos concentrados.

Respecto a los atributos de textura, se observó un aumento de la dureza acompañado de una disminución de la cohesividad y resiliencia en los panificados libres de gluten al incrementar la cantidad de bagazo de manzana. La cantidad de agua adicionada fue fundamental para moderar estos efectos.

Se encontró una relación entre el volumen específico del producto, las características del alveolado de la miga y los parámetros reológicos de los batidos, pues el menor tamaño promedio de alveolo y la mayor densidad alveolar fueron obtenidas en las formulaciones que presentaron mayores módulos dinámicos, que son las que contienen mayores niveles de bagazo de manzana y menores de agua. Esta condición influye sobre el levado, por lo que estas formulaciones presentaron una miga más compacta, relacionada con la dureza observada.

De acuerdo a los ensayos de almacenamiento y análisis térmicos realizados se observó que este tipo de producto cuando presenta elevados niveles de bagazo de manzana y restricción de agua presentaría una vida útil corta, pues a las 24 h de almacenamiento mostró altos valores de durezas. El agregado de bagazo de manzana no inhibió la retrogradación de amilopectina. La menor vida útil suele ser una característica de los panificados libres de gluten.

Los productos panificados elaborados a partir de bagazo de manzana obtuvieron resultados aceptables en la evaluación sensorial y además estos productos evaluados se podrían rotular como ricos en fibra de acuerdo a la legislación vigente en la FDA (al menos 4 g/ 100 de fibra dietaria total).

La adición de bagazo de manzana en sistemas a base de almidón modificó las propiedades viscoamilográficas. Al reemplazar los almidones con cantidades crecientes de bagazo se observó una disminución de la viscosidad pico y la final del sistema pero esta disminución fue más marcada por arriba del 25 % de sustitución. La presencia de azúcares de bajo peso molecular y de fibra soluble aportada por el bagazo en ciertos niveles podrían estabilizar la viscosidad del sistema hasta cierto punto.

Por su contenido de fibra, el bagazo de manzana tiene una marcada habilidad para captar agua como se observó mediante las mediciones de WIC, esta capacidad puede

restringir la disponibilidad de agua y la gelatinización del almidón en los sistemas estudiados.

En la gelatinización del sistema binario harina de arroz-fécula de mandioca en presencia de bagazo de manzana se observó que la formación de la matriz es gobernada por la gelatinización de la fécula de mandioca la cual tiene una menor temperatura de empastado. Se generan así zonas enriquecidas en aquellos gránulos (arroz) que gelatinizan después y en partículas insolubles de bagazo de manzana, que no sufren mayores cambios durante el proceso.

Con los análisis realizados en este trabajo se muestra que la utilización de un subproducto agroindustrial de la industria de jugos como el bagazo de manzana tiene un gran potencial para ser utilizado en formulaciones a base de almidón en la cuales se requiera mejorar el nivel de fibra dietaría. Sin embargo y dependiendo de la cantidad de bagazo de manzana agregado, este puede causar cambios importantes sobre la microestructura y propiedades de empastado de los sistemas a base de almidones.

### **Perspectivas**

El aprovechamiento de este subproducto de la industria de jugos como ingrediente alimentario permitiría contar con una fuente alternativa de fibra abundante y relativamente económica que, como se desprende de este y otros trabajos en el tema, se puede aplicar en diversos productos alimentarios. El uso del bagazo de manzana contribuiría además a la disminución de residuos en esta industria y por lo tanto a una mejora ambiental.

Para lograr un adecuado aprovechamiento de este subproducto agroindustrial y de esta manera poder aplicarlo en diversas matrices alimentarias, se hace necesaria la implementación en las empresas de jugo de manzana de un tratamiento de acondicionamiento de este subproducto para asegurar su inocuidad y estabilidad.

Para un mejor aprovechamiento, sería necesario reducir la variabilidad inherente a la composición de este tipo de productos de origen vegetal, que depende de numerosos factores, entre ellos la materia prima y los pasos del procesamiento industrial en sí. Es éste quizá el punto de mayor dificultad pues en las empresas se hacen mezclas de diferentes tipos de manzanas que además, de acuerdo a las prácticas agrícolas,

climas, suelos varían en su composición fisicoquímica, a lo que se suman variantes que se implementan durante la producción de jugo y que afectan también la composición del subproducto. Sería entonces necesaria una estandarización para obtener características similares de composición del bagazo de manzana obtenido como subproducto.

# **Bibliografía**



## A

- AACC (2001). The definition of dietary fiber. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal foods world*, 46, 112–126.
- Abdelghafor, R. F., Mustafa, A. I., Krishnan, P. G., Sciences, C., Sciences, N. (2011). Quality of Bread from Composite Flour of Sorghum and Hard White Winter Wheat. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(1), 9–15.
- Abdul-Hamid, A., Luan, Y. S. (2000). Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 68(1), 15–19.
- Ablin A. (2011). El mercado del jugo concentrado de manzana. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/productos/JugoConcentradoManzana\\_2011\\_11Nov.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/bebidas/productos/JugoConcentradoManzana_2011_11Nov.pdf)
- Aboughe-Angone, S., Nguema-Ona, E., Ghosh, P., Lerouge, P., Ishii, T., Ray, B., Driouich, A. (2008). Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate research*, 343(1), 67-72.
- Akin, D. E. (2010). Chemistry of plant fibres. *Industrial Applications of Natural Fibres: Structure, Properties and Technical Applications*, 10, 13.
- Aleson-Carbonell, L., Fernández-Lopez, J., Pérez-Alvarez, J. A., Kuri, V. (2005). Functional and Sensory Effects of Fibre-rich Ingredients on Breakfast Fresh Sausages Manufacture. *Food Science and Technology International*, 11(2), 89–97.
- Almansa Carrascosa, C. Fundamentos de la Microscopia confocal espectral. Universidad de Alicante, España. <http://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-6.pdf>. Ingresado 2015.
- Alvarez-Jubete, L., Auty, M., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010). Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, 230(3), 437–445.
- Alvis, A., Vélez, C. A., Villada, H. S. (2008). Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame , Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas

- Physicochemical and Morphological Analyses of Yam , Cassava and Potato Starches and Determination of their Viscosity, *19*(1), 19–28.
- Anderson, J. W., Hanna, T. J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *The Journal of nutrition*, *129*(7), 1457S-1466s.
- Anderson, J.W., Major, A.W., (2002). Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, *88*: 263-271.
- Andersson, H., Öhgren, C., Johansson, D., Kniola, M., Stading, M. (2011). Extensional flow, viscoelasticity and baking performance of gluten-free zein-starch doughs supplemented with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1587–1595.
- Añón, M. C., Sorgentini, D. A., Wagner, J. R. (2001). Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4852–4858.
- Anton A.A., Artfield S.D. (2008). Hydrocolloids in gluten free breads: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *59*, 11-23.
- Arendt E.K., O'Brien C.M., Schober T., Gormley T.R., Gallagher E. (2002). Development of gluten-free cereal products. *Farm and Food*, *12*, 21-27.
- Arendt, E. K., Morrissey, A., Moore, M. M., Dal Bello, F. (2008). Gluten-free breads. In E. K. Arendt, & F. Dal Bello (Eds.), *Gluten-free cereal products and beverages* (pp. 289-320). MA: Academic Press.
- Armero E., Collar C. (1998). Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. *Journal of Cereal Science*, *28*, 165-174.
- Arunyanart, T., Charoenrein, S. (2008). Effect of sucrose on the freeze–thaw stability of rice starch gels: Correlation with microstructure and freezable water. *Carbohydrate Polymers*, *74*(3), 514–518.
- Asociación Celíaca Argentina <http://www.celiaco.org.ar/celiaquia>. Ingresado 2010.

Avanza, M. V., Chaves, M. G., Acevedo, B. A., Añón, M. C. (2012). Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 123–130.

Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 40–47.

## B

Bach Knudsen, K.E. (2001). The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90:3-20.

Bagley, E. B., Christianson, D. D. (1982). Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration. *Journal of Texture Studies*, 13(1), 115–126.

Baixaui, R., Sanz, T., Salvador, A., Fiszman, S. M. (2008). Muffins with resistant starch: Baking performance in relation to the rheological properties of the batter. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 502–509.

Barcenas M.E., Rosell C.M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*. 19:1037–43

Barrera, G. N., Bustos, M. C., Iturriaga, L., Flores, S. K., León, A. E., Ribotta, P. D. (2013). Effect of damaged starch on the rheological properties of wheat starch suspensions. *Journal of Food Engineering*, 116(1), 233–239.

BeMiller, J.N. (2011). Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 386–423.

BeMiller, J.N., Whistler, R. L. (1993). Carbohidratos. En: Fennema Owen.R. (Ed), *Química de los alimentos*. Acribia SA Zaragoza.

Bennett, W. G., Cerda, J. J. (1996). Benefits of dietary fiber. Myth or medicine?. *Postgraduate medicine*, 99(2), 153-6.

- Bergmann, J. F., Chassany, O., Petit, A., Triki, R., Caulin, C., Segrestaa, J. M. (1992). Correlation between echographic gastric emptying and appetite: influence of psyllium. *Gut*, 33(8), 1042-1043.
- Bhushan, S., Kalia, K., Sharma, M., Singh, B., Ahuja, P. S. (2008). Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(4), 285–96.
- Biliaderis, C. G., Maurice, T. J., Vose, J. R. (1980). Starch Gelatinization Phenomena Studied By Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Food Science*, 45(6), 1669–1674.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad K., Martinez, C., D orronoro, M., Gonzalez, C.A., Key, T.J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., Riboli, E., (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361: 1496-1501.
- Bodé S, Gudmand-Høyer E. (1988). Incidence and clinical significance of lactose malabsorption in adult coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 23:484–88
- Boersma, W. H., Laven, J., Stein, H. N. (1990). Shear thickening (dilatancy) in concentrated dispersions. *AIChE Journal*, 36(3), 321–332.
- Borromei, C., Careri, M., Cavazza, A., Corradini, C., Elviri, L., Mangia, A., Merusi, C. (2009). Evaluation of Fructooligosaccharides and Inulins as Potentially Health Benefiting Food Ingredients by HPAEC-PED and MALDI-TOF MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, 530639, 1-9.
- Bosaeus, I. (2004). Fibre effects on intestinal functions (diarrhoea, constipation and irritable bowel syndrome). *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 33-38.
- Box G.E.P., Wilson K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 13, 1-45.
- Brites, C., Trigo, M. J., Santos, C., Collar, C., Rosell, C. M. (2010). Maize-Based Gluten-Free Bread: Influence of Processing Parameters on Sensory and Instrumental Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 707–715.

Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 30–42.

Buckeridge, M.S. (2010). Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154, 1017-1023.

## C

Calderón de la Barca, A. M. C., Rojas-Martínez, M. E., Islas-Rubio, A. R., Cabrera-Chávez, F. (2010). Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 65(3), 241–6

Cappa, C., Lucisano, M., Mariotti, M. (2013). Rheological properties of gels obtained from gluten-free raw materials during a short term aging. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 464–472.

Carl von Ossietzky University of Oldenburg. <http://www.gmehling.chemie.uni-oldenburg.de/16633.html>. Ingresado 2015

Carson, K. J., Collins, J. L., Penfield, M. P. (1994). Unrefined, Dried Apple Pomace as a Potential Food Ingredient. *Journal of Food Science*, 59(6), 1213–1215.

Castells, X. E. (2009). Valoración de residuos procedentes de grandes industrias. En *Reciclaje de residuos industriales: residuos sólidos urbanos y fangos de depuradora* (pp. 533-636). Díaz de Santos.

Ceballos, H., Sánchez, T., Morante, N., Fregene, M., Dufour, D., Smith, A. M., Mestres, C. (2007). Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7469–7476.

Chaisawang, M., Supphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 641–649.

Champ, M. (2004). Resistant starch. In: Eliasson AC (Editor), *Starch in food: structure, function and applications*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.

- Champ, M., Langkilde, A.-M., Brouns, F., Kettlitz, B., Collet, Y. L. B. (2003). Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. *Nutrition Research Reviews*, 16, 71–82.
- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., Von B Brinkley, L.J. (2000). Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 342: 1392-1398.
- Chang, S., Liu, L. (1991). Retrogradation of Rice Starches Studied by Differential Scanning Calorimetry and Influence off Sugars , NaCl and Lipids. *Journal of Food Science*, 56(2), 564–566.
- Charrondiere, U.R., Chevassus-Agnes, S., Marroni, S. Burlingame, B. (2004). Impact of different macronutrient definitions and energy conversion factors on energy supply estimations. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 339-360.
- Chau, C.F., Huang, Y. L. (2003). Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of Citrus sinensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2615–8.
- Chávez-Murillo, C. E., Méndez-Montevalvo, G., Wang, Y.J., Bello-Pérez, L. A. (2012). Starch of diverse Mexican rice cultivars: physicochemical, structural, and nutritional features. *Starch - Stärke*, 64, 745–756.
- Chawla, R., Patil, G. R. (2010). Soluble Dietary Fiber. *Comprehensive Reviewa in Food Science and Food Safety*, 9, 178–196.
- Chen, H., Rubenthaler, G. L., Leung, H. K., Baranowski, J. D. (1988). Chemical, Physical, and Baking Properties of Apple Fiber Compared with Wheat and Oat Bran. *Cereal Chemistry*, 65(3), 244–247.
- Chen, P., Yu, L., Simon, G., Petinakis, E., Dean, K., Chen, L. (2009). Morphologies and microstructures of cornstarches with different amylose-amylopectin ratios studied by confocal laser scanning microscope. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 241–247.
- Código Alimentario Argentino (2011). www. anmat.gov.ar. Capítulo XVII-Alimentos de régimen o dietéticos (Art. 1385, 1386).

Código Alimentario Argentino (2011). [www. anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar). Capítulo I-Disposiciones Generales (Art. 6).

Colin-Henrion, M., Mehinagic, E., Renard, C. M. G. C., Richomme, P., Jourjon, F. (2009). From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry*, 117(2), 254–260.

Correa, M. J., Pérez, G. T., Ferrero, C. (2012). Pectins as Breadmaking Additives: Effect on Dough Rheology and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2889–2898.

Crockett, R., Ie, P., Vodovotz, Y. (2011). Effects of soy protein isolate and egg white solids on the physicochemical properties of gluten-free bread. *Food Chemistry*, 129(1), 84–91.

## D

Daniels D.G.H., Fisher N. (1976). Release of carbon dioxide from dough during baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 351-357.

Davis, J. P., Foegeding, E. A. (2007). Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2), 200–210.

Del Campo, G., Berregi, I., Iturriza, N., Santos, J. I. (2006). Ripening and Changes in Chemical Composition of Seven Cider Apple Varieties. *Food Science and Technology International*, 12(6), 477–487.

Delzenne, N. M., Kok, N. (2001). Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 456s-458s.

Demarchi, S. M., Quintero Ruiz, N. A., Giner, S. A. (2014). Sorptional behaviour of rosehip leather formulations added with sucrose or polydextrose. *Biosystems Engineering*, 118(1), 83–94.

Demirkesen, I., Campanella, O. H., Sumnu, G., Sahin, S., Hamaker, B. R. (2014). A Study on Staling Characteristics of Gluten-Free Breads Prepared with Chestnut and Rice Flours. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 806-820.

- Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., Sahin, S. (2010). Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 101(3), 329–336.
- Deng, Q., Penner, M. H., Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712–2720.
- Derriche, R., Berrahmoune, K.S. (2007). Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering* 78, 1149-1154.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., Verma, M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 38(1), 6–13.
- Donovan, J. W. (1979). Phase transitions of the starch-water system. *Biopolymers*, 18(2), 263–275.
- Dreher, M. (1999). Food sources and uses of dietary fiber. Capitulo 24 en *Complex carbohydrates in foods*. Editado por Cho, S.S., Prosky, L., y Dreher, M., Marcel Dekker, Inc. Basel.
- Dreher, M.L. (2001). Dietary fiber overview. Capitulo 1 en *Handbook of dietary fiber*. Editado por S. Sungsoo Cho, M.L. Dreher, Marcel Dekker, Inc, New York.

## E

- Edwards, C.A., Parrett, A.M., (1996). Plant cell wall polysaccharides, gums and hydrocolloids: Nutritional Aspects. En: A-C Eliasson (ed). *Carbohydrates in foods*. Marcel Dekker Inc., New York. 319-346 pp.
- Ehrenkranz, J. R. L., Lewis, N. G., Ronald Kahn, C., Roth, J. (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(1), 31–38.
- Eliasson A.C., Gudmundsson M. (1996). Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in Food*. Editado por Eliasson AC. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 431-503.

- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411–421.
- El-Zoghbi, M. (1994). Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food Chemistry*, 49(1), 33–37.
- Englyst, H.N., Quigley, M.E., Hudson, G.J. (1994). Determination of Dietary Fibre Non-starch Polysaccharides with Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of constituent sugars. *Analyst*, 119:1497-1509.
- Erdogdu-Arnoczky, N., Czuchajawoska, Z., Pomeranz, Y. (1996). Functionality of whey and casein in fermentation and in breadmaking by fixed and optimised procedures. *Cereal Chemistry*, 73, 309-316.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, 38, 1167–1173.
- Esteller, M. S., Amaral, R. L., Lannes, S. C. D. S. (2004). Effect of sugar and fat replacers on the texture of baked goods. *Journal of Texture Studies*, 35(4), 383–393.
- Esteller, M. S., Zancanaro Jr, O., Palmeira, C. N. S., da Silva Lannes, S. C. (2006). The effect of kefir addition on microstructure parameters and physical properties of porous white bread. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 26-31.
- European Food Information Council (EUFIC)  
<http://www.eufic.org/page/es/nutricion/alimentos-funcionales/>. Ingresado 2015.

## F

- Fasano, A., Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120(3), 636–651.
- Faubion, J. M., Hoseney, R. C. 1990. The viscoelastic properties of wheat flour doughs. In H. Faridi, & J. M. Faubion (Eds.), *Dough rheology and baked product texture*. NY: Van Nostrand Reinhold. (pp. 211-239).

- FDA (2012) Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, 2nd ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring, p. 87–92. <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm2006773.htm>. Ingresado 2015.
- Fennema, O. (2000). Química de los Alimentos. 2da. Edición Ed. Acribia Zaragoza, 1258.
- Fernández Bañares, F., Gassull Duró, M.A. (1999). Fibra dietética. Capítulo 8 en Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 125-138
- Ferrero C., Ribotta P.D., De Lamballerie M. (2009). Desarrollo de masas precocidas libres de gluten aptas para congelación. En *Actas Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Formulación y Nutrición*. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Ed G.T Perez y A.E. León (ISBN: 978-987-25617-0-3), Tomo 1, pp 140-146, Córdoba, Argentina.
- Figueira, F. D. S., Crizel, T. D. M., Silva, R.C., Salas-Mellado, M. M. (2011). Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(04), 308–316.
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395–401.
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3 SPEC. ISS.), 284–292.
- Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.C., Åman, P. (1998). The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, 35(3-4), 119–134.
- Furuta, H., Maeda, H., (1999). Rheological properties of water-soluble soybean polysaccharides extracted under weak acidic condition. *Food Hydrocolloids*, 13: 267-274.

## G

- Gallagher E, Kunkel A, Gormley TR, Arendt EK. (2003 b). The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf-life (intermediate and long term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 218, 44-48.
- Gallagher E., Polenghi O., Gormley T.R. (2002). Novel rice starches in gluten-free bread. In *International Association of Cereal Chemists Conference*, pp. 24–26. St. Paul, MN: AACC.
- Gallagher, E., Gormley, T. R. (2002). The quality of gluten free breads produced at retail outlets. Research Report. Dublin, Teagasc, The National Food Centre.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 143–152.
- Gallagher, E., Gormley, T., Arendt, E. (2003 a). Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 153–161.
- Gálvez, A. V., Aravena, E. L., Mondaca, R. L. (2006). Isotermas de adsorción en harina de maíz (*Zea mays* L.). *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(4), 821–827.
- García Peris, P., Bretón Lesmes, I., de la Cuerda Compes, C., Cambor Álvarez, (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutricion Hospitalaria*, 17:11-16.
- Gasa, J., Castrillo, C. (1992). Criterios De Utilizacion De Subproductos Agroindustriales En La Alimentacion De Rumiantes. *Hojas Divulgadoras*, Núm. 13/91, 24.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W.S, Courtin C.M, Gebruers K., Delcour J.A. (2005). Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 12-30.
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*, 42(7), 840–846.

- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74, 309–315.
- Gould, J. M., Jasberg, B. K., Dexter, L. ., Hsu, J. T., Lewis, S. M., Fahey, J. R. (1989). High-fibre, Noncalorie flour substitute for baked foods. Effect of alkaline peroxide-treated lignocellulose on dough properties. *Cereal Chemistry*, 66(3), 201–205.
- Gray J.A., BeMiller J.N. (2003). Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1-20.
- Gray, J., (2006). Dietary Fibre. Definition, Analysis, Physiology and Health. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels : ILSI
- Green, C. (2001). Fibre in enteral nutrition. *Clinical Nutrition*, 20, 23–39.
- Grigelmo-Miguel, N., Carreras-Boladeras, E., Martin-Belloso, O. (1999). Development of high-fruit-dietary-fibre muffins. *European Food Research and Technology*, 210(2), 123–128.
- 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.
- Guillon, F., Champ, M., Thibault, J.F., (2000). Dietary fibre functional products. En: GR Gibson y CM Williams (eds.). *Functional Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, England. 315-355 pp.
- Guillon, F., Champ, M.M.J., (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33: 233-245.
- Gujral HS, Haros M, Rosell C.M. (2003). Starch hydrolysing enzymes for retarding the staling for rice bread. *Cereal Chemistry*, 80, 750-754.
- Gujral, H. S., Rosell, C. M. (2004). Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37(1), 75–81.
- Gularte, M. A., de la Hera, E., Gómez, M., Rosell, C. M. (2012). Effect of different fibers on batter and gluten-free layer cake properties. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 209–214.

Gunaratne, A., Ranaweera, S., Corke, H. (2007). Thermal, pasting, and gelling properties of wheat and potato starches in the presence of sucrose, glucose, glycerol, and hydroxypropyl cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 70(1), 112–122.

## H

Hager, A., Axel, A., Arendt, E. (2011). Status of Carbohydrates and Dietary Fiber in Gluten-free Diets. *Cereal Foods World*, 56, 109–114.

Hager, A., Wolter, A., Czerny, M., Bez, J., Zannini, E., Arendt, E. K., Czerny, M. (2012). Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts, 235, 333–344.

Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H.V. (2010). Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384–395.

Harper, W. J., Zadow, J. G. (1984). Heat induced changes in whey protein concentrates as related to bread manufacture. *New Zealand journal of dairy science and technology*, 19, 229-237.

Heller, S. N., Hackler, L. R., Rivers, J. M., Van Soest, P. J., Roe, D. A., Lewis, B. A., Robertson, J. (1980). Dietary fiber: the effect bran on colonic function of particle in young size of wheat. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33, 1734–1744.

Hipsley, E. H. (1973). Letter: Dietary “fibre” and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 420–422.

Holt, S. H., Brand-Miller, J. C., Stitt, P. A. (2001). The effects of equal-energy portions of different breads on blood glucose levels, feelings of fullness and subsequent food intake. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(7), 767-773.

Holt, S., Muntyan, I., Likyer, L. (1996). Soya-based diets for Diabetes Mellitus. *Alternative & Complementary Therapies*, March/April 1996.

Hug-Iten, S., Escher, F., Conde-Petit, B. (2001). Structural properties of starch in bread and bread model systems: Influence of an antistaling alpha-amylase. *Cereal Chemistry*, 78(4), 421–428.

Hug-Iten, S. (2000). *Staling of Bread and Bread Model Systems Role of Starch and Amylases* (Doctoral dissertation, SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH).

Hüttner, E.K., Arendt E.K. (2010). Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 303-312.

## I

Ibanoglu, E., Erçelebi, E. A. (2007). Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chemistry*, 101(2), 626–633.

## J

Jenkins, D.J., Wolever, T.M., Rao, A.V., Hegele, R.A., Mitchell, S.J., Ranson, T.P., (1993). Effect of blood lipids of very high intakes of fiber in diets low in saturated fat and cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 329: 21-26.

Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Augustin, L.S.A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A.L., Axelsen, M. (2003). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76:266-273.

Jenkins, P. J., Donald, A. M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 315–321.

Johnson, I.T., (2000). Anti-tumour properties. En: GR Gibson and CM Williams (eds.). *Functional Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, England. 141-162 pp.

## K

Kadharmestan, C., Baik, B. K., Czuchajowska, Z. (1998). Thermal behavior of whey protein concentrate treated by heat and high hydrostatic pressure and its functionality in wheat dough. *Cereal Chemistry*, 75(6), 785–791.

Kaewmanee, T., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2011). Effect of NaCl on thermal aggregation of egg white proteins from duck egg. *Food Chemistry*, 125(2), 706–712.

- Kamal-Eldin, A., Lærke, H. N., Knudsen, K.-E. B., Lampi, A.-M., Piironen, V., Adlercreutz, H., Katina, K., Poutanen, K., Åman, P. (2009). Physical, microscopic and chemical characterisation of industrial rye and wheat brans from the Nordic countries. *Food & Nutrition Research*, 53, 1–11.
- Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R. (2005). Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace: A review. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 79, 189–196.
- Kanwar, S., Kumar, G., Sahgal, M., Singh, A. (2012). Ethanol Production Through *Saccharomyces* Based Fermentation Using Apple Pomace Amended with Molasses. *Sugar Tech*, 14(3), 304–311.
- Karam, L. B., Ferrero, C., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., Grossmann, M. V. E. (2006). Thermal, microstructural and textural characterisation of gelatinised corn, cassava and yam starch blends. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(7), 805–812.
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., Autio, K. (2006). Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 479–491.
- Kenny, S., Wehrle, K., Stanton, C., Arendt, E. K. (2000). Incorporation of dairy ingredients into wheat bread: effects on dough rheology and bread quality. *European Food Research and Technology*, 210, 391-396.
- Kent, N. L., Evers, A.D. (1994). Bread-baking Technology. In: Kent, N. L. and Evers, A.D. (Eds.), *Technology of cereals: An introduction for students of food science and agriculture*. (pp. 191-217). Woodhead Publishing.
- Khuri A.I., Cornell, J.A. (1996). Response surfaces: designs and analyses, 2° Edición. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos.
- Kim, C. S., Walker, C. E. (1992). Changes in Starch Pasting Properties Due to Sugars and Emulsifiers as Determined by Viscosity Measurement. *Journal of Food Science*, 57(4), 1009–1013.
- Kim, J.M., Song, J.Y., Shin, M. (2010). Physicochemical properties of high amylose rice starches purified from Korean cultivars. *Starch - Stärke*, 62(5), 262–268.

- Kobyłański, J. R., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. R. (2004). Thermal transitions of gluten-free doughs as affected by water, egg white and hydroxypropylmethylcellulose. *Thermochimica Acta*, 411(1), 81–89.
- Korus J., Witczak M., Ziobro R., Juszczak L. (2009). The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. *Food Hydrocolloids*, 23, 988–995.
- Korus, J., Juszczak, L., Ziobro, R., Witczak, M., Grzelak, K., Sójka, M. (2012). Defatted strawberry and blackcurrant seeds as functional ingredients of gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*, 43(1), 29–39.
- Kushi, L. H., Meyer, K. A., Jacobs, D. R. (1999). Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), 451s-458s.

## L

- Laboratorio de Tecnología Educativa. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. [http://virus.usal.es/web/demo\\_microali/Saureus/SaureusPlaca.html](http://virus.usal.es/web/demo_microali/Saureus/SaureusPlaca.html). Ingresado 2016
- Lai, G., Li, Y., Li, G. (2008). Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(3), 285–91.
- Lai, P., Li, K. Y., Lu, S., Chen, H. H. (2011). Physicochemical characteristics of rice starch supplemented with dietary fibre. *Food Chemistry*, 127(1), 153–158.
- Lapasin, R., Prici, S. (1995). Rheology of Industrial Polysaccharides. Pp. 351–373. London: Blackie Academic & Professional.
- Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J. a. (2004). Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(1), 113–117.
- Lau, C. K., Dickinson, E. (2005). Instability and structural change in an aerated system containing egg albumen and invert sugar. *Food Hydrocolloids*, 19, 111–121.

- Laureati, M., Giussani, B., Pagliarini, E. (2012). Sensory and hedonic perception of gluten-free bread: Comparison between celiac and non-celiac subjects. *Food Research International*, 46(1), 326–333.
- Laurikainen, T., Härkönen, H., Autio, K., Poutanen, K. (1998). Effects of enzymes in fibre-enriched baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 239–249.
- Lavelli, V., Kerr, W. (2012). Apple pomace is a good matrix for phytochemical retention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5660–6.
- Lawton, J. W. (1992). Viscoelasticity of Zein-Starch Doughs. *Cereal Chemistry*, 69(4), 351–355.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1033–1047.
- Levey, D. J., Bissell, H. A., Keefe, S. F. O. (2000). Conversion of nitrogen to protein and amino acids in wild fruits. *Journal of Chemical Ecology*, 26(7), 1749–1763.
- Lewicki, P. (1997). The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(1945), 553–557.
- Licciardello, F., Frisullo, P., Laverse, J., Muratore, G., Del Nobile, M. A. (2012). Effect of sugar, citric acid and egg white type on the microstructural and mechanical properties of meringues. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 453–462.
- Lin, C., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Solhy, A., Clark, J., Koutinas, A., Kopsahelis, N., Stamatelatou, K., Dickson, F., Thankappan, S., Zahouily, M., Brocklesby, R., Luque, R. (2012). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 426–464.
- Lineback, D.R., (1999). The chemistry of complex carbohydrates. En: Susan Sungsoo Cho, Leon Prosky, Mark Dreher (eds). *Complex Carbohydrates in Foods*. Marcel Dekker, Inc. New York.

Linlaud, N. E., Puppo, M. C., Ferrero, C. (2009). Effect of hydrocolloids on water absorption of wheat flour and farinograph and textural characteristics of dough. *Cereal Chemistry*, 86(1900), 376–382.

Liu, H., Yu, L., Xie, F., Chen, L. (2006). Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 357–363.

Lohiniemi S., Maki M., Kaukinen K., Laippala P., Collin P. (2000). Gastrointestinal symptoms rating scale in coeliac disease patients on wheat starch-based gluten-free diets. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 35:947–49.

## M

Maeda, H., (2000). Soluble soybean polysaccharide. En: GO Phillips y PA Williams. Handbook of Hydrocolloids. Woodhead Publishing, Cambridge, England.

Majzoobi, M., Farahnaky, A., Agah, S. (2011). Properties and Shelf-life of Part-and Full-baked Flat Bread ( Barbari ) at Ambient and Frozen Storage. *J. Agr. Sci. Tech.*, 13, 1077–1090.

Mälkki, Y., (2001). Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. *Cereal Foods World*, 46:196-199.

Mann, J. I., Cummings, J. H. (2009). Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(3), 226–229.

Marco, C., Rosell, C. M. (2008). Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours. *Journal of Food Engineering*, 88(1), 94–103.

Mataix J., Gassull M. (2002). Fibra alimentaria. Capítulo 7 en Nutrición y Alimentación Humana. Tomo I. Editorial Ergon, Madrid. 119-135.

Mathlouthi, M., Roge, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food chemistry*, 82(1), 61-71.

- McCarthy D.F., Gallagher E., Gormley T.R, Schober T.J, Arendt E.K. (2005). Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread. *Cereal Chemistry*. 82:609–15.
- McCleary, B. V. (2007). An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 291–308.
- Mezaize, S., Chevallier, S., Le Bail, A, de Lamballerie, M. (2009). Optimization of gluten-free formulations for French-style breads. *Journal of Food Science*, 74(3), E140–6.
- Milde, L. B., Ramallo, L. A., Puppo, M. C. (2010). Gluten-free Bread Based on Tapioca Starch: Texture and Sensory Studies. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 888–896.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., Ring, S. G. (1985). The roles of amylose and amylopectin and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135, 271–281.
- Mills, E. N. C., Wilde, P. J., Salt, L. J., Skeggs, P. (2003). Bubble Formation and Stabilization in Bread Dough. *Food and Bioproducts Processing*, 81(3), 189–193.
- Miyazaki M.R, Hung P.V., Maeda T., Morita N. (2006). Recent advances in application of modified starches for breadmaking. *Trends in Food Science & Technology*, 17:591–99.
- Mohammadifar, M. A., Musavi, S. M., Kiumarsi, A., Williams, P. A. (2006). Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(1), 31–9.
- Mongeau, R., Scott, F.W., Brassard, R. (1999). Definition and analysis of dietary fiber. En: Susan Sungsoo Cho, Leon Prosky, Mark Dreher (eds). *Complex Carbohydrates in Foods*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. 4<sup>o</sup> Edición. John Wiley y Sons. Nueva York. Estados Unidos.
- Moore M.M., Heinbockel M., Dockery P., Ulmer H.M., Arendt E.K. (2006). Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chemistry*. 83:28–36.

Moore M.M., Schober T.J., Dockery P., Arendt E.K. (2004). Textural comparison of gluten free and wheat-based doughs, batters and breads. *Cereal Chemistry*, 81, 567-575.

Moorthy, N. S. (2002). Physicochemical and Functional Properties of Tropical Tuber Starches : A Review. *Starch - Stärke*, 54, 559–592.

Mussatto, S.I., Mancilha, I.M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate polymers*, 68(3), 587-597.

## N

Neves, M. F., Milan, P., Trombin, V. G., Pereira, F. C. (2011). Market drivers of the global beverage consumption in 2010: opportunities for a new positioning to the juice category. In IFAMA Annual World Symposium, Frankfurt, Germany.

Nicolas, J. J., Richardforget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2), 109–157.

Norström, F., Sandström, O., Lindholm, L., Ivarsson, A. (2012). A gluten-free diet effectively reduces symptoms and health care consumption in a Swedish celiac disease population. *BMC Gastroenterology*, 12, 125.

Nunes, M. H. B., Ryan, L. A. M., Arendt, E. K. (2009). Effect of low lactose dairy powder addition on the properties of gluten-free batters and bread quality. *European Food Research and Technology*, 229(1), 31–41.

Nunes, M., Michelle, B. N., Ryan, L. A. M., Arendt, E. K. (2009). Impact of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters. *European Food Research and Technology*, 228, 633–642.

## O

O'Shea, N., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 1–10.

O'Shea, N., Rößle, C., Arendt, E., Gallagher, E. (2015). Modelling the effects of orange pomace using response surface design for gluten-free bread baking. *Food Chemistry*, 166, 223–230.

Onyango C., Unbehend G., Lindhauer M.G. (2009). Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. *Food Research International*, 42, 949-955.

## P

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Mesías, M., Morales, F. J., Saura-Calixto, F. (2014). Evidence for the formation of maillardized insoluble dietary fiber in bread: A specific kind of dietary fiber in thermally processed food. *Food Research International*, 55, 391–396.

Peters, U., Sinha, R., Chatterjee, N., Subar, A.F., Ziegler, R.G., Kulldorff, M., Bresalier, R., Weissfeld, J.L., Flood, A., Schatzkin, A., Hayes, R.B. (2003). Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet*, 361: 1491-1495.

Pisesookbunternng W., D'Appolonia B.L. (1983). Bread staling studies. I: Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values o bread crumb. *Cereal Chemistry*, 60, 298-300.

Polizzoto, L. M., Tinsley, A. M., Weber, C. W., Berry, J. W. (1983). Dietary fibers in muffins. *Journal of Food Science (USA)*, 48, 1: 111-113.

Praznik, W., Cieślik, E., Filipiak-Florkiewicz, A. (2002). Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: Composition and application in bread. *Nahrung - Food*, 46(3), 151–157.

Préstamo, G., Rupérez, P., Espinosa-Martos, I., Villanueva, M. J., Lasunción, M. A. (2007). The effects of okara on rat growth, cecal fermentation, and serum lipids. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 925-928.

Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., Devries, J.W., Schweizer, T.F. Harland, B.F. (1984). Determinations of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67, 6: 1044-1051.

## R

- Ragaei, S., Abdel-Aal, E.-S. M. (2006). Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, 95(1), 9–18.
- Randzio, S. L., Flis-Kabulska, I., Grolier, J.-P. E. (2003). Influence of fiber on the phase transformations in the starch-water system. *Biomacromolecules*, 4(4), 937–43.
- Ranhotra, G. S., Loewe, R. J., Puyat, L. V. (1975). Preparation and evaluation of soy-fortified gluten-free bread. *Journal of Food Science*, 40, 62–64.
- Reidelberger, D. (1994). Cholecystokinin and Control of Food Intake. *The Journal of Nutrition*, 124(8), 1327S–1333S.
- Renzetti, S., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Arendt, E. K. (2010). Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: Rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*, 119(4), 1465–1473.
- Ribotta, P. D., Ausar, S. F., Morcillo, M. H., Pérez, G. T., Beltramo, D. M., León, A. E. (2004). Production of gluten-free bread using soybean flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1969–1974.
- Ribotta, P. D., Rosell, C. M. (2010). Effects of enzymatic modification of soybean protein on the pasting and rheological profile of starch-protein systems. *Starch - Stärke*, 62(7), 373–383.
- Richardson, G., Langton, M., Bark, A., Hermansson, A. (2003). Wheat starch gelatinization – the effects of sucrose, emulsifier and the physical state of the emulsifier. *Starch - Stärke*, 55, 150–161.
- Ridgway, T., Tucker, G., Wiseman, H. (1997). Novel bioconversions for the production of designer antioxidant and colourant flavonoids using polyphenol oxidases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 14, 165–190.
- Roach R.R., Hoseney R.C. (1995). Effect of certain surfactants on the starch in bread. *Cereal Chemistry*, 72, 578-582.
- Ronda, F., Roos, Y. H. (2011). Staling of fresh and frozen gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 53(3), 340–346.

Rosell CM, Collar C, Haros M. (2007). Assessment of hydrocolloid effects on thermo-mechanical properties of wheat using the Mixolab. *Food Hydrocolloids*, 21, 452- 462.

Ross-Murphy, S.B. (1988). Small deformation measurements. In: Blanshard, J.M.V and J.R. Mitchell (Eds.), *Food structure: Its Creation and Evaluation* (pp. 387-400). Butterworths, London.

## S

Sabanis, D., Lebesi, D., Tzia, C. (2009). Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread. *LWT - Food Science and Technology*, 42(8), 1380–1389.

Sabanis, D., Tzia, C. (2011a). Effect of hydrocolloids on selected properties of gluten-free dough and bread. *Food Science and Technology International*, 17(4), 279–91.

Sabanis, D., Tzia, C. (2011b). Selected Structural Characteristics of HPMC-Containing Gluten Free Bread: A Response Surface Methodology Study for Optimizing Quality. *International Journal of Food Properties*, 14(2), 417–431.

Salgado, P. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., Mauri, A. N. (2012). Functional food ingredients based on sunflower protein concentrates naturally enriched with antioxidant phenolic compounds. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists Society*, 89(5), 825–836.

Salinas, M. V. (2013). *Estudio de la calidad panadera, sensorial y nutricional de panes elaborados con harina de trigo fortificada con sales de calcio e inulina*. (Tesis doctoral no publicada). Departamento de Química. Universidad Nacional de La Plata.

Sánchez G. Imagen digital. [http://www.gusgsm.com/espacio\\_color\\_cie\\_lab](http://www.gusgsm.com/espacio_color_cie_lab). Ingresado 2016.

Sanchez, H. D., Osella, C. A., De la Torre, M. A. (2002). Optimization of Gluten-Free Bread Prepared from Corn starch, Rice Flour, and Cassava Starch. *Journal of Food Science*, 67(1), 416–419.

Sanchez, H.D., Osella C.A, De la Torre M.A. (1996). Desarrollo de una formula para pan sin gluten. *Información Tecnológica*. 7:35–42

- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 18(5), 553–563.
- Sandhya Rani, M. R., Bhattacharya, K. R. (1995). Rheology of rice-flour pastes: Relationship of paste breakdown to rice quality, and a simplified Brabender viscograph test. *Journal of Texture Studies*, 26, 587–598.
- Sangnark, A., Noomhorm, A. (2003). Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. *Food Chemistry*, 80(2), 221–229.
- Sangnark, A., Noomhorm, A. (2004). Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Research International*, 37(1), 66–74.
- Saris, W. H. (2003). Glycemic carbohydrate and body weight regulation. *Nutrition reviews*, 61(suppl 5), S10-S16.
- Sasaki, T., Kohyama, K., Yasui, T. (2004). Effect of water-soluble and insoluble non-starch polysaccharides isolated from wheat flour on the rheological properties of wheat starch gel. *Carbohydrate Polymers*, 57(4), 451–458.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289.
- Scheppach, W., Luethrs, H., Melcher, R., Gostner, A., Schaubert, J., Kudlich, T., Weiler, F., Menzel, T. (2004). Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clinical nutrition supplements*, 1(2), 51-58.
- Schieber, A., Hilt, P., Endreß, H. U., Rentschler, C., Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 99–107.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12(11), 401–413.
- Schneeman, O. (1999). Building scientific consensus: The importance of dietary fiber. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 1.

- Schober T.J., Messerschmidt M., Bean S.R., Park S-H., Arendt E.K. (2005). Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. *Cereal Chemistry*, 82, 394-404.
- Schober, T. J., Bean, S. R., Boyle, D. L., Park, S.H. (2008). Improved viscoelastic zein–starch doughs for leavened gluten-free breads: Their rheology and microstructure. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 755–767.
- Schober, T. J., Moreau, R. A., Bean, S. R., Boyle, D. L. (2010). Removal of surface lipids improves the functionality of commercial zein in viscoelastic zein-starch dough for gluten-free breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 417–425.
- Schober, T.J. (2009). Manufacture of gluten-free specialty breads and confectionery products. In: *Gluten-free Food Science and Technology* (edited by E. Gallagher). Pp.130–180. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Segura, M. E. M., Rosell, C. M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 66(3), 224–30.
- Selvendran, R.R., Verena, F.V., Verne, A., (1990). The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. En: D Kritchevsky, C Bonfield y JW Anderson (eds.). *Dietary Fiber*. Plenum Press, New York. 1-15 pp.
- Singh, N., Kaur Bajaj, I., Singh, R. P., Singh Gujral, H. (2003). Effect of different additives on mixograph and bread making properties of Indian wheat flour. *Journal of Food Engineering*, 56, 89-95.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219–231.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178.
- Slavin, J. L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21(3), 411-418.
- Slavin, J. L. (2008). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(10), 1716–1731.

- Song, K. W., Kim, Y. S., Chang, G. S. (2006). Rheology of concentrated xanthan gum solutions: Steady shear flow behavior. *Fibers and Polymers*, 7(2), 129–138.
- Southgate, D.A.T., (1969). Determination of carbohydrates in food II-unavailable carbohydrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20, 6: 331-335.
- Stampfli I., Nersten B. (1995). Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*, 52, 353- 360.
- Stathopoulos, C. E. (2008). Dairy-based ingredients. In: Arendt E.K. and Dal Bello F. (Eds.), *Gluten-free cereal products and beverages* (pp. 217-236). Academic Press.
- Steffe, J. F. (1996). Rheological methods in food process engineering (Segunda edición.). East Lansing, Michigan: Freeman Press.
- Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. Del, Lobo, A. P., Parra, F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, 120(1), 339–342.
- Sudha, M. L., Baskaran, V., Leelavathi, K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104(2), 686–692.
- Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and Properties of Commercial Native Starches. *Starch - Stärke*, 37(1), 1–5.
- Symons, L. J., Brennan, C. S. (2004). The Effect of Barley B-Glucan Fiber Fractions on Starch Gelatinization and Pasting Characteristics. *Journal of Food Science*, 69(4), 257–261.

## T

- Thao, H. M., Noomhorm, A. (2011). Physicochemical Properties of Sweet Potato and Mung Bean Starch and Their Blends for Noodle Production. *Journal of Food Processing & Technology*, 02(01), 1–9.
- Thermofisher. [http://thermofisher.cn/Resources/200802/productPDF\\_2936.pdf](http://thermofisher.cn/Resources/200802/productPDF_2936.pdf)

- Thibault, J. F., Lahaye, M., Guillon, F. (1992). Physico-chemical properties of food plant cell walls. In: Thomas F. Schweizer and Christine A. Edwards (Eds), *Dietary fibre—a component of food* (pp. 21-39). Springer London.
- Thomas, D. J., Atwell, W. A. (1999). *Starches*. Eagan Press Handbook Series. Eagan Press, St.Paul, Minnesota, USA.
- Topuz, A., Topakci, M., Canakci, M., Akinci, I., Ozdemir, F. (2005). Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering*, 66(4), 519–523.
- Torgersen, H., Toledo, R. T. (1977). Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *Journal of Food Science*, 42(6), 1615–1620.
- Toufeili I, Dagher S, Shadarevian S, Nouredine A, Sarakbi M, Farran MT. (1994). Formulation of gluten-free pocket-type flat breads: optimization of methylcellulose, gum arabic, and egg albumin levels by response-surface methodology. *Cereal Chemistry*. 71:594–601
- Trowell, H., Southgate, D. T., Wolever, T. S., Leeds, A., Gassull, M., Jenkins, D. A. (1976). Dietary fibre redefined. *The Lancet*, 307(7966), 967.
- Tudorica, C. M., Kuri, V., Brennan, C. S. (2002). Nutritional and Physicochemical Characteristics of Dietary Fiber Enriched Pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 347–356.
- Turabi, E., Sumnu, G., Sahin, S. (2008). Rheological properties and quality of rice cakes formulated with different gums and an emulsifier blend. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 305–312.

## U

- Union Europea (2006). Regulation No 1924/2006.  
[http://ec.europa.eu/food/safety/labelling\\_nutrition/claims/nutrition\\_claims/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/nutrition_claims/index_en.htm).

**V**

- Van Riemsdijk, L. E., Van der Goot, A. J. (2011). Colloidal Protein Particles Can Be Used to Develop a Gluten-free Bread. *Cereal Foods World*, 56(5), 201.
- Van Soest, P.J., (1963a). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 46, 5, 825-829.
- Van Soest, P.J., (1963b). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 46, 5, 829-835.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous seeds IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 50, 1, 50-55.
- Vendruscolo, F., Albuquerque, P. M., Streit, F., Esposito, E., Ninow, J. L. (2008). Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(1), 1–12.
- Viseras, C., Aguzzi, C., Cerezo, P., Lopez-Galindo, A. (2007). Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 37–50.

**W**

- Wagner M.J., Lucas T., Le Ray D., Trystram G. (2007). Water transport in bread during baking. *Journal of Food Engineering*, 78:1167–73
- Waigh, T. A., Gidley, M. J., Komanshek, B. U., Donald, A. M. (2000). The phase transformations in starch during gelatinisation: A liquid crystalline approach. *Carbohydrate Research*, 328(2), 165–176.
- Wang, J., Rosell, C. M., Benedito de Barber, C. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79(2), 221–226.
- Ward F.M., Andon S.A. (2002). Hydrocolloids as film formers, adhesives and gelling agents for bakery and cereal products. *Cereal Food World*. 47:52–55

Weber, F. H., Clerici, M. T. P. S., Collares-Queiroz, F. P., Chang, Y. K. (2009). Interaction of Guar and Xanthan Gums with Starch in the Gels Obtained from Normal, Waxy and High-amylose Corn Starches. *Starch - Stärke*, 61(1), 28–34.

Wieser, H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119.

Wild, D., Robins, G. G., Burley, V. J., Howdle, P. D. (2010). Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 32(4), 573–81.

Wootton, M., Bamunuarachchi, A. (1979). Application of Differential Scanning Calorimetry to Starch Gelatinization. III. Effect of Sucrose and Sodium Chloride. *Starch - Stärke*, 31(6), 201–204.

Wu, L., Sanguansri, L., Augustin, M. A. (2014). Processing treatments enhance the adsorption characteristics of epigallocatechin-3-gallate onto apple pomace. *Journal of Food Engineering*.

## X

Xie, F., Pollet, E., Halley, P., Avérous, L. (2014). Advanced Nano-biocomposites Based on Starch. In: K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Polysaccharides SE - 50-1* (pp. 1–75). Springer International Publishing.

Xue, Z., Dou, J., Li, J., Zhang, X., Liu, L., Meng Y., Guo. Y. (2013). Comparison of pectins quality of apple flesh pomace with four extractions. In International conference on biological, medical and chemical engineering (BMC 2013), Hong Kong, 115-121.

## Y

Yadav, D. N., Rajan, A., Sharma, G. K., Bawa, A. S. (2010). Effect of fiber incorporation on rheological and chapati making quality of wheat flour. *Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 166–173.

Yang, X., Foegeding, E. A. (2010). Effects of sucrose on egg white protein and whey protein isolate foams: Factors determining properties of wet and dry foams (cakes). *Food Hydrocolloids*, 24(2-3), 227–238.

Yildiz, Ö., Yurt, B., Baştürk, A., Toker, Ö. S., Yilmaz, M. T., Karaman, S., Dağlıoğlu, O. (2013). Pasting properties, texture profile and stress–relaxation behavior of wheat starch/dietary fiber systems. *Food Research International*, 53(1), 278–290.

## Z

Zannini, E., Jones, J. M., Renzetti, S., Arendt, E. K. (2012). Functional replacements for gluten. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 227–45.

Zaro, M. J., Chaves, A. R., Vicente, A. R., Concellón, A. (2014). Distribution, stability and fate of phenolic compounds in white and purple eggplants (*Solanum melongena* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 92, 70–78.

Zhang, X. W., Liu, X., Gu, D. X., Zhou, W., Wang, R. L., Liu, P. (1996). Desorption Isotherms of Some Vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 303-306.

Zobel, H., Kulp, K. (1996). The staling mechanism. In: *Baked Goods Freshness* (edited by R.E. Hebeda & H.F. Zobel). Pp. 1–64. New York: Marcel Dekker.

Zuleta, A., Araya, H. (2009). Hidratos de carbono como ingredientes funcionales. Capítulo VI en *Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación* M. Lutz, A. León (Editores) Universidad de Valparaíso, Chile. 51-70.

# **Glosario**



## **A**

A: agua

AA: almidón arroz

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

AM: almidón mandioca

$a_w$ : actividad de agua

## **B**

b.h.: en base húmeda

b.s.: en base seca

B: breakdown (inestabilidad)

BHL: balance hidrófilo-lipofílico

BM: bagazo de manzana

BMPA: bagazo de manzana procesado (secado y autoclavado)

BMP: bagazo de manzana secado (sin autoclavado)

BMSP: bagazo de manzana sin procesar (ni secado, ni autoclavado)

BMSPA: bagazo de manzana sin procesamiento (no secado, si autoclavado)

## **C**

CA: celda de aire

CH: clara de huevo

CLSM : confocal laser scanning microscopy (Microscopía laser confocal de barrido)

CMC: carboximetilcelulosa

cP: centipoise

CP: cuerpo proteico

## **D**

DATEM: ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico

DCC: diseño compuesto central

DE: desviación estándar

DP: grado de polimerización

DSC: calorimetría diferencial de barrido

## **E**

EC: enfermedad celíaca

## **F**

FD: fibra dietaria

FDAc: fibra detergente ácido

FDI: fibra dietaria insoluble

FDN: fibra detergente neutro

FDS: fibra dietaria soluble

FDT: fibra dietaria total

FM: fécula de mandioca

FOS: fructooligosacáridos

## **G**

g: gramo

G': módulo de almacenamiento/ elástico

G'': módulo de pérdida / viscoso

G\*: módulo complejo

GOS: galactooligosacáridos

## **H**

h: horas

HA: harina de arroz

HLB: hidrofílico-lipofílico

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa

## **I**

IP: índice de pardeamiento

## **J**

JCM: Jugo concentrado de manzana

## **L**

L: litro

## **M**

mg: miligramo

mL: mililitro

MSR: metodología de superficie de respuesta

## **N**

N: newton

NMR: resonancia magnética nuclear

## **P**

PM: peso molecular

PNA: polisacáridos no almidonosos

## **R**

rpm: revoluciones por minuto

## **S**

S: setback (asentamiento 1)

s: segundos

SAC: sacarosa

SSL: estearoil 2-lactilato de sodio

SEM: scanning electron microscope (microscopía electrónica de barrido)

## **T**

TACC: trigo, avena, cebada y centeno

TOS: transgalactooligosacáridos

T<sub>p</sub>: pasting temperature (Temperatura de formación de la pasta/pasting)

## U

U: actividad enzimática

USP: United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos)

## V

Ve: volumen específico

VF: viscosidad final

VP: viscosidad de pico

## W

WBC: water binding capacity (capacidad de unión de agua)

WHC: water holding capacity (capacidad de retención de agua)

WIC: water imbibing capacity (capacidad de imbibición de agua)

## Alfabeto griego

$\delta$ : ángulo de desfase

$\tau$ : esfuerzo

$\rho$ : densidad

$\omega$ : frecuencia