



*Universidad Nacional de Córdoba*

*Facultad de Ciencias Agropecuarias*

*Escuela para Graduados*



**CONSERVACION DE LA CALIDAD DE NUECES  
PRODUCIDAS EN ARGENTINA MEDIANTE LA  
UTILIZACIÓN DE CUBIERTAS COMESTIBLES  
CON LA INCLUSION DE ANTIOXIDANTES  
NATURALES**

**Ing. Agr. Antonella Luciana Grosso**

Tesis

Para optar al Grado Académico de

Doctora en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2018*

# CONSERVACION DE LA CALIDAD DE NUECES PRODUCIDAS EN ARGENTINA POR LA UTILIZACIÓN DE CUBIERTAS COMESTIBLES CON LA INCLUSION DE ANTIOXIDANTES NATURALES

**Ing. Agr. Antonella Luciana Grosso**

## **Comisión Asesora de Tesis**

Directora: Dra. Valeria Nepote

Co-directora: Dra. Claudia Mariana Asensio

Asesora: Dra. María Fernanda Gayol

## **Tribunal Examinador de Tesis**

.....  
.....  
.....

## **Presentación formal académica**

.....

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecerles a las personas que se comprometieron con mi formación: la Dra. Valeria Nepote, Dra. Claudia M. Asensio y la Dra. Fernanda Gayol. Ellas, me ayudaron con su apoyo, me guiaron a lo largo de este proceso, me donaron sus consejos, conocimientos y me ofrecieron su amistad. Estuvieron presentes en todos los momentos en los cuales las necesité, sin importar el día y la hora, y a eso lo aprecio un montón. Vale y Clau, su ayuda fue imprescindible para poder terminar esta tesis en tiempo y forma y cerrar esta etapa en mi vida. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Enrique Lucini, por haber creído en mí y haberme incorporado al otro grupo de trabajo al que pertenezco. Gracias a él pude conocer a otras personas con las que comparto experiencias, ocupaciones, y principalmente, aprendizajes. Enrique, muchas gracias por haberme introducido al mundo de la docencia y le agradezco a todos los profes y ayudantes de la cátedra de Microbiología Agrícola.

También quisiera agradecerles a mis compañeras de trabajo: Clau, Pau, Ceci P. Ceci R., Pato, Mari, Judith, Anto B., Orne y Boris. Me tuvieron paciencia en aquellos momentos en los cuales sufrí estrés, me dieron consejos cuando lo necesité y me prestaron sus oídos cuando las cosas no salieron como pensaba. Gracias por tenerme paciencia y darme contención en aquellos momentos en los cuales la necesité.

También quiero hacer una mención especial a Paula, Pato y Mari. A pesar de que no forman parte de mi CAT, estuvieron presentes a lo largo de mi formación como doctora y a eso lo valoro un montón. Ya sea, enseñándome técnicas, prestándome material, compartiendo sus experiencias y ayudándome con algún ensayo, forman parte de alguna manera de esta tesis. ¡Gracias!

Además, quisiera agradecerles a todos esos amigos que me apoyaron durante estos años, estuvieron conmigo a lo largo de esta transición y me ofrecieron su ayuda. Se que a veces sacrifique tiempo que podríamos haber compartido juntos, sin embargo, seguimos conectados y la amistad continúa creciendo.

No existen suficientes palabras para agradecerle a mi papa, Rubén y a mi mama, Marcela. Gracias por su apoyo, comprensión y paciencia. Gracias a ustedes pude aprender desde chica que los objetivos se cumplen cuando uno se esfuerza y hace sacrificios. Me inculcaron los valores necesarios y me motivaron para que desarrolle mi potencial y ahora se comienzan a ver sus frutos. Además, estuvieron siempre presentes para darme una mano y contenerme cuando las cosas se pusieron difíciles. ¡Gracias! ¡Gracias! ¡Gracias!

Finalmente, quisiera agradecerle a mi pareja, Mati. Éramos muy jóvenes cuando nos conocimos, pero fuimos madurando y creciendo juntos. Cuando nos recibimos, nos dimos cuenta de que para nosotros era importante ejercer de nuestra profesión, aunque eso implicara sacrificar tiempo juntos. Por eso quería agradecerte, por entenderme y apoyarme en este viaje. Se que a veces estamos en lugares distintos, pero volamos hacia la misma dirección. ¡Gracias!

## RESUMEN

La nuez es un alimento altamente susceptible al deterioro oxidativo que, además, se produce en un sector con escasas estrategias de preservación, motivo por el cual, es de suma importancia encontrar nuevas alternativas para mejorar su preservación. El objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad química y sensorial de nueces producidas en Argentina con aplicación de cubiertas comestibles y la adición de antioxidantes naturales que no alteren sus propiedades sensoriales y que permitan una mejor conservación de sus parámetros de calidad química, nutricional y sensorial. Se conformaron tres tipos de cubiertas: carboximetil-celulosa (CMC), metil-celulosa (MC) y proteína del suero de leche (PS) y se aplicaron en nueces (var. Chandler). Las nueces recubiertas (NCCM, NMC y NPS) y sin cobertura (NC) fueron almacenadas durante 210 días a temperatura ambiente ( $23\pm 2$  °C). NC presentó los valores más altos para indicadores químicos de oxidación como el índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados y para volátiles de oxidación (pentanal, nonanal, hexanal y decano,5,6-34 bis(2,2-dimetilpropilideno)). Por el contrario, NMC presentó valores menores de peróxidos y dienos y trienos conjugados, volátiles de oxidación, y la menor desaparición de carotenoides. Las cubiertas comestibles exhibieron efecto protector contra el deterioro de las nueces. MC fue la cubierta que ofreció la mayor protección. Paralelamente, se realizó la extracción de dos fracciones de polifenoles de la nuez: soluble en acetato de etilo (PAE) y soluble en agua (PH) y se realizaron pruebas para medir su actividad antioxidante. Se conformaron 4 tratamientos: aceite de nuez (W) control (WC), W con BHT (WBHT), W con PAE (WPAE), W con PH (WPH). Sobre estas muestras se realizó una prueba de oxidación acelerada (60 °C; 16 días). El extracto PAE exhibió un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales y actividad quelante de  $Fe^{2+}$ , mientras que, PH una mayor actividad según las pruebas DPPH y ABTS. Los indicadores químicos analizados (peróxidos, dienos y trienos conjugados) se incrementaron a lo largo del almacenaje para todos los tratamientos, principalmente para WC. Los volátiles nonanal, hexanal, butanal and 2-heptenal, (E)- también se incrementaron en mayor medida en WC y en menor proporción en WPAE y WPH. Los carotenoides disminuyeron en las muestras a lo largo del almacenamiento. WPAE presentó el valor más alto de carotenoides a lo largo del almacenamiento. Los antioxidantes ayudaron a preservar la calidad química del aceite de nuez en el tiempo. PAE y PH demostraron actividad antioxidante superior a BHT para algunos indicadores. Finalmente, se elaboraron cubiertas comestibles a partir de harina de nuez (PN). Se conformaron los siguientes tratamientos: nuez (N) sin cobertura (NC), N con MC, N con cobertura elaborada con harina de nuez (NPN), N con PN con la adición de PAE (NPNP) y N con PN con la adición de BHT (NPNB). Los tratamientos se almacenaron a 40 °C por 98 días. La cubierta PN conservó mejor el sabor nuez y retardo el desarrollo del sabor oxidado en comparación con MC, sin embargo, no protegió a la nuez del desarrollo de peróxidos. Las cubiertas PN con la adición de PAE (PNP) y BHT (PNB) demostraron la mejor protección, considerando la totalidad de los indicadores de deterioro lipídico (sensoriales y químicos). PNB presentó mejor comportamiento para algunos de los indicadores de deterioro (sabor oxidado,  $\delta$ -tocoferol, entre otros), sin embargo, PNP exhibió valores de aceptabilidad superiores al resto. PNP puede ser utilizada como una alternativa para proteger a las nueces del deterioro sin la utilización de aditivos sintéticos.

**Palabras claves:** Nuez, cubiertas comestibles, antioxidantes, polifenoles, harina de nuez.

## ABSTRACT

Walnuts are nuts highly susceptible to lipid oxidation, which are also produced in a sector that use scarce preservation strategies, for this reason, it's very important to find new alternatives to improve their preservation. The objective of the present work was to study the chemical and sensory stability of walnuts produced in Argentina with the addition of edible coatings and natural antioxidants, that don't alter the sensory properties of walnuts and achieve a better preservation of the chemical, nutritional and sensory parameters. Three types of coating were prepared: carboximetil-celulosa (CMC), metil-celulosa (MC) and whey protein (PS) which were applied on walnuts (var. Chandler). Walnuts with coatings (NCMC, NMC and NPS) and without coatings (NC) were stored for 210 days at  $23\pm 2$  °C. NC displayed the highest values of the chemical oxidation indicators (peroxide value, conjugated dienes and trienes) and oxidation volatile indicators (pentanal, nonanal, hexanal and decane, 5,6-34 bis(2,2-dimethylpropylidene)). Conversely, NMC displayed the lowest values of peroxides, conjugated diene and triene and oxidation volatile compounds and also, the lowest decrease of carotenoid content. MC, CMC and PS protected walnuts against lipid deterioration. MC was the coating that offered the best protection against deterioration. Afterwards, polyphenols were extracted from walnuts preparing two extracts: ethyl acetate-soluble extract (PAE) and water-soluble extract (PH). Antioxidant tests were performed to measure the antioxidant activity of the extracts. Four treatments were prepared: walnut oil (W) control (WC), W with BHT (WBHT), W with PAE (WPAE) and W with PH (WPH). An oven test was performed on W treatments (60 °C; 16 days). PAE exhibited greater phenolic and flavonoid contents and highest  $Fe^{2+}$  chelating activity, while, PH exhibited highest antioxidant activity according to DPPH and ABTS assays. Chemical oxidation indicators (peroxide value and conjugated diene and triene) increased along with storage time, mainly for WC. Nonanal, hexanal, butanal and 2-heptenal, (E)- aldehydes also increased in a bigger amount for WC, and in a lower amount for WPAE and WPH. CC decreased in all samples along the storage, nevertheless, WPAE exhibited the highest carotenoid amount through the entire storage period. Antioxidants helped to preserve the chemical quality of walnut oil with the time. PAE and PH displayed an identical, and in some cases, greater antioxidant activity than BHT. Finally, edible coatings were prepared from walnut flour (PN). The following treatments were prepared: Walnut (N) control (NC), N with MC (NMC), N with a coating prepared from walnut flour (NPN), N with PN with de addition of PAE (NPNP) and N with PN with the addition of BHT (NPNB). The samples were stored for 98 days at 40 °C. PN displayed a better preservation of the walnut flavor and decreased the development of oxidized flavor in comparison with MC, nevertheless, PN didn't protect walnuts against some of the chemical oxidation indicators, like peroxide value. PN with BHT (PNB) and PN with PAE (PNP) showed a better protection, considering all the indicators measured (sensory and chemical). PNB presented a better behavior for some of the chemical and sensory indicators of lipid oxidation (oxidized flavor,  $\delta$ -tocopherol, etc.), while, PNP exhibited higher acceptability in comparison with the remaining treatments. PNP could be used as an alternative option to protect walnuts from deterioration without using synthetic additives.

**Key words:** Walnuts, edible coatings, antioxidants, polyphenols, walnut flour.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO I</b> .....	19
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	19
La nuez .....	19
Ácidos grasos y oxidación lipídica en la nuez .....	22
Métodos para medir los cambios oxidativos en alimentos oleaginosos.....	24
Métodos que miden la aparición de productos de oxidación .....	25
Índice de peróxidos (IP).....	25
Dienos y trienos conjugados (DC y TC).....	26
Índice de anisidina .....	26
Volátiles medidos por cromatografía gaseosa .....	27
Métodos que miden pérdidas de sustancias iniciales .....	28
Cambios en la composición de ácidos grasos .....	28
Tocoferoles .....	28
Carotenoides .....	29
Otros métodos.....	29
Análisis sensorial .....	29
Medición del color .....	31
Alternativas para disminuir o retardar las reacciones oxidativas en productos oleaginosos.....	32
Cubiertas o <i>films</i> comestibles .....	33
Antioxidantes.....	35
Técnicas para medir actividad antioxidante .....	38
DPPH .....	39
ABTS .....	40
Contenido de fenoles totales .....	40
Contenido de flavonoides totales.....	41
Actividad quelante del ion Fe <sup>2+</sup> .....	42
<b>HIPÓTESIS</b> .....	43
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	43
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	43

BIBLIOGRAFÍA.....	45
<b>CAPITULO II</b> .....	51
CONSERVACION DE LA CALIDAD QUIMICA Y SENSORIAL DE LAS NUECES RECUBIERTAS CON COBERTURAS COMESTIBLES .....	51
INTRODUCCIÓN .....	51
MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
MATERIALES .....	55
MÉTODOS .....	55
Composición química.....	55
Preparación de las cubiertas comestibles .....	57
-Cobertura de carboximetil-celulosa (CMC).....	57
-Cobertura de metil-celulosa (MC).....	57
-Cobertura a base de aislado de proteína del suero de la leche (PS) .....	57
Estudio de almacenamiento .....	58
Indicadores de oxidación lipídica.....	58
Análisis químicos .....	58
Análisis físico .....	59
Análisis de compuestos volátiles.....	60
Análisis sensorial.....	61
Análisis descriptivo.....	61
Prueba afectiva de aceptabilidad.....	64
Diseño experimental .....	65
Análisis estadístico .....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
Composición química.....	67
Estudio de Almacenaje .....	69
Análisis químicos .....	69
Análisis físico: color.....	73
Análisis de compuestos volátiles.....	75
Análisis sensorial.....	80
Análisis descriptivo.....	80
Prueba afectiva de aceptabilidad.....	89

Análisis de componentes principales (ACP) .....	91
Análisis de conglomerados .....	93
CONCLUSIONES .....	95
BIBLIOGRAFÍA.....	96
<b>CAPITULO III</b> .....	102
EXTRACCIÓN, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES DE LA HARINA DE NUEZ .....	102
INTRODUCCIÓN .....	102
MATERIALES Y MÉTODOS .....	105
MATERIALES .....	105
MÉTODOS .....	105
Extracción de la fracción fenólica .....	105
Determinación de fenoles y flavonoides totales .....	106
Ensayo o <i>test</i> de DPPH.....	107
<i>Test</i> o ensayo de ABTS .....	107
Actividad quelante del ion ferroso (Fe <sup>2+</sup> ).....	108
<i>Test</i> de oxidación acelerada del aceite de nuez .....	108
Análisis químicos del aceite de nuez.....	109
Compuestos volátiles.....	109
Análisis estadístico .....	110
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
Determinación de fenoles y flavonoides totales .....	111
Ensayo o <i>test</i> de DPPH.....	112
<i>Test</i> o ensayo de ABTS .....	112
Actividad quelante del ion ferroso (Fe <sup>2+</sup> ).....	113
<i>Test</i> de oxidación acelerada del aceite de nuez .....	114
Análisis químicos: IP, DC, TC y CC .....	114
Análisis de los compuestos volátiles por GC-MS .....	119
Análisis de componentes principales.....	127
CONCLUSIONES .....	130
BIBLIOGRAFÍA.....	131
<b>CAPITULO IV</b> .....	135

ELABORACION DE UNA CUBIERTA COMESTIBLE A PARTIR DE HARINA DE NUEZ CON LA INCLUSIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES Y EVALUACION DE SU EFECTO PROTECTOR EN NUECES .....	135
INTRODUCCIÓN .....	135
MATERIALES Y MÉTODOS .....	140
MATERIALES .....	140
MÉTODOS .....	140
Obtención de harina de nuez deslipidizada (HND).....	140
Composición química general de la HN.....	140
Elaboración de coberturas comestibles en base a HN con la incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos .....	142
Preparación de las muestras.....	143
Estudio de almacenamiento .....	143
Análisis químicos .....	144
Análisis sensorial descriptivo .....	145
Análisis de aceptabilidad.....	147
Análisis estadístico .....	147
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	148
Composición química general de la HN.....	148
Evaluación sensorial de las nueces con cubiertas comestibles.....	149
Prueba descriptiva .....	149
<i>Test</i> de aceptabilidad .....	150
Análisis químicos .....	154
Cambios sensoriales de las nueces durante el almacenamiento .....	167
Análisis de regresión .....	172
Análisis de componentes principales.....	175
CONCLUSIONES .....	179
BIBLIOGRAFÍA.....	181
<b>CAPITULO V</b> .....	186
CONCLUSIONES GENERALES.....	186

## Lista de tablas

- Tabla 2.1.** Atributos, definiciones, intensidades de referencia y “warm up” usados en el análisis descriptivo de muestras de nuez. .... 63
- Tabla 2.2.** Composición química proximal de los granos de nueces correspondiente a este estudio. .... 67
- Tabla 2.3.** Composición de los ácidos grasos (% relativo) presentes en las muestras de nueces. .... 68
- Tabla 2.4.** Compuestos volátiles (cuentas electrónicas 106) de las muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS), y nueces sin cobertura (NC), analizadas sobre producto fresco (día 0 de almacenamiento). .... 76
- Tabla 2.5.** Medias y desvíos estándar de la intensidad de los atributos sensoriales, evaluados por un panel de jueces entrenados en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0.05$ ). .... 83
- Tabla 2.5.** Medias y desvíos estándar de la intensidad de los atributos sensoriales, evaluados por un panel de jueces entrenados en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0.05$ ). Continuación. .... 84
- Tabla 2.6.** Coeficientes de regresión y  $R^2$  ajustados de los atributos evaluados por jueces entrenados en el análisis sensorial descriptivo para nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) durante el almacenamiento de 210 días. 88
- Tabla 3.1.** Medias y desvíos estándar de fenoles totales, flavonoides totales, ABTS, actividad quelante del ion ferroso y el IC50 del DPPH para los extractos de la nuez (PH y PAE). .... 113
- Tabla 3.2.** Compuestos volátiles expresados en cuentas electrónicas (c.e.,  $10^3$ ) por gramo de aceite de nuez para los tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua) analizados en el primer (día 0) y en el último período (día 16) de almacenamiento a 60 °C. .... 120
- Tabla 3.2.** Compuestos volátiles expresados en cuentas electrónicas (c.e.,  $10^3$ ) por gramo de aceite de nuez para los tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en

agua) analizados en el primer (día 0) y en el último período (día 16) de almacenamiento a 60 °C. Continuación.....	121
<b>Tabla 4.1.</b> Atributos, intensidades de las referencias y <i>warm up</i> usados en el análisis descriptivo de las muestras de nuez.....	146
<b>Tabla 4.2.</b> Composición química general de la muestra de nuez y de la harina de nuez (HN).....	148
<b>Tabla 4.3.</b> Medias y desvíos estándar de las intensidades de atributos evaluados por análisis sensorial descriptivo de las muestras frescas (día 0) de nueces para los tratamientos NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT). ....	151
<b>Tabla 4.4.</b> Coeficientes de regresión y valores de R <sup>2</sup> ajustados de las intensidades de los atributos para los tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT) durante el almacenamiento (98 días; 40 °C).....	174

## Lista de Figuras

- Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3; α = 0,05). .....71
- Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3; α = 0,05). Continuación.....72
- Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3; α = 0,05). Continuación.....73
- Fig. 2.2.** Contenido en cuentas electrónicas (c.e.) de (A) hexanal, (B) nonanal, (C) pentanal, (D) 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) analizados durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (n = 3; α = 0,05). .....78
- Fig. 2.2.** Contenido en cuentas electrónicas (c.e.) de (A) hexanal, (B) nonanal, (C) pentanal, (D) 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) analizados durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (n = 3; α = 0,05). Continuación.....79
- Fig. 2.3.** Medias obtenidas en la aceptabilidad de los consumidores (escala hedónica de 9 puntos) con respecto a (A) sabor y (B) intensidad del color, evaluadas en nueces frescas no recubiertas (NC) y con la adición de cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS).....90
- Fig. 2.4.** Biplot de las componentes 1 y 2 provenientes del análisis de componentes principales. Variables: intensidad de color, rugosidad, brillo, oxidado, cartón, sabor nuez, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza, IP, DC, TC, CC, a\*, b\*, L\*, pentanal, nonanal, hexanal y decano,5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno). Tratamientos: nueces no recubiertas (NC) y nueces con la adición de cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS) almacenadas por 210 días a temperatura ambiente. ....93

- Fig. 2.5.** Dendograma obtenido del análisis de clúster de las nueces no recubiertas (NC) y con la adición de cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS), almacenadas durante 210 días a temperatura ambiente..... 94
- Fig. 3.1.** Valores medios y desvíos estándares de (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados y (D) contenido de carotenoides medidos durante el almacenamiento (16 días; 60 °C) para los tratamientos WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación..... 117
- Fig. 3.1.** Valores medios y desvíos estándares de (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados y (D) contenido de carotenoides medidos durante el almacenamiento (16 días; 60 °C) para los tratamientos WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación..... 118
- Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (a) hexanal, (b) nonanal, (c) butanal y (d) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). ..... 125
- Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (a) hexanal, (b) nonanal, (c) butanal y (d) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación..... 126
- Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (a) hexanal, (b) nonanal, (c) butanal y (d) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación..... 127
- Fig. 3.3.** Componentes principales para las variables químicas: hexanal, nonanal, BHT, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno, D-limoneno, butanedial, 2-(E)-heptenal, 2-propilfurano, butil-hidroxitolueno, dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC), índice de peróxido (IP) y contenido de carotenoides. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua)..... 129
- Fig. 4.1.** Valores medios y desvíos estándares obtenidos en la evaluación de aceptabilidad (escala hedónica 9 puntos) para las variables (A) color, (B) sabor y (C) aceptabilidad general para las nueces frescas (tiempo 0 días de almacenamiento) NMC (nuez recubierta con metil-celulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico), PN, NP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo)

y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT y sin recubrimiento (NC)).	152
<b>Fig. 4.1.</b> Valores medios y desvíos estándares obtenidos en la evaluación de aceptabilidad (escala hedónica 9 puntos) para las variables (A) color, (B) sabor y (C) aceptabilidad general para las nueces frescas (tiempo 0 días de almacenamiento) NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT y sin recubrimiento (NC). Continuación.	153
<b>Fig. 4.2.</b> Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT).	158
<b>Fig. 4.2.</b> Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación. ..	159
<b>Fig. 4.2.</b> Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación. ..	160
<b>Fig. 4.3.</b> Porcentajes relativos de ácidos grasos como indicadores químicos de oxidación de lípidos analizados en nueces con y sin coberturas durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (a) Relación de porcentajes de ácidos grasos (AG) saturados/insaturados, (b) AG Relación de porcentajes de ácidos grasos Oleico/Linoleico, (c) AG poliinsaturados (%) y (d) AG monoinsaturados (%). Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto de polifenoles de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT).	163
<b>Fig. 4.3.</b> Porcentajes relativos de ácidos grasos como indicadores químicos de oxidación de lípidos analizados en nueces con y sin coberturas durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (a) Relación de porcentajes de ácidos grasos (AG) saturados/insaturados, (b) AG Relación de porcentajes de ácidos grasos Oleico/Linoleico, (c) AG poliinsaturados (%) y (d) AG	

monoinsaturados (%). Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto de polifenoles de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación. .... 164

**Fig. 4.4.** Contenido de tocoferoles en nueces recubiertas y sin recubrimiento almacenadas 98 días a 40 °C. (a)  $\delta$ -tocoferol y (b)  $\gamma$ -tocoferol. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT). .... 166

**Fig. 4.5.** Valores de intensidad de los atributos sensoriales (a) color, (b) sabor oxidado, (c) sabor cartón y (d) sabor nuez evaluados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C) en nueces recubiertas y sin recubrimiento. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). .... 171

**Fig. 4.5.** Valores de intensidad de los atributos sensoriales (a) color, (b) sabor oxidado, (c) sabor cartón y (d) sabor nuez evaluados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C) en nueces recubiertas y sin recubrimiento. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación. .... 172

**Fig. 4.6.** Biplot del análisis de componentes principales que muestra la componente principal 1 (CP 1) y la componente principal 2 (CP 2). Variables: intensidad de color, brillo, oxidado, cartón, sabor nuez, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza, IP, DC, TC, CC, IA, MUFAs, PUFAs, O/L, S/I,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-celulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT). .... 178

## Lista de abreviaturas

°C = grados centígrados  
µg = microgramos  
µL = Microlitros  
16:0 = Ácido palmítico  
16:1 = ácido palmitoleico  
18:0 = Ácido esteárico  
18:1 = Ácido oleico  
18:2 = Ácido linoleico  
18:3 = ácido linolénico  
20:1 = ácido gadoleico  
ABTS = Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico  
ACP = Análisis de componentes principales  
AG = porcentaje de ácidos grasos  
ANOVA = Analisis de la varianza  
BHA = butil-hidroxianisol  
BHT= Butil-hidroxitolueno  
c.e. = Cuentas electrónicas  
CAA = Codigo alimentario argentino.  
CC = Contenido de carotenoides  
CG-MS = cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas  
cm = centímetros  
CMC = Carboximetil-celulosa  
Codex Alimentarius = CODEX STAN  
CP = componentes principales  
DC = Dienos conjugados  
Divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano = DVB/CAR/PDMS  
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo  
EDTA = ácido etilendiaminotetraacético  
eV = impacto electrónico  
FC = Fibra cruda  
F-C = Folin-Ciocalteu  
FDN = Fibra detergente neutro  
G = Fuerza centrífuga relativa  
g = Gramos  
GAE = ácido gálico  
h = Hora  
HN = Harina de nuez  
HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución  
HS-SPME = Micro extracción en fase solida  
IA = Índice de anisidina  
IC50 = concentración máxima de la media inhibitoria  
INTA = Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
IP = Índice de peróxidos  
Kg = Kilogramo  
L = litro

LOX = Lipoxigenasa  
m = metros  
m/z = masa/carga  
MC = Metil-celulosa  
Meq = miliequivalentes  
min = Minuto  
mL = Mililitro  
MUFA = ácido graso monoinsaturado  
N = Normalidad  
NC = Tratamiento de nueces control  
NCMC = Tratamiento de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa  
nm = Nanómetros  
NMC = Tratamiento de nueces recubiertas con metil-celulosa  
NPN = Tratamiento de nueces recubiertas con cobertura elaborada a partir de harina de nuez  
NPNB = Tratamiento de nueces recubiertas con cobertura elaborada a partir de harina de nuez con la incorporación de butil-hidroxitolueno.  
NPNP = Tratamiento de nueces recubiertas con cobertura elaborada a partir de harina de nuez con la incorporación de extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo  
NPS = Tratamiento de nueces recubiertas proteína del suero de la leche de la vaca  
O/L = relación ácidos grasos oleico/linoleico  
PAE = Extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo  
PH = El extracto acuoso seco de polifenoles  
PN = cobertura comestible elaborada a partir de la harina de nuez  
PNB = cobertura comestible elaborada a partir de la harina de nuez con la adición de BHT  
PNP = cobertura comestible elaborada a partir de la harina de nuez con la adición de PAE  
PS = Proteína del suero de la leche de la vaca  
PUFA = Ácido graso poliinsaturado  
QE = quercetina  
RSA = actividad secuestrante de radicales  
S/I = relación ácidos grasos saturados/insaturados  
TBHQ = terbutil hidroquinona  
TC = Trienos conjugados  
UPGMA = Unweighted Pair-Group Method  
USDA = United States Department of Agriculture  
UV = Ultravioleta  
v/v = Porcentaje volumen/volumen  
W = Tratamiento de aceite de nuez control  
WBHT = Tratamiento de aceite de nuez con butil-hidroxitolueno  
WPAE = Tratamiento de aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo  
WPH = Tratamiento de aceite de nuez con el extracto acuoso seco de polifenoles  
 $\beta_0$  = Ordenada al origen  
 $\beta_1$  = Pendiente

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### La nuez

Los nogales pertenecen taxonómicamente al Orden Yuglandales, familia Yuglandáceas, dentro de la cual, se encuentran los siguientes géneros afines: *Juglans* (nogales), *Carya* (Pecaneros) y *Pterocarya* (Terocarías). Dentro del género *Juglans*, existen al menos 21 especies procedentes de América, Asia y Europa, que se pueden englobar en 3 grupos: Nogales comunes o blancos; representados por *Juglans regia* L., Nogales negros y Nogales grises. Todas las especies de *Juglans* tienen frutos comestibles, sin embargo, *Juglans regia* es la especie más difundida, conocida por sus frutos y por la mayor extensión de cultivo. Diversas fuentes de información apuntan que el origen del nogal se encuentra en Asia Central, en las circunscripciones próximas del actual Irán, a partir del cual, se produce su difusión hacia Europa. La semilla o grano del nogal, que es lo que usualmente se utiliza para consumo, está formada por cuatro lóbulos simétricos separados por tabiques, y recubiertos por una fina película (tegumento) que presenta una coloración más oscura que el embrión. El grano se une a la cáscara en su parte basal, la cual, representa un 40-60% del peso de la nuez seca (Muncharaz Pou, 2012).

En la actualidad, los frutos secos en general y, particularmente la nuez, están adquiriendo una importancia creciente a nivel nacional e internacional debido a los siguientes factores: aumento sostenido del consumo basado en sus propiedades de alimento sano; precios altos en el mercado; bajos requerimiento de mano de obra y posibilidades de mecanización del cultivo; posibilidad de implementar tecnologías para la producción, conservación prolongada y mejoras en la calidad con bajos costos; posibilidad de obtener subproductos industrializados como aceites y harinas (Iannamico, 2015).

En la actualidad, la producción mundial de nueces se encuentra liderada por China con casi 2.000.000 toneladas de nueces (más del 50% mundial), seguido por Irán, Estados

Unidos, Turquía y Ucrania. En el hemisferio sur de América se destaca Chile como principal productor con casi 30.000 hectáreas de cultivo. Con respecto al comercio de la nuez, se encuentra dominado por Estados Unidos en un 50%, con participaciones importantes y equitativas de Francia, China, Ucrania, India y Chile. La producción argentina ha crecido mucho en los últimos diez años, con casi 16.834 hectáreas cultivadas y 16.840 toneladas de producción, posicionando a la nuez como el fruto seco de mayor importancia en lo productivo y en nivel de consumo interno. En la última década, nuestro país ha pasado de ser un neto importador, a figurar en séptima posición de importancia entre los países exportadores, con un volumen de 3.023 toneladas en el año 2015 (Iannamico, 2015; Cólica, 2015). Los principales importadores de la nuez argentina son: Italia, Birmania, Chile, Brasil y Uruguay (Diario Uno, 2016).

El incremento en la producción del cultivo fue en parte influenciado por el aumento que se produjo en los precios de este. En el año 2017 el incremento alcanzó un 14% a nivel internacional, lo cual sirvió para fomentar la producción en el próximo ciclo. En cuanto a su comercialización, la nuez se puede vender con cáscara (en bolsas de 25 o de 10 kilos) o sin ella (en cajas de 10 kilos). La nuez con cáscara de primera calidad cotiza a unos U\$S 4,10/4,20 el kilo y sin cáscara U\$S 13,40 el kilo. En cuanto a los precios pagados al productor, los compradores encontraron un equilibrio entre los 45 y 48 pesos el kilo (Argumedo, 2014; Los Andes, 2017).

En Argentina, el 81% de la producción de nueces se concentra en Catamarca, Mendoza y La Rioja. Catamarca ocupa el primer lugar con más de 6.000 toneladas al año mientras Mendoza produce alrededor de 4.500 toneladas. Adicionalmente, se ha producido un incremento de nuevas plantaciones en otras regiones localizadas en Río Negro, San Juan, Salta, Córdoba y San Luis (Cólica, 2015). Uno de los factores responsables del incremento en la producción fue la reconversión de montes con nuevas plantaciones e intensificación mediante intercalado e injerto de plantas existentes con una masiva adopción de la variedad californiana Chandler y de aquellas obtenidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Catamarca. Las últimas, han tenido un rol esencial en ampliar las fronteras del cultivo ya que presentan menores requerimientos de horas de frío y un buen comportamiento en lugares con inviernos irregulares. Lo anteriormente mencionado, ha resultado en la disminución de la superficie con la variedad

“tipo criolla” en más de un 80%. Este cambio tecnológico, ha posibilitado que la producción y calidad del producto aumente de manera significativa (Cólica, 2015; Diario Uno, 2016).

En los últimos años, Argentina ha demostrado que puede producir una nuez altamente competitiva para exportación, debido a su elevada diferenciación tanto por calidad como por identidad varietal y geográfica (Cólica, 2015). Siguiendo el actual ritmo de crecimiento del cultivo es muy probable que Argentina, en un futuro, se convierta en el principal productor de América del Sur desplazando a Chile. Para lograr ese objetivo primero se deben resolver algunas problemáticas del sector. Uno de los problemas es la fragilidad organizativa del sector nogalero que afecta la mejora productiva, sobre todo la comercialización. La nuez se sigue comercializando en forma atomizada, en mercados informales y con escaso trabajo en empaque y fraccionamiento. La infraestructura tanto en finca como en almacenamiento es deficitaria en la mayoría de las pequeñas plantaciones. Únicamente los emprendimientos de mediana y gran escala, que disponen de capital para la inversión, cuentan con maquinaria y estructura apropiada para producir y almacenar nueces (Cólica, 2015).

La nuez es un alimento muy buscado por sus características nutricionales, sensoriales y por poseer propiedades benéficas para la salud. La nuez es muy nutritiva, principalmente por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, vitaminas y minerales (Slatnar *et al.*, 2015). Está compuesta por un 52-72% de lípidos, dependiendo esta variabilidad del efecto de diversos factores como cultivar, ubicación geográfica de la producción, tasa de irrigación o precipitación del cultivo, etc. (Zwarts *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2006; Slatnar *et al.*, 2015). Según los valores declarados por USDA (2018), está compuesta por un porcentaje de ácidos grasos saturados de 9,1%, de los cuales un 7,0% es ácido palmítico (16:0) y un 2,0% de ácido esteárico (18:0). Los ácidos grasos monoinsaturados están presentes en un 22,8%, y están compuestos por: 0,10% de ácido palmitoleico (16:1), 22,20% de ácido oleico (18:1) y un 0,40% de ácido gadoleico (20:1). El resto de los ácidos grasos son poliinsaturados esenciales (63,3%), con 52,90% de ácido linoleico (18:2) y 10,40% de ácido linolénico (18:3). Además del alto contenido lipídico, las nueces contienen cantidades significativas de proteínas (15-19%), carbohidratos totales (8-13%) (Ozkan y Koyuncu, 2005) y otros compuestos bioactivos como fitoesteroles, fibra

dietaria, polifenoles, tocoferoles, carotenos, vitaminas y minerales (Regueiro *et al.*, 2014). Además, como todo material vegetal no presentan colesterol.

## **Ácidos grasos y oxidación lipídica en la nuez**

Los lípidos de la nuez están compuestos principalmente por triglicéridos (Murray *et al.*, 2010). Como se ha mencionado previamente en el capítulo, en la nuez predominan los ácidos grasos poliinsaturados en un (63,3%), seguido por los monoinsaturados (22,8%) y en menor proporción los saturados (9,1%).

Los dobles enlaces contenidos en los ácidos grasos insaturados (mono o poliinsaturados) son los más susceptibles a los procesos de oxidación lipídica, que ocasionan la aparición de sabores indeseables y productos dañinos para la salud humana. Los ácidos grasos al oxidarse forman distintos compuestos; en un principio aparecen los productos de la oxidación primaria que posteriormente al ser degradados forman los compuestos de oxidación secundaria (Kuo y Gardner, 2002).

La oxidación primaria de un aceite se puede producir por la ocurrencia de dos procesos: la autooxidación y la oxidación enzimática producida por la lipoxigenasa (LOX) (Belitz *et al.*, 2009). En ambos casos el producto final son los hidroperóxidos (producto de oxidación primaria).

La autooxidación es un proceso complejo que involucra un gran número de reacciones intermedias correlacionadas. El grado de autooxidación de un aceite es afectado por diversos factores como: composición de ácidos grasos, grado de insaturación de estos, presencia de pro y antioxidantes, presión de oxígeno, y condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, humedad, etc.) (Belitz *et al.*, 2009). Una vez finalizado el periodo de inducción de la autooxidación, se produce una curva pronunciada de aumento de la síntesis de hidroperóxidos. En este mecanismo, es el oxígeno presente en el ambiente el que desencadena y propaga estas reacciones auto-catalíticas (Kong y Singh, 2016).

La otra forma de oxidación primaria es aquella que ocurre debido a la enzima LOX que cataliza la adición de oxígeno molecular a los ácidos grasos poliinsaturados que

contienen estructura cis-cis-1,4-pentadieno para producir hidroperóxidos. Aunque la mayoría de las LOXs necesitan de la presencia de ácidos grasos libres con un grupo metileno activado entre los 2 dobles enlaces, como presentan los ácidos linoleico y linolénico (Kuo y Gardner, 2002).

Los hidroperóxidos, una vez formados, son muy inestables y se descomponen para generar productos volátiles, no volátiles y polímeros de oxidación secundaria. Debido a que los hidroperóxidos no tienen sabor ni olor, la calidad de un alimento no se altera hasta que se forman los compuestos volátiles, los cuales, en pequeñas cantidades, pueden alterar fuertemente el olor y sabor de un alimento, afectando la percepción del consumidor. El tipo de producto generado por la ruptura de los hidroperóxidos depende de la estructura química de éste y del tipo de ruptura oxidativa de los dobles enlaces (Kong y Singh, 2016). Estas moléculas que se forman son denominadas productos de oxidación secundaria. Estos compuestos aparecen a lo largo del proceso de oxidación de un aceite y normalmente son aldehídos, cetonas, lactonas, alcoholes ácidos, furanos, hidrocarburos, etc. (Bett y Boylston, 1992). Los principales volátiles formados durante la oxidación de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico, se encuentran principalmente dentro del grupo aldehídos y cetonas. Según Frankel (2005), los principales compuestos volátiles derivados de la descomposición del ácido oleico son: 2-undecenal, 2-decenal, octanal, nonanal, y decanal; del linolénico: propanal, 3-hexenal, 2,4-heptadienal, y 2,4,7-decatrienal, 2-pentenyl furano, 2-pentenal, 4-heptenal; y finalmente del linoleico: hexanal, 2,4-decadienal, methyl 9-oxononano y 2-heptenal. Dentro de estos compuestos, el hexanal es uno de los principales volátiles utilizados como indicador de la peroxidación lipídica y que, además, se encuentra fuertemente correlacionado con la aparición de sabores desagradables (Kuo y Gardner, 2002; Belitz *et al.*, 2009).

La formación de los compuestos volátiles anteriormente mencionados, originados por los procesos de oxidación lipídica, es un problema recurrente tanto para la industria como para los consumidores. Para la industria de los alimentos, la detección de los sabores desagradables por olfato o gusto es el método principal para decidir cuando un alimento ya no se encuentra apto para consumo. Por lo tanto, la oxidación lipídica trae como consecuencia la formación de sabores y olores desagradable y además del desmejoramiento nutricional de los alimentos ricos en lípidos, al reducir el contenido de

sus ácidos grasos esenciales. Las cetonas y los alcadienales en bajas concentraciones afectan la aceptabilidad por parte de los consumidores, mientras que los alcanos y alquenos lo hacen en mayores concentraciones. En varios alimentos el término rancio, es comúnmente usado para designar sabores y olores desagradables causados por oxidación lipídica que pueden ser descriptos usando los siguientes atributos: cartón, oxidado, sabor a pintura, pescado, etc. (Jacobsen, 1999).

En conclusión, el deterioro oxidativo afecta negativamente la apariencia, el sabor, el olor y la vida útil de los productos y sus derivados. Además, produce un deterioro en componentes funcionales y nutricionales que posee el alimento (Vandamme *et al.*, 2016). Los efectos adversos del consumo de productos alimenticios que contienen lípidos oxidados son indiscutibles, sin embargo, los compuestos realmente peligrosos son los productos de la oxidación secundaria. Los últimos actúan produciendo daño en las estructuras intracelulares, cambios degenerativos en el cuerpo, enfermedades serias como arterosclerosis, daño y cambios en las propiedades de las membranas, etc. Los productos de la peroxidación lipídica se acumulan en los tejidos y pueden ser la causa de varias disfunciones y estados patológicos (diabetes, arteriosclerosis, cánceres). También, se ha comprobado que, tienen un rol significativo en el envejecimiento acelerado de las células del cuerpo (Guéraud *et al.*, 2010; Dąbrowska *et al.*, 2015).

## **Métodos para medir los cambios oxidativos en alimentos oleaginosos**

La presencia del oxígeno atmosférico en contacto con los alimentos de alto contenido lipídico es un factor importante en el desarrollo de la rancidez, en aparición de olores desagradables y en la polimerización de los aceites secantes. Los primeros productos obtenidos de la reacción (hidroperóxidos), son intermediarios transitorios que reaccionan produciendo mayormente compuestos con funciones carbonilo los que, a su vez, catalizan oxidaciones posteriores o se descomponen en compuestos indeseables (Grompone, 1991). La formación de productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica de los alimentos produce cambios químicos, físicos y sensoriales en su matriz afectando su calidad nutricional y, a su vez, la aceptabilidad de los consumidores (Grosso y

Resurreccion, 2002). Con el objetivo de cuantificar los cambios químicos, físicos y sensoriales ocurridos en los alimentos, se pueden utilizar distintas técnicas. Estas sirven para poner de manifiesto la vida útil o grado de deterioro de un alimento. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los cambios que ocurren en los compuestos pueden ser simultáneos e incluso competir entre sí. Es por ello que un solo método no es suficiente para monitorear lo que ocurre durante un periodo o lapso determinado de tiempo, sino que se debe recurrir a un conjunto de técnicas para una mejor representación de esas transformaciones (Fennema, 2008). Para la medición de la oxidación lipídica de los alimentos, existen distintos métodos que actúan detectando la aparición de determinados productos o midiendo la pérdida de compuestos iniciales o detectando cambios físicos en el alimento (Shahidi y Zhong, 2005).

## **Métodos que miden la aparición de productos de oxidación**

### **Índice de peróxidos (IP)**

La oxidación lipídica involucra la continua formación de hidroperóxidos como productos de oxidación primaria, que luego van a transformarse en una variedad de productos secundarios volátiles y no volátiles. La tasa de formación de peróxidos supera la tasa de degradación durante la etapa inicial de oxidación, para luego ser revertido en las etapas posteriores. Por lo tanto, el índice de peróxido es un indicador de las etapas iniciales del proceso de deterioro oxidativo. Se puede detectar cuando un lípido se encuentra en el proceso de incremento o disminución, siempre y cuando se realice el monitoreo de la cantidad de peróxidos en función del tiempo. El IP es uno de los indicadores más comúnmente utilizado para la determinación de la calidad de grasas y aceites desde su elaboración y su medición a lo largo de su almacenamiento (Shahidi y Zhong, 2005).

Si bien existen varios métodos para determinar el IP, el método oficial de la *AOAC International* (AOAC, 2010) se basa en una titulación iodométrica, en la cual se somete a los peróxidos generados a una reducción utilizando el anión ioduro ( $I^-$ ). Una vez oxidado, el  $I^-$  se convierte en Iodo ( $I_2$ ). Esta sustancia se pone en evidencia mediante una reacción de titulación utilizando una solución estandarizada de tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ) y almidón como indicador del punto final. La concentración de  $I_2$  liberada es proporcional a la

cantidad de peróxidos presentes en la muestra y el IP queda expresado como miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra (meq O<sub>2</sub>/Kg muestra) (Vercellotti *et al.*, 1992).

### **Dienos y trienos conjugados (DC y TC)**

Durante la formación de hidroperóxidos, ocurren reacciones de isomerización y reacomodación de los dobles enlaces dando lugar a la formación de dienos y trienos conjugados (DC y TC) que son productos de la oxidación primaria de alimentos lipídicos. Los dienos conjugados exhiben una absorbancia intensa a los 232 nm de longitud de onda, mientras que, los trienos a los 268 nm (Shahidi y Zhong, 2005).

Una de las técnicas más conocidas para su medición es aquella del COI (2001), en la cual la oxidación en las etapas iniciales puede ser medida disolviendo la muestra oleaginosa en un solvente orgánico adecuado y midiendo su absorbancia por espectrofotometría UV-visible. Esta técnica puede ser utilizada como índice de estabilidad de aceites, ya que se ha observado una gran correlación entre esta y aquella que mide el IP (Nepote *et al.*, 2006; Riveros *et al.*, 2016).

La utilización de este método presenta diversas ventajas como, la simple y rápida estimación sin necesidad de reactivos químicos y los bajos requerimientos de volumen de muestra. Sin embargo, también presenta desventajas como la menor especificidad y sensibilidad comparado con el índice de peróxido. Otra desventaja es que, el resultado puede ser afectado por la presencia de compuestos que tienen absorbancia en el mismo rango.

### **Índice de anisidina**

El índice de anisidina es un indicador que mide el contenido de aldehídos (productos de la oxidación secundaria) generados por la descomposición de los hidroperóxidos.

El principio de este indicador radica en la reacción entre los aldehídos con la p-anisidina (p-metoxianilina). La intensidad del color de los productos amarillentos formados en la reacción depende no solamente de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura: un doble enlace en la cadena carbonada conjugado con el doble enlace del carbonilo aumenta la absorbancia molar en 4 ó 5 veces. Esta coloración es evaluada en el espectro a una longitud de onda de 350 nm (Shahidi y Zhong, 2005).

Una desventaja de este método es la mayor sensibilidad que presenta con aldehídos insaturados con respecto a los saturados, porque los productos de los aldehídos insaturados absorben más fuertemente en esta longitud de onda. Sin embargo, este método es considerado un indicador confiable del deterioro oxidativo. Además, este análisis tiene una buena correlación con el contenido de compuestos volátiles de oxidación, como hexanal (Quiroga *et al.*, 2014). También, se han demostrado correlaciones confiables entre anisidina, variables sensoriales e índice de peróxido (Martínez *et al.*, 2013).

### **Volátiles medidos por cromatografía gaseosa**

Los hidroperóxidos son muy inestables en el tiempo, ya que son susceptibles a la descomposición, dando lugar a una compleja variedad de compuestos de oxidación secundaria que son más estables. La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que la fase móvil es un gas que transporta la muestra volatilizada a través de la columna, que actúa como la fase estacionaria. Al final de la columna, los compuestos se van a poder visualizar al pasar por un sistema de detección que responde rápidamente a pequeñas concentraciones de compuestos. La cromatografía gaseosa es un método muy práctico y útil ya que permite identificar y cuantificar rápidamente los compuestos volátiles de una muestra. En el análisis de grasas y aceites, los compuestos presentes en la muestra pueden estar relacionados con sabores característicos del alimento fresco o, al contrario, con compuestos de oxidación secundaria (como cetonas, hidrocarburos, aldehídos, alcoholes y ácidos carboxílicos de cadena corta).

Microextracción en fase sólida (HS-SPME) es una técnica novedosa que no requiere del uso de solventes. Consiste en la utilización de una fibra cubierta con una fase que sirve para la extracción de distintos tipos de moléculas. La cantidad de moléculas

capturadas por la fibra es proporcional a su concentración en la muestra, siempre y cuando se alcance el equilibrio termodinámico. Para esto, la muestra debe estar contenida en un recipiente sellado al cual se le aplica una fuente de calor para favorecer la liberación de los compuestos volátiles. Dentro de este recipiente se introduce la fibra para la extracción. El segundo paso es la desorción de los compuestos extraídos. Para ello, la fibra es transferida al puerto de inyección del cromatógrafo donde la desorción se produce por las altas temperaturas de éste. Posteriormente, se realiza el análisis de la muestra por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME/CG-MS) (Laguerre *et al.*, 2007).

## **Métodos que miden pérdidas de sustancias iniciales**

### **Cambios en la composición de ácidos grasos**

Es la medición cuantitativa de los cambios en la composición de ácidos grasos en la muestra, que ocurre por la pérdida de los mismos como consecuencia del deterioro oxidativo. En alimentos con un alto contenido de grasas o aceites, como la nuez, los ácidos grasos insaturados son aquellos más sensibles al deterioro y su proporción cambia significativamente durante la oxidación lipídica. El cambio en la composición de ácidos grasos provee una medida indirecta del grado de la oxidación (Shahidi y Zhong, 2005).

Para poder realizar la medición primero se deben extraer los lípidos del alimento y transformarlos en compuestos aptos para el análisis cromatográfico (Grosso *et al.*, 2000). Para ello, son derivados en ésteres metílicos los cuales son inyectados a un cromatógrafo de gases para poder ser separados, identificados y cuantificados (Ai *et al.*, 2014; Semmar y Artaud, 2015).

### **Tocoferoles**

Además de la descomposición de los lípidos o ácidos grasos durante los procesos de deterioro, también, se ven afectadas otras moléculas con características lipídicas como los tocoferoles. Estas sustancias actúan como antioxidantes naturales, ya que pueden donar su hidrógeno fenólico a los radicales libres en formación y así retardar el proceso de autooxidación. La identificación y los cambios cuantitativos sufridos por estas sustancias

pueden ser monitoreadas en el tiempo mediante el empleo de cromatografía líquida (HPLC) (Seppanen *et al.*, 2010). De esta manera estos componentes pueden ser utilizados como indicadores del grado de deterioro de un alimento rico en lípidos, ya que, al actuar como antioxidantes, su contenido disminuye a medida que aumenta el deterioro oxidativo.

## **Carotenoides**

Los carotenoides son compuestos que cumplen un rol importante en la estabilidad oxidativa de las nueces, ya que actúan como antioxidantes (Özrenk *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, la principal causa de la pérdida de carotenoides es el deterioro oxidativo, por lo cual, a medida que el aceite se va oxidando, su contenido va disminuyendo (Dias *et al.*, 2014).

Una de las maneras de determinar el contenido de carotenoides es por un método espectrofotométrico (Minguez-Mosquera *et al.*, 1991). Para realizar una determinación, se diluye el aceite en un solvente orgánico y se realiza una lectura de absorción a una longitud de onda de 470 nm.

## **Otros métodos**

### **Análisis sensorial**

Es el examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos, obteniendo datos cuantificables y objetivos (Sancho *et al.*, 2002).

A partir de la segunda mitad del siglo XX los científicos e investigadores, reconocieron el papel del consumidor en la aceptación o rechazo de un alimento y comenzaron a utilizarlo como instrumento para la evaluación de productos alimenticios. Como metodología de análisis se utiliza la valoración sensorial humana (vista, oído, olfato, gusto, tacto) como un instrumento eficaz de medida para el control de la calidad y aceptabilidad de un alimento (Meilgaard *et al.*, 2006).

Hoy en día, es un proceso que se aplica en la industria de los alimentos sobre las materias primas, en distintos puntos de la elaboración y en el control de mercado. Esta última fase está basada en la opinión de los consumidores según el grado de aceptación del producto. Por lo tanto, según su finalidad, se pueden realizar distintos análisis sensoriales: de calidad y de aceptación (Sancho *et al.*, 2002).

En los análisis de calidad se debe examinar el producto y clasificar objetivamente los distintivos característicos. Las cualidades sensoriales de un alimento son manifestaciones de su calidad química y su estabilidad oxidativa. Dichas cualidades al ser analizadas con exactitud, precisión y sensibilidad pueden indicar fehacientemente aquellas transformaciones que están ocurriendo en la matriz de un producto.

Según sea el objetivo del investigador, se pueden realizar distintos análisis. Para determinar si existen diferencias significativas entre dos o más productos, se recurre a las “Pruebas discriminativas”, para las cuales se utilizan paneles de jueces semi-entrenados o preparados para brindar datos objetivos. En el caso que se requiera información cuali y cuantitativa de los atributos de la muestra y que permita establecer como son las diferencias entre muestras, las “Pruebas descriptivas” son las adecuadas. Para estas pruebas, se utiliza un panel de jueces entrenados que trabajan con un vocabulario muy específico para evaluar los atributos de cada tipo de alimento o matriz (Lawless y Civille, 2013). Este vocabulario comprende un conjunto de palabras definidas (descriptores) que describen las cualidades sensoriales del producto bajo estudio. Su uso promueve la estandarización del vocabulario sensorial facilitando la comunicación entre panelistas, industrias, investigadores, etc. Los jueces deben ser altamente entrenados para que funcionen como un instrumento para medir en forma cualitativa (léxico) y cuantitativa (intensidades) los atributos de un alimento para evitar o disminuir cualquier error o desviación producido por la subjetividad del evaluador. Esto va a brindar reproducibilidad en los resultados, al punto que éstos pueden ser eficazmente correlacionados con los análisis instrumentales (Lawless y Heymann, 2010). Los datos recolectados son analizados utilizando la estadística con el fin de detectar si efectivamente, las percepciones de los evaluadores son representativas de las características del alimento en cuestión. Finalmente, los resultados encontrados deben ser interpretados considerando el contexto, el marco teórico y cualquier otra situación que permita generar conclusiones adecuadas (Lawless y

Heymann, 2010). Finalmente, el análisis descriptivo va a permitir que el investigador obtenga descripciones sensoriales completas de los productos, la identificación de ingredientes o variables en los procedimientos, y la identificación de los atributos sensoriales importantes para la aceptabilidad. Además, estas técnicas funcionan muy bien para realizar análisis de vida útil de alimentos, especialmente si los jueces están bien entrenados y son consistentes en el tiempo (Sancho *et al.*, 2002).

En los casos en que el objetivo sea conocer el grado de preferencia o aceptabilidad de un producto determinado, las pruebas sensoriales que se pueden aplicar se denominan “Pruebas afectivas”. En los análisis de aceptación, lo que se pretende es dictaminar el grado de aceptación que tendrá un producto, siendo a veces deseable conocer la reacción subjetiva o impulsiva del catador (Sancho *et al.*, 2002). En los casos donde la detección de sabores y olores desagradables debido a la oxidación lipídica es importante, este método se puede usar como un indicador para tomar la decisión de cuando un alimento esta apto o no para su consumo. También, es utilizado por las empresas para evaluar la reacción de los consumidores y conocer si un nuevo alimento va a ser o no aceptado cuando pretenden introducir un producto nuevo al mercado. Un ejemplo de esto es la incorporación de antioxidantes naturales o cubiertas comestibles en alimentos con alto contenido lipídico con el objetivo de mejorar su preservación en el tiempo.

### **Medición del color**

Para la medición objetiva del color se pueden utilizar colorímetros basados en el sistema CIELab. En este sistema se representan de forma regular los factores psicológicos que modifican nuestra percepción del color, tales como el tono (rojo, naranja, amarillo, etc.) la saturación o croma (muy rojo o menos rojo, según la proporción de gris presente en el color) y la luminosidad (situada entre blanco y el negro). Las magnitudes  $L^*$ ,  $a^*$ , y  $b^*$  son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo y del blanco de referencia (Joshi y Brimelow, 2002). La coordenada  $L^*$  recibe el nombre de luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad, siendo, a su vez, perpendiculares entre sí. El corte del eje  $L^*$  con el plano que forman  $a^*$  y  $b^*$  es el punto acromático. El valor  $a^*$  es una medida de la intensidad de color rojo. En el desplazamiento sobre el eje  $a^*$  hacia valores positivos del punto acromático se observan

los rojos y para valores negativos los verdes. Adicionalmente, el valor  $b^*$  es una medida de la intensidad de color amarillo. En el desplazamiento sobre el eje  $b^*$  hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y para valores negativos los azules. El conjunto  $a^*$ ,  $b^*$  recibe el nombre de cromacidad y junto con la luminosidad definen el color de un estímulo (en coordenadas cartesianas). Para detectar la diferencia de color entre las muestras, se calcula el valor  $\Delta E$ ; cuanto más alto es el valor de  $\Delta E$ , mayor es la desviación en comparación con el color original. La diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) se calcula de la siguiente manera:  $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{0,5}$ . Si el resultado de  $\Delta E^*$  es inferior a 1 las diferencias de color no son obvias para el ojo humano, mientras que, si  $\Delta E^*$  es superior a 3 las diferencias de color son obvias para el ojo humano (Martínez-Cervera *et al.*, 2012).

## **Alternativas para disminuir o retardar las reacciones oxidativas en productos oleaginosos**

Los alimentos que poseen un alto contenido de ácidos grasos insaturados, como es el caso de la nuez, sufren cambios en su composición a medida que transcurre el tiempo. Estos cambios producen un deterioro de su calidad química, sensorial y nutricional (Frankel, 2005). Debido a que la nuez proviene de un árbol frutal, la cosecha se realiza solo una vez al año, por lo cual, se debe conservar su calidad desde su cosecha hasta la siguiente. Como consecuencia del tipo de empaque, fraccionamiento y precarias condiciones de almacenamiento en la comercialización de este grano, se produce un deterioro acelerado en su calidad en el tiempo.

La conservación de la calidad de un alimento hasta su llegada al consumidor es uno de los objetivos más importantes en la industria, por lo que se han estudiados diferentes maneras por las cuales se pueden preservar mejor los alimentos con alto contenido lipídico:

- Aislamiento del oxígeno. Esto se puede regular mediante el sistema de envasado, como por ejemplo utilizando materiales de envase de alta barrera y realizando vacío o barrido con nitrógeno. En los últimos años se han desarrollado formas novedosas de empaque, entre ellas se pueden encontrar los *films* y cubiertas comestibles con la

intención de disminuir el intercambio de gases entre el alimento y el medio circundante donde se almacena (Han y Gennadios, 2014).

- Almacenamiento del alimento a bajas temperaturas y en la oscuridad. Eso hace que disminuya la tasa de autooxidación, pero no aplica en casos de deterioro por enzima LOX (Belitz *et al.*, 2009).
- Adición de antioxidantes.

### **Cubiertas o *films* comestibles**

Debido a la creciente preocupación de los consumidores por alimentos más seguros y de mejor calidad, han surgido nuevas tecnologías de envasado que utilizan herramientas funcionales para proteger al alimento de la peroxidación lipídica. Estos envases, denominados activos, pueden ser confeccionados con el fin de remover algún compuesto no deseado del alimento, incorporar algún aditivo con propiedades antioxidantes o antimicrobianas o, prevenir el deterioro sobre el producto (Koontz, 2016).

Los *films* comestibles se definen como capas delgadas de distintos compuestos comestibles que le proveen fuerza mecánica a la estructura. Las cubiertas comestibles son un tipo de *films*, que se aplican en forma de capa directamente en la superficie de los materiales. La capa de cubierta, en algunos casos, puede ser removida del material, no obstante, las cubiertas no están planteadas para ser desechadas separadamente de los materiales recubiertos. Por lo tanto, las cubiertas son consideradas como una parte del producto final (Han y Gennadios, 2014). La principal diferencia entre cubiertas y *films* es que, las cubiertas comestibles se aplican en forma líquida, comúnmente mediante la inmersión del alimento en la solución que contiene la matriz estructural; en cambio, los *films* normalmente son moldeados en forma de láminas planas y delgadas, que luego son aplicadas envolviendo el producto (Falguera *et al.*, 2011).

Las cubiertas o *films* comestibles son normalmente clasificados según la composición de su matriz estructural que suelen ser biomoléculas como: carbohidratos, proteínas o lípidos. Los hidrocoloides (proteínas y polisacáridos) son los biopolímeros más

investigados para la elaboración de cubiertas comestibles. Esto se debe a sus excelentes propiedades mecánicas y estructurales, pero en contraparte, pueden ofrecer una barrera débil contra el intercambio de humedad (Han y Gennadios, 2014). Los mecanismos que tienen los biopolímeros para formar *films* o cubiertas son fuerzas intermoleculares como las uniones covalentes y o interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o iónicas (Han y Gennadios, 2014). Los *films* y cubiertas comestibles también presentan en su composición, aditivos de calidad alimentaria, entre ellos plastificantes, que sirven para modificar sus propiedades físicas o de funcionalidad.

Los *films* o cubiertas comestibles actúan mejorando la calidad de los alimentos ya que los protegen del deterioro físico, químico y biológico. Su aplicación ayuda a mejorar la resistencia física de los alimentos, disminuir el cúmulo de partículas, mejorar los aspectos visuales y propiedades al tacto en las superficies, por lo cual, puede ser beneficioso para la aceptabilidad de los consumidores. También actúan protegiendo a los alimentos de la pérdida e incorporación de humedad, del crecimiento microbiano en la superficie, de los cambios químicos inducidos por la luz, de la oxidación de nutrientes, etc. (Kester y Fennema, 1986). Adicionalmente, actúan como barreras contra la penetración de aceites, gases, vapores y como medio de transporte de sustancias activas, como antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes, etc. (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Miller y Krochta, 1997). Estas propiedades protectoras están destinadas a cuidar la calidad de los productos alimenticios, resultando en la extensión de la vida útil (Gennadios y Weller, 1990), por lo tanto, juegan un rol preponderante a lo largo del almacenamiento, distribución y marketing de los productos alimenticios.

El uso de cubiertas o *films* comestibles presenta diversas ventajas para la industria, los consumidores y el medio ambiente ya que para su elaboración se utilizan materiales biodegradables. Además, se pueden usar como forma de empaque primario y tienen el potencial de reemplazar parcial o totalmente los materiales de empaque tradicionales, así reduciendo la utilización de materiales plásticos y la contaminación ambiental que estos producen. También, pueden actuar simplificando la estructura total de empaque (Debeaufort *et al.*, 1998; Han y Gennadios, 2014). Las propiedades que aportan los *films* o cubiertas sobre los productos alimenticios van a estar condicionadas por factores como; el tipo de material implementado (matriz estructural), las condiciones a partir de las cuales

son elaborados los *films* (pH, tipo de solvente, temperatura, concentración de componentes), y el tipo o concentración de los aditivos (plastificantes, antioxidantes, emulsionantes, etc. (Guilbert *et al.*, 1996; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

## **Antioxidantes**

Las reacciones de oxidación lipídica en los alimentos generan la síntesis de radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes actúan deteniendo estas reacciones al secuestrar los radicales libres e inhibir otras reacciones oxidándose ellos mismos. Es por ello, que los antioxidantes son considerados a menudo agentes reductores (Belitz *et al.*, 2009).

Los antioxidantes funcionan de distintas maneras, dependiendo de la parte del camino de la oxidación del lípido en la que interfieran. Los antioxidantes pueden pertenecer a más de alguna de las siguientes categorías y se clasifican en:

- Antioxidantes primarios: son aquellas sustancias que pueden donar un átomo de hidrogeno o un electrón a un radical libre, y de esa manera interrumpir su habilidad para continuar el proceso de propagación en cadena. Al donar el hidrogeno o electrón el antioxidante se transforma en un radical suficientemente estable, que no puede continuar con la propagación de las reacciones de los radicales. Algunos ejemplos de antioxidantes son los compuestos fenólicos como el BHT y tocoferoles.

- Antioxidantes secundarios: son compuestos que reaccionan con hidroperóxidos, convirtiéndolos en productos no radicalarios más estables. Los hidroperóxidos, también, reaccionan con metales para formar radicales hidroxilos y alquilos que pueden a veces extraer hidrógenos de los lípidos, generando radicales con centros carbonados que promueven el ciclo de propagación.

- Los quelantes: son antioxidantes que se combinan con metales y previenen que estos inicien la formación de radicales. Dentro de este grupo se encuentran el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido cítrico, entre otros.

- “Quenchers” o extinguidores: son sustancias que desactivan a las especies de alta energía como los singletes de oxígeno u otros estados fotoactivados, y desvían esa energía a caminos menos perjudiciales. Entre ellos se encuentran los fenoles y carotenoides.

- Los secuestradores de oxígeno: son aquellos que reaccionan con el oxígeno y lo remueven del sistema estabilizándolo. Por ejemplo: ácido ascórbico.

- Los regeneradores de antioxidantes: son compuestos que reducen los radicales que se forman cuando un antioxidante primario dona un hidrógeno o electrón a un radical libre. Por ejemplo, los tocoferoles son antioxidantes primarios que se regeneran cuando el radical tocoferil es reducido por el ácido ascórbico (Berdahl *et al.*, 2010).

Los antioxidantes se pueden dividir en 2 grupos: naturales y sintéticos. Los antioxidantes naturales se han estado utilizando en la dieta humana por más de miles de años. Estos, se pueden encontrar naturalmente presentes en muchos alimentos, aunque también puede ser incorporados artificialmente en forma de aditivos (Belitz *et al.*, 2009). Uno de los problemas que presenta este tipo de antioxidante es la efectividad al ser comparados con los sintéticos, resultando en la necesidad de aplicación en una mayor proporción en los alimentos para lograr el efecto deseado. Esta acción puede resultar en una modificación del sabor, aroma y color del alimento. Adicionalmente, un mayor uso suele implicar un mayor costo ya que provienen de fuentes naturales con disponibilidad limitada (Berdahl *et al.*, 2010). Algunos antioxidantes que se encuentran naturalmente en los alimentos son los tocoferoles, carotenoides, compuestos fenólicos o polifenoles, entre otros.

Los tocoferoles son antioxidantes que se preservan en los aceites vegetales luego de su extracción, por lo cual van a intervenir en la estabilidad de este producto. La actividad antioxidante de los tocoferoles se incrementa de la forma  $\alpha \rightarrow \gamma$ . La mayor eficiencia del  $\gamma$ -tocoferol en comparación con  $\alpha$ -tocoferol se basa en su mayor estabilidad y en los distintos productos que genera en las reacciones de la autooxidación. En contraposición,  $\alpha$ -tocoferol es un recolector más rápido de radicales libres formados durante la oxidación, pero genera un radical alquilo que puede iniciar la autooxidación de ácidos grasos insaturados. Como

conclusión, la tasa de peroxidación de ácidos grasos insaturados se incrementa cuando el aceite contiene mayores proporciones de  $\alpha$ -tocoferol (Belitz *et al.*, 2009).

Licopeno,  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina y antoxantina son algunos de los carotenoides más conocidos que se encuentran en la naturaleza. Estos son pigmentos de color solubles en lípidos que se encuentran presentes en frutas y vegetales, cuyas coloraciones anaranjadas, amarillentas y coloradas derivan de sus extensivos sistemas de doble enlace conjugados. Estos antioxidantes, que se le atribuyen beneficios para la salud, contribuyen a la estabilidad oxidativa de los sistemas alimenticios cuando se encuentran naturalmente presentes, como ocurren en el aceite de palma o las zanahorias. A pesar de los beneficios que presentan, son muy sensibles a la exposición a la luz, calor y pH y, también, a la presencia de iones de metales (Berdahl *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos están asociados a la protección que proveen determinadas hierbas, especias y extractos de té. Los antioxidantes fenólicos naturales se hacen presentes en varias formas químicas, como los ácidos fenólicos (rosmarinico y ácido carnosico), los ácidos hidrobenczoicos (ácido vanílico), ácido hidroxicinámico (ácido ferúlico y clorogénico), flavonoides (quercetina, catequina y rutina), antocianinas (delfinidina), taninos (procianidina, ácido elágico y ácido tánico), lignanos (sesaminol), estilbenos (resveratrol), cumarinas (cumarina) y aceites esenciales (carvacrol, eugenol). Algunos de ellos, como los grupos pirogallol o pirocatecol, contienen más de un grupo hidroxilo fenólico. Una de las principales condiciones que afectan su acción es el pH; con baja actividad en medio ácido (pH 4) y alta en medio básico (pH 8). En la protección del ácido linoleico, la actividad antioxidante de la quercetina es aproximadamente tan alta como  $\alpha$ -tocoferol. Dentro de este grupo, la quercetina tiene actividad antioxidante 4 veces más alta que la catequina (Berdahl *et al.*, 2010).

Los antioxidantes presentes en la composición química natural de los vegetales pueden ser extraídos para diversos fines, como por ejemplo ser aplicados en alimentos para aprovechar sus propiedades conservantes, al actuar contra el deterioro de los lípidos. Los más conocidos, por ser utilizados comercialmente en alimentos, son los flavonoides, los compuestos fenólicos, los terpenos y tocoferoles. Se ha podido demostrar que, muchos de ellos, exhiben una buena actividad antioxidante en distintos alimentos; como el aceite

esencial de orégano aplicado en el aceite de oliva (Asensio *et al.*, 2011), polifenoles del maní aplicados a través de cubiertas comestibles en almendras (Larrauri *et al.*, 2016), aceites esenciales de romero y albaca aplicados a través de cubiertas comestibles sobre granos de girasol (Riveros *et al.*, 2016).

Los antioxidantes sintéticos pueden ser incorporados en alimentos con alto contenido lipídico para retardar las reacciones de deterioro. Estos antioxidantes deben cumplir con los siguientes requisitos: no ser tóxicos, ser altamente activos en bajas concentraciones (0.01–0.02%), ser lipofílicos y ser estables en las condiciones normales de procesamiento de los alimentos (Belitz *et al.*, 2009). Algunos de los más usados son el galato de dodecilo, butil hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA) y la terbutil hidroquinona (TBHQ). El BHA y el BHT comprenden antioxidantes fenólicos sintéticos cuya actividad ha sido estudiada en distintos alimentos como el maní tostado con una recubierta a base de miel (Nepote *et al.*, 2004), en maní frito salado (Olmedo *et al.*, 2009), en almendras recubiertas con coberturas comestibles (Larrauri *et al.*, 2016) y en salame (Larrauri *et al.*, 2013). Actualmente, el uso de los antioxidantes sintéticos se halla controlado por los organismos gubernamentales, los cuales, fijan límites estrictos para su adición en los productos alimenticios. Esto se debe a que varias investigaciones han remarcado los posibles efectos dañinos (carcinogénesis y daño hepático) producidos por su utilización en concentraciones elevadas (Fukushima *et al.*, 1987; Biparva *et al.*, 2012). Por este motivo, la industria y la demanda de los consumidores por productos más seguros han logrado que se pusiera el foco en sustancias con actividad antioxidante provenientes de fuentes naturales.

### **Técnicas para medir actividad antioxidante**

Los antioxidantes al ser aplicados en alimentos con alto contenido graso presentan un amplio rango de eficiencias que dependen de las propiedades del antioxidante, las concentraciones en cual se aplica y las condiciones de procesamiento que conlleva la elaboración del producto alimenticio. Existen distintos métodos para medir actividad antioxidante cuyos factores esenciales para el funcionamiento de la técnica son la aplicación en un sustrato adecuado, tener un iniciador de la oxidación y establecer un punto final apropiado de medición. Una vez que el sustrato se oxidó, se puede monitorear

mediante métodos químicos, instrumentales y sensoriales. En otros métodos no es necesario el sustrato, como es el caso de los que miden las habilidades relativas de los antioxidantes para secuestrar radicales sintéticos o naturales en comparación con la potencia antioxidante de un antioxidante standard. Trolox, ácido ascórbico, y quercetina son los antioxidantes estándares más usados, mientras que, los radicales sintéticos más usados son DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico).

## **DPPH**

Los radicales libres son moléculas caracterizadas por tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo, condición que los torna altamente reactivos. Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de distintos compuestos de alimentos y plantas. Una de las técnicas preferidas es la de que utiliza el radical libre DPPH. La molécula DPPH es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, motivo por el cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual disuelto en metanol tiene absorbancia a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de las propiedades antioxidantes (Guija-Poma *et al.*, 2005). La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC50), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. En tal sentido, podemos considerar que el valor IC50 es dependiente de la concentración del DPPH, así como, de la naturaleza del compuesto antioxidante. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- DPPH es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la

peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peróxido, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH.

- La reacción cinética entre el DPPH y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC50.

## **ABTS**

La generación del radical ABTS<sup>•+</sup> constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos, que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El formato más apropiado del ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes. Esta técnica implica la producción directa del cromóforo ABTS<sup>•+</sup> verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio. Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce al ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS<sup>•+</sup> está determinado en función de la concentración y el tiempo, así como del valor correspondiente a Trolox que es usado como estándar bajo las mismas condiciones. La mayoría de los estudios expresan los resultados como IC50, definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de ABTS<sup>•+</sup> al 50% (Re *et al.*, 1999).

La ventaja de este ensayo es que se puede realizar con muestras hidrosolubles como en liposolubles (Kuskoski *et al.*, 2005).

## **Contenido de fenoles totales**

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C), a pH básico, dando lugar a una coloración azul que se puede leer espectrofotométricamente a 765 nm. Es un ensayo comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias por su

simplicidad, disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton *et al.*, 1999). El reactivo (F-C) contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) es de color amarillo, de manera que, al ser reducido por los grupos fenólicos, da lugar a un complejo de color azul intenso. Dicha intensidad es medida para evaluar el contenido en polifenoles. El mecanismo del análisis es una reacción redox, por lo que puede considerarse un método de medida de la actividad antioxidante total. Se cuantifica por espectrofotometría en base a la elaboración una curva patrón de ácido Gálico (Cicco *et al.*, 2009). Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción.

### **Contenido de flavonoides totales**

Los polifenoles, antocianinas y flavonoides son constituyentes de las plantas que son importantes en la captura de radicales libres, debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos presentes en su estructura (Kumarappan *et al.*, 2012). Los flavonoides pertenecen a la mayor clase de compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en las plantas y entre ellos se encuentran las flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononoles, catequinas y flavononas.

Recientemente, se ha estandarizado el uso de métodos espectrofotométricos para la determinación de flavonoides totales en las plantas, utilizando  $\text{AlCl}_3$  como fuente radicalaria. El catión de aluminio en metanol forma complejos estables con los flavonoides, que se pueden evaluar con un análisis espectrofotométrico. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Una ventaja que posee el método es que es exacto, proporcionando desviaciones muy pequeñas o ninguna diferencia entre una prueba y otra.

### **Actividad quelante del ion $\text{Fe}^{2+}$**

Un quelante, secuestrante, o antagonista de metales pesados es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados. A estos complejos se los conoce como quelatos. Es conocido que los taninos presentan actividad antioxidante, y esto puede ser el resultado de su habilidad para quelar iones como el hierro o el zinc, los cuales, pueden generar radicales oxidrilos altamente reactivos (Karamác, 2007).

En función de lo expuesto precedentemente, se detecta que la utilización de materiales poliméricos sintéticos para el envasado de alimentos genera una importante proporción de desechos urbanos sólidos. Ésta es una problemática actual en la industria y en los organismos gubernamentales. Nuevas tecnologías de envasado están siendo elaboradas con la incorporación de materiales biodegradables provenientes de polímeros naturales (Peelman *et al.*, 2013). Esencialmente, la optimización de las condiciones de transporte-almacenamiento y/o el agregado de aditivos que retarden los procesos de deterioro oxidativo, van a determinar la calidad y por ende la estabilidad del producto (Talbot, 2016). Se ha comprobado que las coberturas a base de biopolímeros comestibles pueden actuar como vehículo de sustancias con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas. Así, las coberturas comestibles se convierten en envases activos capaces de liberar sustancias hacia el alimento. En función de esto surgen las siguientes hipótesis de trabajo.

## **HIPÓTESIS**

- ✓ Las cubiertas comestibles elaboradas a partir de productos comerciales (carbometil-celulosa, metil-celulosa y proteína del suero de leche) aplicadas sobre nueces prolongan su vida útil.
- ✓ Los polifenoles extraídos a partir de la harina de nuez presentan actividad antioxidante y cuando son aplicados sobre productos derivados de nuez ejercen un efecto conservante.
- ✓ La harina de nuez concentrada en proteínas es apta para la elaboración de películas comestibles que cuando se aplican sobre granos de nuez las protegen del deterioro oxidativo.
- ✓ La calidad química y sensorial de la nuez se preserva por más tiempo cuando es recubierta con coberturas comestibles con la incorporación de los polifenoles de la nuez (antioxidantes) en comparación con nueces no recubiertas y recubiertas sin el agregado de los antioxidantes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la estabilidad química y sensorial de nueces producidas en Argentina con aplicación de cubiertas comestibles y la adición de antioxidantes naturales que no alteren las propiedades sensoriales del producto y permitan una mejor conservación de sus parámetros de calidad química, nutricional y sensorial.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la composición química general y el perfil de ácidos grasos en las nueces con la finalidad de conocer la calidad de la materia prima a utilizar en este estudio.

2. Desarrollar el proceso de recubrimiento de nueces aplicando distintos tipos de materiales que actuarán como películas comestibles.
3. Evaluar el efecto sobre las propiedades sensoriales que produce la aplicación de las cubiertas comestibles sobre la nuez mediante pruebas afectivas y descriptivas.
4. Realizar un estudio de almacenaje de los productos recubiertos para evaluar el efecto protector de las diferentes cubiertas evaluando cambios en indicadores químicos y en intensidades de atributos sensoriales.
5. Extraer compuestos polifenólicos de la harina de nuez y determinar su composición química y actividad antioxidante.
6. Determinar la composición química de la harina concentrada en proteínas resultante de la extracción del aceite y desarrollar una cubierta comestible para ser aplicada sobre las nueces.
7. Evaluar cambios en indicadores químicos y en atributos sensoriales durante el almacenaje de nueces recubiertas utilizando el concentrado de proteínas con la inclusión de los polifenoles de la nuez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ai F.F., Bin J., Zhang Z.M., Huang J.H., Wang J.B., Liang Y.Z., Yu L. and Yang Z.Y. 2014. Application of random forests to select premium quality vegetable oils by their fatty acid composition. *Food Chemistry* 143: 472-478.
- AOAC. 2010. Official methods of analysis of the AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Argumedo F. 2014. El negocio de la nuez de nogal. XVI Jornadas Frutihortícolas 2014, Mendoza, Argentina, pp. 1-30.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2011. Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science* 76: 445-450.
- Belitz H.D., Grosch W. and Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. Ed. Springer, Berlin, Alemania, 1070 pp.
- Berdahl D.R., Nahas R.I. and Barren J.P. 2010. Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. En: *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Decker, E., Elias, R., McClements, D.J., (eds.). Sawston, Cambridge, Reino Unido, pp. 272-320.
- Bett K.L. and Boylston T.D. 1992. Effect of storage on roasted peanut quality. En: *Lipid oxidation in food*. ACS Symposium Series, (ed.). Washington, Estados Unidos, pp. 322-343.
- Biparva P., Ehsani M. and Hadjmohammadi M.R. 2012. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis* 27: 87-94.
- Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M. and Lattanzio V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 107-110.
- COI. 2001. Método de análisis prueba espectrofotométrica en el ultravioleta. Document COI/T 20/Doc n° 19/Rev 1. Madrid, España: International Olive Oil Council (IOOC).
- Cólica J.J. 2015. Producción de nueces en Argentina y Catamarca. III Simposio internacional de nogalicultura del noroeste argentino, Santa María, Catamarca, Argentina, pp. 1-5.
- Dąbrowska M., Zielińska A. and Nowak I. 2015. science Lipid oxidation products as a potential health and analytical problem. *Faculty of Chemistry* 69: 89-94.
- Debeaufort F., Quezada-Gallo J. and Voilley A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science* 38: 299- 313.
- Diario Uno. 2016. Mendoza es el primer exportador de nueces del país y comercializa casi el

60% del total. Publicado en internet, disponible en [https://www.diariouno.com.ar/mendoza/mendoza-es-el-primer-exportador-de-nueces-del-pais-y-comercializa-casi-el-60-del-total--10022016\\_ry-z8P-fr7](https://www.diariouno.com.ar/mendoza/mendoza-es-el-primer-exportador-de-nueces-del-pais-y-comercializa-casi-el-60-del-total--10022016_ry-z8P-fr7). Activo en agosto 2018.

- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C. and Oliveira L. 2014. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards - effect of storage temperature and time. *Food Chemistry* 156: 37-41.
- Falguera V., Quintero J.P., Jiménez A., Muñoz J.A. and Ibarz A. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology* 22: 292-303.
- Fennema O.R. 2008. *Food Chemistry*. Ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos, 1069 pp.
- Frankel E.N. 2005. *Lipid oxidation*. Ed. Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido, 470 pp.
- Fukushima S., Ogiso T., Kurata Y., Hirose M. and Ito N. 1987. Dose-dependent effects of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin for promotion of bladder carcinogenesis in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-initiated, unilaterally ureter-ligated rats. *Cancer Letters* 34: 83-90.
- Gennadios A. and Weller C.L. 1990. Edible films and coating from wheat and corn proteins. *Food Technology* 44: 63-69.
- Grompone M. 1991. El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. *Grasas y Aceites* 42: 8-13.
- Grosso N.R., Nepote V. and Guzman C.A. 2000. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 806-809.
- Grosso N.R. and Resurreccion A.V.A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science* 67: 1530-1537.
- Guéraud F., Atalay M., Bresgen N., Cipak A., Eckl P.M., Huc L., Jouanin I., Siems W. and Uchida K. 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* 44: 1098-1124.
- Guija-Poma E., Inocente-Camones M.A., Ponce-Pardo J. and Zarzosa-Norabuena E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico* 15: 57-60.
- Guilbert S., Gontard N. and Gorris L.G.M. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology* 29: 10-17.
- Han J. and Gennadios A. 2014. Edible films and coatings: a review. En: *Innovations in food*

- packaging. Han, J. H., (ed.). Londres, Reino Unido, pp. 239-262.
- Iannamico L. 2015. Cultivo del Nogal. Eds. INTA, Allen, Río Negro, Argentina, 11 pp.
- Jacobsen C. 1999. Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems. *Fett-Lipid* 101: 484-492.
- Joshi R. and Brimelow C. 2002. Colour measurement of food by colour reflectance. En: *Colour in food: improving quality*. MacDougall, D. B., (ed.). Boca Ratón, Estados Unidos, pp. 82-114.
- Karamać M. 2007. Fe(II), Cu(II) and Zn(II) chelating activity of buckwheat and buckwheat tannin groats tannin fractions. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57: 357-362.
- Kester J.J. and Fennema O. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 40: 47-59.
- Kong F. and Singh R.P. 2016. Advances in instrumental methods for shelf life evaluation. En: *The stability and shelf life of food*. Subramaniam, P., (ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido, pp. 229-251.
- Koontz J.L. 2016. Packaging technologies to control lipid oxidation. En: *Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. Hu, M. and Jacobsen, C., (eds.). Cambridge, Reino Unido, pp. 479-517.
- Krochta J.M. and de Mulder Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology* 51: 61-74.
- Kumarappan C.T., Thilagam E. and Manda S.C. 2012. Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 349-355.
- Kuo T.M. and Gardner H.W. 2002. *Lipid Biotechnology*. Ed. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos, 696 pp.
- Kuskoski E.M., Asuero A.G., Troncoso A.M., Mancini-Filho J. and Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 25: 726-732.
- Laguerre M., Lecomte J. and Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46: 244-282.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygodlo J., Grosso N.R. and Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1751-1757.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote, V. 2016. Chemical and sensory quality preservation in coated almonds with the addition of

- antioxidants. *Journal of Food Science* 81: 208-215.
- Lawless H.T. and Heymann H. 2010. *Sensory evaluation of food principles and practices*. Ed. Springer Science & Business Media, Luxemburgo, 587 pp.
- Lawless L.J.R. and Civille G.V. 2013. Developing Lexicons: A review. *Journal of Sensory Studies* 28: 270-281.
- Los Andes. 2017. Nuez: mercados demandantes y precios firmes. Publicado en internet, disponible en <https://losandes.com.ar/article/nuez-mercados-demandantes-y-precios-firmes>. Activo en agosto 2018.
- Luximon-Ramma A., Baborun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T. and Aruoma O.I. 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International* 38: 357-367.
- Martínez-Cervera S., Sanz T., Salvador A. and Fiszman S.M. 2012. Rheological, textural and sensorial properties of low-sucrose muffins reformulated with sucralose/polydextrose. *LWT - Food Science and Technology* 45: 213-220.
- Martínez M.L., Mattea M.A. and Maestri D.M. 2006. Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes varietal and crop year effects on lipid composition of walnut genotypes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 791-796.
- Martínez M.L., Penci C.P., Ixtaina V., Ribotta P.D. and Maestri D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology* 51: 44-50.
- Meilgaard M., Civille G. and Carr T. 2006. *Sensory Evaluation Techniques*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos, 416 pp.
- Miller K.S. and Krochta J.M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology* 8: 228-237.
- Minguez-Mosquera M.I., Garrido-Fernández J. and Gandul-Rojas B. 1991. Quantification of pigments in fermented manzanilla and hojiblanca olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1662-1666.
- Muncharaz Pou M. 2012. *El Nogal*. S.A. Ed. Mundi-prensa libros, Madrid, España, 350 pp.
- Murray R.K., Bender D.A., Bothan K.M., Kennelly P.J., Rodwell V.W. y Weil P.A. 2010. *Harper Bioquímica ilustrada*. Ed. McGraw-hill, México, Mexico, 687 pp.
- Nepote V., Mestrallet M.G. and Grosso N.R. 2006. Oxidative stability in fried-salted peanuts elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 900-909.
- Nepote V., Mestrallet M.G. and Grosso N.R. 2004. Natural Antioxidant Effect from Peanut Skins in Honey-roasted Peanuts. *Journal of Food Science* 69: 295-300.

- Olmedo R.H., Asensio C., Nepote V., Mestrallet M.G. and Grosso N.R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2128-2136.
- Ozkan G. and Koyuncu M.A. 2005. Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Turkey. *Grasas y Aceites* 56: 141-146.
- Özrenk K., Javidipour I., Yarilgac T., Balta F. and Gündogdu M. 2012. Fatty acids, tocopherols, selenium and total carotene of pistachios (*Pistacia vera* L.) from Diyarbakir (Southeastern Turkey) and walnuts (*Juglans regia* L.) from Erzincan (Eastern Turkey). *Food Science and Technology International* 18: 55-62.
- Peelman N., Ragaert P., De Meulenaer B., Adons D., Peeters R., Cardon L., Van Impe F. and Devlieghere F. 2013. Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science and Technology* 32: 128-141.
- Quiroga P.R., Asensio C.M. and Nepote V. 2014. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 471-479.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radical. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.
- Regueiro J., Sánchez-gonzález C., Vallverdú-queralt A., Simal-gándara J., Lamuela-raventós R. and Izquierdo-pulido M. 2014. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry* 152: 340-348.
- Riveros C.G., Nepote V. and Grosso N.R. 2016. Thyme and basil essential oils included in edible coatings as a natural preserving method of oilseed kernels. *Journal of Science of Food and Agriculture* 96: 183-191.
- Rojas-Graü M.A., Soliva-Fortun R. and Martín-Belloso O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20: 438-447.
- Sancho J., Bota E. y de Castro J.J. 2002. *Introducción al Análisis Sensorial de los Alimentos*. Ed. Universitat de Barcelona, Barcelona, España, 334 pp.
- Semmar N. and Artaud J. 2015. A new simplex-based approach predicting olive oil blend compositions from fatty acid data. *Journal of Food Composition and Analysis* 43: 149-159.
- Seppanen C.M., Song Q. and Saari Csallany A. 2010. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87: 469-481.
- Shahidi F. and Zhong Y. 2005. *Lipid Oxidation: Measurement Methods*. En: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Shahidi, F., (eds.). John Wiley & Sons, Nueva Jersey,

- Estados Unidos, pp. 357-385.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Slatnar A., Mikulic-Petkovsek M., Stampar F., Veberic R., Solar A. 2015. Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Research International* 67: 255-263.
- Talbot G. 2016. The stability and shelf life of fats and oils. En: *The stability and shelf life of food*. Subramaniam, P., (ed.). Cambridge, Reino Unido, pp. 399-430.
- USDA. 2018. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient database for standard reference. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Activo en septiembre 2018.
- Vandamme J., Nikiforov A., De Roose M., Leys C., De Cooman L. and Van Durme J. 2016. Controlled accelerated oxidation of oleic acid using a DBD plasma: Determination of volatile oxidation compounds. *Food Research International* 79: 54-63.
- Vercellotti J.R., Angelo A.J.S., Spanier A.M. 1992. Lipid oxidation in foods. En: *Lipid Oxidation in Food*. St. Angelo, A. J., (ed.). Washington DC, Estados Unidos, pp. 1-11.
- Zwarts L., Savage G. and McNeil D.L. 1999. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 189-194.

# **CAPITULO II**

## **CONSERVACION DE LA CALIDAD QUIMICA Y SENSORIAL DE LAS NUECES RECUBIERTAS CON COBERTURAS COMESTIBLES**

### **INTRODUCCIÓN**

El nogal (*Juglans regia L.*) es un cultivo de importancia económica generando gran cantidad de mano de obra, especialmente para la industria de los agroalimentos (Martínez *et al.*, 2013). Como se mencionó previamente en el capítulo I, tanto la producción de nuez a nivel mundial, como a nivel nacional se ha incrementado en la última década, llegando a posicionarse como el fruto seco de mayor volumen productivo y a nivel de consumo en Argentina (Iannamico, 2015).

La nuez es un alimento nutritivo muy consumido alrededor del mundo, altamente apreciado por sus propiedades sensoriales y por los beneficios que aporta para la salud (Martínez *et al.*, 2011). Debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y el gran contenido lipídico que presentan los granos de nuez (52% a un 70%) (Zwarts *et al.*, 1999) han sido asociados a propiedades promotoras de la salud. Sin embargo, los ácidos grasos insaturados, limitan la vida útil de los alimentos con alto contenido lipídico debido a su susceptibilidad a la oxidación. Desde el punto de vista nutricional, la oxidación resulta en la pérdida de ácidos grasos esenciales, vitaminas, y en la generación de compuestos tóxicos (Salcedo *et al.*, 2010; Grosso *et al.*, 2017). Además, genera sabores indeseables, como el rancio, y/o cambios en el color que hacen que el producto no sea aceptable para el consumo (Jensen y Sørensen, 2001). Adicionalmente, la percepción de los consumidores es importante para definir la calidad de los productos alimenticios, como las nueces, que son valoradas por sus propiedades sensoriales. Por lo tanto, la oxidación lipídica de las mismas actúa deteriorando su calidad, debido a que pierden sus propiedades nutricionales, sensoriales y químicas, además, de su valor económico.

La estabilidad de un producto alimenticio está relacionada con la preservación de los parámetros de calidad a lo largo del almacenamiento y es un factor clave para la determinación de su vida útil que a su vez condiciona la logística de su distribución. Estudios previos han demostrado que la calidad de distintos tipos de alimentos puede ser preservada con la aplicación de una cubierta comestible (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005; Bravin *et al.*, 2006; Gayol *et al.*, 2009; Grosso *et al.*, 2017), mejorando así, la estabilidad del alimento. Este tipo de recubrimiento podría ser de gran utilidad en la conservación de los granos de nueces.

Como se explicó en el capítulo I, las cubiertas comestibles son un tipo de empaque activo y biodegradable que puede extender la vida útil de los alimentos (Riveros *et al.*, 2016) y que pueden ser elaboradas a partir de proteínas o carbohidratos comestibles de origen animal o vegetal (zeína, gluten, soja, maní, caseína, proteína del suero de la leche, etc.). Los derivados de la celulosa son considerados buenos agentes formadores de películas debido a su estructura lineal, que resultan en películas flexibles, resistentes, transparentes y sin olor. Este tipo de material es hidrofílico (Bourtoom, 2008; Pei *et al.*, 2013), sin embargo, el sustituyente que pueda tener va a determinar el grado de permeabilidad al vapor de agua. Generalmente las películas preparadas a partir de celulosa son resistentes a los aceites y a la mayoría de los solventes orgánicos no polares y se pueden emplear para controlar la difusión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. La metil-celulosa (MC) es una sustancia química, derivada de la celulosa, que no se encuentra en la naturaleza. Se obtiene a partir de la metilación del 30% de los grupos hidroxilo, los cuales son solubles en agua fría obteniéndose así una solución homogénea y cristalina con una consistencia gelatinosa inducida por procesos térmicos. Debido a que la MC es el derivado de glucosa menos hidrofílico, posee un alto potencial de inhibición de la penetración del oxígeno y del agua, resultando en un incremento en la resistencia química y microbiológica en comparación con otros derivados de la celulosa (Shahidi *et al.*, 1999). La carboximetil-celulosa (CMC), es un compuesto sintético derivado de la celulosa que demuestra propiedades adecuadas para la formación de films y cubiertas, con buena actividad de barrera contra el traspaso de lípidos y moléculas de oxígeno (Ghanbarzadeh y Almasi, 2011).

Otro de los biopolímeros utilizados para la elaboración de cubiertas comestibles son las proteínas. El proceso para la generación de una película a partir de este tipo de

biopolímero involucra la desnaturalización y formación de enlaces cruzados, que pueden ser covalentes, puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van del Waals, entre otras. Un incremento en la temperatura durante la elaboración propicia el establecimiento de enlaces disulfuro dentro películas proteicas (Guckian *et al.*, 2005), mientras que, las interacciones electrostáticas son favorecidas al trabajar con valores de pH alejados del punto isoeléctrico. El balance entre los diversos tipos de enlaces generados en la matriz de proteína se refleja en sus propiedades mecánicas y de barrera. Por lo tanto, las propiedades que van a tener dichas películas están fuertemente influenciadas por la concentración de proteína, temperatura de procesado, pH, fuerza iónica y composición del aislado proteico (Van Vliet *et al.*, 2004). En general, las películas de origen proteico son una barrera pobre frente a la humedad (Perez-Gago *et al.*, 2005; Montalvo *et al.*, 2012) pero son muy populares debido a sus propiedades de barrera contra aceites o grasas y compuestos volátiles, y su escasa permeabilidad de gases (Gontard *et al.*, 1992; Han y Krochta, 2007; Montalvo *et al.*, 2012). Las cubiertas comestibles elaboradas a partir de proteína del suero de la leche han demostrado ser efectivas contra el deterioro oxidativo en diversos alimentos, incluyendo las nueces (Mehyar *et al.*, 2012), debido a sus excelentes propiedades de barrera contra el oxígeno. Sin embargo, como cualquier material polimérico, este tipo de cobertura permite cierto grado de permeabilidad que eventualmente produce rancidez en los alimentos (Seacheol y Krochta, 2007).

Las cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa, metil-celulosa y proteína del suero de la leche pueden cumplir un rol importante en la calidad, seguridad, transporte, almacenamiento y buena apariencia en un rango amplio de alimentos (Huber y Embuscado, 2009). Estas, pueden actuar previniendo la incorporación de humedad y difusión de oxígeno. Por consiguiente, pueden ser utilizadas como una estrategia para incrementar la vida útil de los granos de nueces, al mejorar la estabilidad de sus lípidos (Boskou y Elmadfa 2011). Sin embargo, se desconoce el efecto de dichas cubiertas comestibles sobre la estabilidad química y sensorial dichos granos a lo largo del almacenamiento y el efecto de su aplicación sobre la percepción de sus atributos sensoriales.

El *objetivo general* del presente Capítulo fue analizar los cambios en la calidad química y sensorial de nueces con cubiertas comestibles (carboximetil-celulosa, metil-

celulosa y proteína del suero de la leche) y nueces no recubiertas, a lo largo de un almacenamiento de 210 días, en condiciones de temperatura ambiente y evaluar el impacto sensorial de la aplicación de dichas cubiertas sobre la percepción de los consumidores.

Los *objetivos específicos* fueron:

1. Determinar la composición química general y el perfil de ácidos grasos en los granos de nueces con la finalidad de conocer la calidad de la materia prima a utilizar en esta investigación.
2. Desarrollar el proceso de recubrimiento de nueces aplicando distintos tipos de materiales que actuarán como películas comestibles.
3. Evaluar el efecto sobre las propiedades sensoriales que produce la aplicación de las cubiertas comestibles sobre la nuez mediante pruebas afectivas y descriptivas.
4. Realizar un estudio de almacenaje de los productos recubiertos para evaluar el efecto protector de las diferentes cubiertas midiendo cambios en indicadores químicos y de las intensidades de atributos sensoriales.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

Nueces de tipo mariposa sin cascara de la variedad Chandler, cosechadas en el año 2014, provistas por Nogales SRL, La Rioja, Argentina.

## MÉTODOS

### Composición química

**Contenido de humedad.** La humedad se determinó utilizando el método 27.500 (AOAC, 2010). Se pesaron 2 g de nueces molidas y colocaron en estufa de circulación forzada (Garmont, Argentina) a 130 °C durante 2 hs, para su secado. El porcentaje de humedad se determinó por diferencia de peso, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{g muestra húmeda} - \text{g muestra seca}) / ((\text{g muestra húmeda})) \times 100$$

(ec. 2.1.)

**Proteínas.** Se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldahl en 0,5 g de muestra. Para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteínas se utilizó el factor 5,3 (AOAC, 2010) usado para frutos secos con la excepción de maní y almendras.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{Vg} \times \text{N} \times 1,4}{\text{g muestra}} \times 5,3$$

(ec. 2.2.)

donde: Vg es el volumen gastado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
N es la Normalidad de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Cenizas.** Se pesaron aproximadamente 0,5 g de nuez molida y se incineraron en horno mufla a 550 °C durante 6 h. El porcentaje de cenizas se determinó por la diferencia de peso antes y después de la incineración (AOAC, 2010) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = (\text{g después de la incineración})/(\text{g antes de la incineración}) \times 100$$

(ec. 2.3.)

**Materia grasa.** Se realizó mediante extracción sólido-líquido utilizando equipo *Soxhlet*, con n-hexano como solvente, durante 12 horas. La materia grasa se calculó por diferencia de peso de las muestras antes y después de la extracción (AOAC, 2010), según la fórmula:

$$\% \text{ Aceite} = (\text{g aceite})/(\text{g muestra}) \times 100$$

(ec. 2.4.)

**Hidratos de carbono.** El contenido de hidratos de carbono totales de la muestra se calculó en forma teórica mediante la siguiente fórmula (Gayol *et al.*, 2013):

$$\% \text{ Hidratos de carbono} = 100 - \% \text{ lípidos} - \% \text{ proteínas} - \% \text{ fibra cruda} - \% \text{ cenizas}$$

(ec. 2.5.)

**Composición de ácidos grasos.** A partir del aceite de la nuez se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAGs) por transmetilación con una solución de ácido sulfúrico en metanol (30 g/L) previa saponificación con KOH 0,5 N en metanol. Los EMAGs se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 (Waltham, Massachusetts, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se usó una columna capilar TG-WAXMS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm espesor; C#24156, Supelco). El gas portador fue nitrógeno (1 mL/min) y se empleó el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial 180 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta 240 °C (10 min). La separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó de

acuerdo con (Martín *et al.*, 2016). El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual con relación al contenido total de los mismos (porcentaje relativo).

## **Preparación de las cubiertas comestibles**

**-Cobertura de carboximetil-celulosa (CMC).** Se preparó una solución de CMC pesando 0,5 gramos del carbohidrato por cada 97,6 mL de agua destilada y se homogeneizó en agitador magnético hasta su completa disolución. Luego, se adicionaron 1,9 gramos de glicerol como plastificante (Wambura *et al.*, 2008; Riveros *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2017).

**-Cobertura de metil-celulosa (MC).** Se preparó una solución de MC, pesando 2 gramos por cada 96,1 mL de agua destilada y se homogeneizó en agitador magnético hasta su completa disolución. Se adicionaron 1,9 gramos de glicerol como plastificante (Riveros *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2017)

**-Cobertura a base de aislado de proteína del suero de la leche (PS).** Se preparó una solución de PS pesando 11 gramos del aislado proteico y se homogeneizó en agitador magnético hasta su completa disolución en 78 mL de agua destilada. Luego se adicionaron 11 gramos de glicerol a la solución (Seacheol y Krochta, 2007; Wambura *et al.*, 2008; Grosso *et al.*, 2017). Luego se la dejó reposar por 30 minutos en baño maría a 90 °C. Una vez finalizado, se agitó nuevamente para homogeneizar la solución.

Se colocaron 1000 mL de la solución de cobertura correspondiente (CMC, MC, y PS) en recipientes de 2 L. En cada uno de estos recipientes con las soluciones, se sumergieron 500 g de nueces “mariposa” (1:2 p/v) por 5 minutos. Posteriormente, fueron removidas y colocadas en un colador por 5 minutos para lograr que se filtre el excedente de solución. Finalmente, las nueces recubiertas fueron colocadas sobre un enrejado bajo una campana extractora encendida a temperatura ambiente ( $23\pm 1$  °C), por 24 horas para remover el exceso de humedad. Se obtuvieron cuatro tratamientos: nuez sin cobertura que corresponde a la muestra control (NC), y nueces recubiertas con CMC (NMC), MC (NMC), y PS (NPS). Posteriormente, se realizó la medición del contenido de humedad de

dichas muestras, para conocer si sufrieron cambios con respecto a la muestra control, por la adición de la cobertura.

## **Estudio de almacenamiento**

Los tratamientos obtenidos luego del proceso de recubrimiento (NC, NCMC, NMC, y NPS), fueron almacenados en contenedores plásticos de 15 x 25 x 5 cm (Tupperware, Buenos Aires, Argentina) a temperatura ambiente ( $23\pm 2$  °C) y bajo condiciones normales atmosféricas (20-21% O<sub>2</sub>; 60-70% humedad relativa) por 210 días. Las muestras fueron extraídas cada 0, 35, 70, 105, 140, 175 y 210 días de almacenamiento para sus análisis fisicoquímicos y sensoriales.

## **Indicadores de oxidación lipídica**

### **Análisis químicos**

Para realizar los análisis químicos y físicos fue necesario extraer el aceite de las muestras. Esto fue realizado mediante prensado en frío, usando la prensa hidráulica de 20 toneladas (HE-DU, Hermes I. Dupraz S.R.L., Córdoba, Argentina).

**Índice de peróxidos (IP).** Se determinó de acuerdo con AOAC (2010). Se pesaron  $5\pm 0,05$  g de aceite de cada muestra de nuez en un erlenmeyer de 250 mL y se disolvieron en 30 mL de solución ácido acético/cloroformo 3:2 (v/v). Posteriormente se agregaron 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio, se agitó vigorosamente y se dejó reposar en oscuridad durante 1 min. Luego se agregaron 30 mL de agua destilada y 0,5 mL de almidón al 1% (p/v) que fue utilizado como indicador del punto final. El yodo formado se tituló con tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,1 N. El IP fue expresado como miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite de nuez (meqO<sub>2</sub>/kg) y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IP = (S \times N \times 1000) / g$$

(ec. 2.6.)

donde: S es el volumen de solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> consumido en la titulación.  
N es la normalidad de la solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Dienos (DC) y trienos conjugados (TC).** Estos parámetros químicos se midieron de acuerdo a lo establecido por COI (2001), para ello se pesaron 0,0175±0,0025 g de aceite de nuez y se disolvieron en 6 mL de n-hexano grado A.C.S. Posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Spectrum SP-2100, Zhejiang, China) a 232 nm para DC y a 268 nm para TC. Se utilizó n-hexano como blanco. El resultado obtenido se expresó como coeficiente de extinción molar E (1%, 1 cm) y se calculó según la siguiente fórmula:

$$E(1\%,1 \text{ cm}) = ((A \text{ (dienos o trienos)} \times 6) / \text{dilución}) / (m \times 100) \text{ muestra}$$

(ec. 2.7)

donde: A (dienos o trienos) es la absorbancia de la solución diluida.

m es el peso del aceite en gramos.

dilución: (mL solución original aceite-hexano)/(mL solución original a-h + mL n-hexano agregado).

**Contenido de carotenoides (CC).** El contenido de carotenoides se analizó de acuerdo con el procedimiento establecido por (Minguez-Mosquera *et al.*, 1991). Se pesaron 7.5 g de aceite en un tubo Falcon y luego se rellenó hasta llegar a los 25 mL de n-hexano. Luego se midió la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de 470 nm, usando n-hexano puro como blanco. La concentración de carotenoides se expresó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenoides (mg/kg)} = (\text{Abs } 470 \times 106) / (2000 \times 100 \times \text{densidad})$$

(ec 2.8.)

## Análisis físico

**Colorimetría.** El color fue medido usando un colorímetro CM-508d Minolta (Ramsey, NJ, USA) con una fuente de luz incorporada. Las mediciones se realizaron según

el método 14-22 (AACC, 2000) utilizando 8 mm de apertura de la medición y un iluminador D65. Los resultados fueron expresados con el sistema CIELab (L\*: luminosidad, a\*: rojo-verde y b\*: amarillo-azul) que define cada color a partir de tres coordenadas denominadas L\*, a\* y b\*. Las medidas de color de las muestras de aceite de nuez se realizaron usando un fondo blanco. Cada muestra se evaluó en 5 posiciones distintas y las mediciones se llevaron a cabo en 3 períodos de tiempo: día 0, 105 y 210.

## **Análisis de compuestos volátiles**

Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-MS). Dicho análisis, sobre las muestras de nueces, se llevó a cabo mediante la técnica micro extracción en fase sólida (HS-SPME). Para ese fin se utilizó una fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) 50/30  $\mu\text{m}$ , StableFlex, de 1 cm de largo (Supelco). Para el procedimiento se usaron las muestras de nueces “mariposa” que fueron molidas y pesadas (2 g) y luego colocadas en viales de vidrio (5 mL) sellados herméticamente. En esos viales, las muestras fueron expuestas a una temperatura de 70 °C por 20 min (tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio de gases). Luego, la fibra se insertó en el vial y se dejó expuesta en el “espacio de cabeza” del vial por 10 minutos (tiempo de exposición). Finalmente, fue inyectada en un CG-MS Perkin Elmer Clarus 600 acoplado a un detector de masas con trampa de iones. La columna utilizada para separar los compuestos fue la ELITE 5MS (30 \* 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  espesor de film; Perkin Elmer). El programa de temperaturas de la columna fue de 50 °C por 10 min hasta alcanzar los 280 °C con una rampa de 4 °C/min. Se utilizó helio, como gas portador, a un flujo de 1 mL/min. La ionización para el análisis de masa se realizó por impacto electrónico a 70 eV. La temperatura del inyector fue de 250 °C y el tiempo para la desorción de la fibra fue de 10 min en el modo *splitless* (1,5 min sin división del período).

La identificación de los compuestos volátiles fue realizada en modo de barrido completo (m/z 40–550) mediante una combinación de la librería de espectro de masas NIST y los tiempos de retención de estándares. En el caso donde los estándares no estuvieron disponibles, los volátiles se identificaron tentativamente usando el espectro del

CG/MS solamente. La cuantificación de los picos se realizó en función de la respuesta del detector de masa (cuentas electrónicas; c.e.) por gramo de muestra (nuez molida) (Quiroga *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2016). Las respuestas de cada uno de los compuestos fueron monitoreadas y comparadas entre tratamientos y entre distintos periodos de tiempo.

## **Análisis sensorial**

Se llevaron a cabo 2 tipos de métodos; el análisis sensorial descriptivo y el de aceptabilidad. El objetivo del análisis descriptivo es realizar una determinación cualitativa y cuantitativa de atributos sensoriales que permita establecer las bases para la detección de similitudes y diferencias sobre un alimento. Además, los resultados permiten que el investigador encuentre relaciones directas entre la incorporación de ingredientes específicos, como aquellos componentes de las cubiertas, y la ocurrencia de determinados cambios en los atributos sensoriales (Stone y Sidel, 2004).

La aceptabilidad es una prueba afectiva que muestra el grado de gusto de los consumidores sobre un producto. Esta información es muy necesaria a la hora de tomar la decisión de inversión en equipo, producción y distribución de un producto por parte de las empresas.

## **Análisis descriptivo**

La evaluación sensorial se llevó a cabo en el laboratorio sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Ciencias Exactas-Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). El panel de jueces entrenados estuvo compuesto por ocho panelistas (5 mujeres y 3 hombres). Todos los panelistas tenían al menos 4 años de experiencia evaluando frutos secos o granos oleaginosos (girasol, almendras, maní, etc.) y demostraron poseer buenos niveles de percepción olfativa y gustativa.

Para poder seleccionar a los panelistas, se llevó a cabo un proceso que incluyó: un cuestionario sobre sabor y textura, un *test* para determinar nivel de agudeza para la descripción y detección de diferencias en distintos productos; pruebas con puntajes

evaluando atributos de sabor y textura y, finalmente, una entrevista personal. A lo largo de este proceso, los panelistas fueron seleccionados según los siguientes criterios; a) personas con dentición natural, b) ausencia de alguna alergia hacia los alimentos, c) no fumadores, d) con una edad dentro de los límites 18-64 años, e) habituadas al consumo de nueces o de sus subproductos al menos una vez al mes f) personas que se encontraran disponibles para todas las sesiones, g) interesadas en participar y h) que fueran capaces de comunicar verbalmente la percepción de los atributos del producto (Grosso y Resurreccion, 2002; Riveros *et al.*, 2013). Luego del proceso de selección, el entrenador del panel los hizo participar de pruebas triangulares con maní: saborizados/sin saborizar, tostados/fritos y otros *tests* en los cuales los panelistas tenían que analizar distintos frutos secos: avellanas, almendras, maní y nueces. Los panelistas seleccionados, también, tuvieron que demostrar un puntaje perfecto en un *test* de sensibilidad del sabor y la habilidad para identificar al menos 5 de 7 sabores comúnmente encontrados en los alimentos (Nepote *et al.*, 2009). El último de paso del proceso de selección consistió en una entrevista personal llevada a cabo por el líder del panel con el objetivo de determinar si cada uno de los panelistas seleccionados eran personas comprometidas con el análisis y verificar que entendieran los objetivos del entrenamiento y evaluación sensorial (Meilgaard *et al.*, 2006).

Luego de la selección, los panelistas resultantes fueron entrenados y calibrados. El entrenamiento se realizó en 5 sesiones de 2 horas cada una. Un análisis descriptivo híbrido entre Quantitative Descriptive Analysis (Tragon Corp., Redwood City, Calif., U.S.A.) y Spectrum <sup>TM</sup> Analysis Methods (Sensory Spectrum, Inc., Chatham, N.J., U.S.A.) fue utilizado para el entrenamiento y sesiones de evaluación utilizando una escala lineal no estructurada de 150 mm. Los panelistas, durante las sesiones de entrenamiento, desarrollaron una lista de atributos a medir, se prepararon definiciones para cada uno de los atributos, determinaron los valores de intensidad de las referencias y también los valores de intensidad de una referencia *warm-up* (**Tabla 2.1.**) (Plemmons y Resurreccion, 1998; Grosso y Resurreccion, 2002).

**Tabla 2.1.** Atributos, definiciones, intensidades de referencia y “warm-up” usados en el análisis descriptivo de muestras de nuez.

Atributo <sup>a</sup>	Definición	Referencia	Intensidad de la referencia <sup>b</sup>	Intensidad del <i>warm up</i> <sup>b</sup>
<b>Apariencia</b>				
Intensidad de color	La intensidad del color marrón; desde marrón claro a marrón oscuro	Almendras <sup>c</sup>	80	51
		Café <sup>d</sup>	110	
Rugosidad	Apariencia asociada con una superficie irregular, despereja.	Almendras <sup>c</sup>	30	88
		Copos de maíz <sup>e</sup>	100	
Brillo	Apariencia asociada a la cantidad de luz reflejada por la superficie.	Porotos <sup>f</sup>	30	29
<b>Sabor</b>				
Sabor a nuez	Sabor y aroma asociado al sabor característico de la nuez.			80
Oxidado	Sabor y aroma asociado a una grasa/aceite rancio o viejo.	Tostadas con aceite de nuez oxidado <sup>g</sup>	40	0
Cartón	Sabor y aroma asociado a cartón húmedo	Cartón húmedo	30	15
<b>Gusto</b>				
Dulce	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución con sacarosa.	Sol. de glucosa 20 g kg <sup>-1</sup>	20	12
		Sol. de glucosa 50 g kg <sup>-1</sup>	50	
		Sol. de glucosa 100 g kg <sup>-1</sup>	100	
Salado	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución salada como la de cloruro de sodio.	Sol. de NaCl 2 g kg <sup>-1</sup>	25	5
		Sol. de NaCl 3,5 g kg <sup>-1</sup>	50	
		Sol. de NaCl 5 g kg <sup>-1</sup>	85	
Amargo	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.	Sol. de cafeína 0.5 g kg <sup>-1</sup>	20	23
		Sol. de cafeína 0.8 g kg <sup>-1</sup>	50	
		Sol. de cafeína 1.5 g kg <sup>-1</sup>	100	
Acido	El gusto percibido en la lengua asociado a un agente ácido como el ácido cítrico.	Sol. de ácido cítrico 0.5 g kg <sup>-1</sup>	20	9
		Sol. de ácido cítrico 0.8 g kg <sup>-1</sup>	50	
		Sol. de ácido cítrico 1.5 g kg <sup>-1</sup>	100	
<b>Factores de sensación</b>				
Astringencia	Sensación de sequedad en boca y lengua	4 g de te <sup>h</sup> en 250 ml de agua a 90 °C	59	50
<b>Textura</b>				
Crujiente	Magnitud de sonido generado al masticar con los molares	Copos de maíz	120	56
Dureza	Fuerza necesaria para comprimir un alimento entre los dientes molares.	Almendras	65	36

<sup>a</sup> Atributos listados en orden de percepción por los panelistas.

<sup>b</sup> Las intensidades de los atributos se basan en una escala lineal no estructurada de 0-150 mm

<sup>c</sup> Almendras, Grandiet, Córdoba, Argentina.

<sup>d</sup> Café, Nescafé © Clásico, Nestlé Argentina S.A. Buenos. Aires, Argentina.

<sup>e</sup> Copos de maíz, “3 Arroyos”, Buenos Aires, Argentina.

<sup>f</sup> Porotos, “Egran”, Córdoba, Argentina.

<sup>g</sup> Tostadas con aceite de nuez oxidado: Se utilizó Pan lactal "Fargo", cada rebanada fue cortada en 9 partes iguales que fueron humedecidas con 2 ml de aceite de nuez oxidado.

<sup>h</sup> Té clásico “Green Hills”.

El *warm-up* es una referencia similar a los productos evaluados (nuez) que se les provee a los panelistas antes de los análisis sensoriales y es normalmente utilizada en este análisis para lograr resultados más confiables dado que previo a cada evaluación los jueces refrescan los valores de intensidad de cada atributo utilizando esta muestra (Plemmons y Resurreccion, 1998). En los análisis descriptivos el *warm-up* es normalmente la muestra control. Para este análisis se utilizó como *warm-up* una muestra de nueces sin almacenamiento equivalente a la muestra control. Para conservarla fresca en su estado original durante los distintos períodos de evaluación, se la conservo en bolsas de alta barrera en el freezer, y se retiraba del freezer 2 horas antes de su evaluación.

Una vez finalizado el entrenamiento, las muestras fueron evaluadas por los panelistas en boxes separados en el laboratorio sensorial, bajo luz fluorescente y a temperatura ambiente. 5 unidades de cada muestra (nueces mariposa) fueron provistas a cada panelista, contenidas en vasos de Telgopor con tapas y codificadas con números de 3 dígitos al azar. Galletas de agua sin sal (Traviata, Bagley, Buenos Aires, Argentina) y agua mineral fueron usados entre muestras para limpiar los sabores. Los panelistas evaluaron las 12 muestras (4 tratamientos por triplicado) de cada periodo de tiempo y la muestra de *warm-up* en un día de evaluación. Cada una de las evaluaciones fue dividida en 2 sesiones de 2 horas (2 horas a la mañana y 2 a la tarde). Antes de cada evaluación, los panelistas volvieron a probar todas las referencias y la muestra *warm-up*.

La lista final de las intensidades del *warm-up*, las referencias y las definiciones de los atributos evaluados, fueron colgadas en los boxes en cada una de las sesiones de evaluación. Los resultados la evaluación de cada panelista fueron recopilados en hojas de papel.

### **Prueba afectiva de aceptabilidad**

La aceptabilidad se llevó a cabo utilizando nueces frescas, sin almacenamiento, de los tratamientos NC, NCMC, NMC y NPS, con el objetivo de determinar si el sabor del producto alimenticio era afectado por la aplicación de la cubierta y si los consumidores podían detectar este cambio.

Los jueces consumidores (n = 90) utilizados para el análisis de aceptabilidad, fueron personas de la ciudad de Córdoba (Argentina), reclutados de acuerdo con los siguientes criterios: a) edad entre 18 y 65, b) no fumadores, c) sin alergias alimentarias, y d) personas que consuman nueces o subproductos de la misma. Se sirvieron dos nueces frescas (día 0) de cada tratamiento (NC, NMC, NCMC y NPS) dentro de pirotines que fueron presentadas a los evaluadores en un orden al azar sobre bandeja plástica con un vaso de agua. Los panelistas fueron instruidos que consuman la muestra completa y que enjuaguen sus bocas con el agua entre muestras, para minimizar cualquier efecto residual. Para la puntuación se utilizó una escala hedónica de nueve puntos; siendo 1 = me disgusta extremadamente y 9 = me gusta extremadamente (Grosso y Resurreccion, 2002; Asensio *et al.*, 2013).

## **Diseño experimental**

El diseño experimental consistió en 4 tratamientos (NC, NCMC, NMC y NPS) x 3 réplicas x 11 variables físico-químicas (índice de peróxido contenido de carotenoides, dienos y trienos conjugados, 4 compuestos volátiles y 3 parámetros de color) x 12 atributos sensoriales (intensidad de color, dureza, brillo, sabor nuez, oxidado, cartón, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza) x 7 periodos de tiempo.

## **Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron en tres repeticiones. Los datos fueron analizados utilizando el software InfoStat 2016p (InfoStat, 2016). Se calcularon medias y desvíos estándar. Se realizó análisis de la varianza bifactorial (factores: 'tratamiento' y 'tiempo') sobre los datos de los análisis físicoquímicos y de los compuestos volátiles, usando DGC para detectar las diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ). Adicionalmente, se realizó un análisis de clúster para obtener grupos de tratamientos de nueces con características similares. Las similitudes entre muestras fueron calculadas usando la distancia de Euclidea y los tratamientos con características similares fueron agrupados usando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method).

Para el análisis de los **atributos sensoriales**, se realizó un diseño en bloque que consistió en 4 tratamientos (NC, NCMC, NMC y NPS), siete días de almacenamiento, y tres repeticiones. La evaluación se analizó en bloques según panelista para disminuir la variabilidad e incrementar la sensibilidad del estudio (Meilgaard *et al.*, 2006; Larrauri *et al.*, 2013). Las medias y desvíos estándar fueron calculados para cada atributo mediante un ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) y se aplicó DGC para encontrar las diferencias significativas entre medias de las muestras en el mismo período de almacenamiento y entre períodos distintos. Se realizó un análisis de regresión simple para cada atributo a lo largo del almacenamiento. Para el análisis de aceptabilidad se calcularon las medias y desvíos estándar utilizando ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) y prueba DGC para comparar las medias (Asensio *et al.*, 2013).

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) incluyendo las variables fisicoquímicas, de compuestos volátiles y sensoriales, con el objetivo de explorar la asociación entre tratamientos y variables. También, se obtuvieron los coeficientes de Pearson para confirmar y establecer las correlaciones entre las variables dependientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición química

En la **Tabla 2.2.** se muestra la composición química proximal de la nuez que, posteriormente, fue utilizada para la aplicación de las cubiertas comestibles. El conocimiento de la composición química, incluyendo la composición de ácidos grasos, permite entender las características de calidad de la materia prima que se va a utilizar en el experimento. La composición química proximal presentó valores similares a aquellos encontrados en estudios previos (Sze-Tao y Sathe, 2000; Pereira *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2013). El componente que se encontró en menor proporción fueron las cenizas que coincidieron por lo presentado por Chung *et al.* (2013), evaluado en nueces comercializadas en Corea. En cuanto a la humedad, presentó valores muy semejantes a los encontrados por Pereira *et al.* (2008) en distintos cultivares, que variaron de 3,85 a 4,50%. Adicionalmente, los valores de proteína (16%) también fueron muy parecidos al descrito por este autor, dado que variaron de 14,38 a 18,03% en sus muestras. Un valor, aún más similar (16,66% en base seca), fue encontrado en la mezcla de variedades de nueces estudiadas por Sze-Tao y Sathe (2000), las cuales fueron provistas por Diamond Walnut Growers, CA. En cuanto al contenido de lípidos, la muestra analizada mostró valores inferiores (64,06%) a aquellos encontrados por Pereira *et al.* (2008), pero coincidente con el observado por Sze-Tao y Sathe (2000), que reportaron un valor de 66,9%. Finalmente, los porcentajes de hidratos de carbono (18,19%) obtenidos fueron semejantes a los encontrados por Sze-Tao y Sathe (2000) (15,93% en base seca).

**Tabla 2.2.** Composición química proximal de los granos de nueces correspondiente a este estudio.

Composición	Porcentajes (g/100g)	
	En base húmeda	En base seca
Humedad	4,44±0,37	
Lípidos	64,06±0,25	66,91±0,26
Proteína	16,00±0,02	16,78±0,03
Ceniza	1,74±0,06	1,86±0,06
Hidratos de carbono	18,19±0,24	14,45±0,31

\*Medias± desvíos estándar (n = 3).

Con respecto a la composición de ácidos grasos Sze-Tao y Sathe (2000), encontraron valores muy similares en el aceite de nuez crudo, a los descritos en este estudio (**Tabla 2.3.**). Estos autores encontraron un 7,11% de ácido palmítico, 2,22% de esteárico, 15,65% de oleico, 61,21% de linoleico y 13,81% de linolénico. Sin embargo, a diferencia de este trabajo, estos autores no reportaron la presencia de los ácidos palmitoleico y gadoleico. Martínez *et al.* (2013) también encontró una composición de ácidos grasos coincidente con aquella aquí informada, en nueces de la variedad Franquette, donde también se pudo apreciar la presencia de ácido palmitoleico. Sin embargo, este aceite presentó diferencias en las composiciones del ácido oleico y linoleico (22,92 y 52,42%, respectivamente). Estas diferencias pueden deberse a los procesos oxidativos de los aceites, ya que, con el deterioro, disminuyen las proporciones de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linoleico), lo que conlleva a un aumento del resto (Martín *et al.*, 2016).

Con respecto al análisis de humedad realizado sobre las muestras recubiertas, los resultados obtenidos en los tratamientos fueron los siguientes: humedad final (%) en NC  $4,05 \pm 0,06$ ; NCMC  $4,52 \pm 0,14$ ; NMC  $5,94 \pm 0,07$ ; y en NPS  $4,24 \pm 0,04$ . Esto indica que los tratamientos recubiertos presentaron un mayor porcentaje final de humedad en comparación con el tratamiento control, sin embargo, el tratamiento NMC adquirió una humedad considerablemente superior al resto.

**Tabla 2.3.** Composición de los ácidos grasos (% relativo) presentes en las muestras de nueces.

Nutriente	Valor en g para 100 g	
	Muestra	Denominación
Ácidos grasos saturados	$8,56 \pm 0,70$	
16:0	$6,39 \pm 0,59$	Ácido Palmítico
18:0	$2,17 \pm 0,14$	Ácido Esteárico
Ácidos grasos monoinsaturados	$16,64 \pm 0,47$	
16:1	$0,1 \pm 0,01$	Ácido Palmitoleico
18:1	$16,19 \pm 0,52$	Ácido Oleico
20:1	$0,35 \pm 0,04$	Ácido Gadoleico
Ácidos grasos poliinsaturados	$74,83 \pm 0,35$	
18:2	$60,05 \pm 0,61$	Ácido Linoleico
18:3	$14,78 \pm 0,71$	Ácido Linolénico

## Estudio de Almacenaje

### Análisis químicos

Los cambios en el IP, DC, TC y CC, de las nueces control (NC) y las muestras de nueces recubiertas (NCMC, NMC, NPS), están ilustrados en la **Fig. 2.1**.

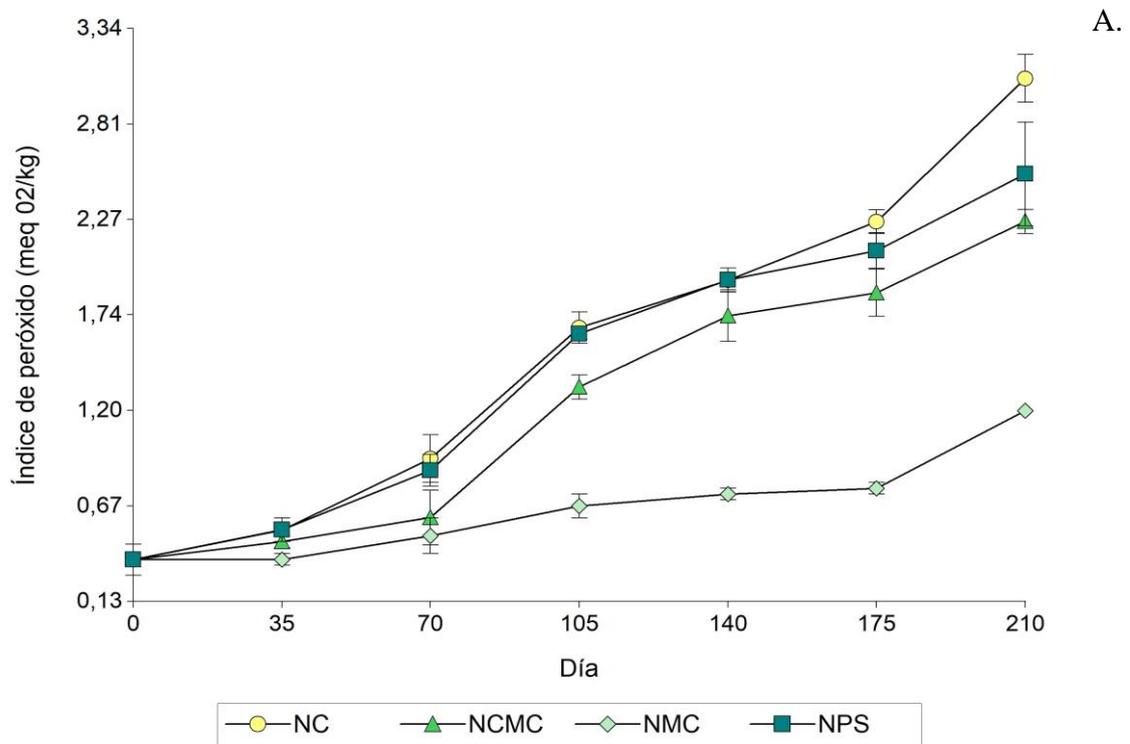
En general, la formación de peróxidos procede de manera lenta a lo largo de las primeras fases de la oxidación, pero a medida que avanza el proceso de deterioro, los mismos productos de oxidación que se forman actúan como un catalizador en el avance de las reacciones (Moslehi *et al.*, 2015). En este estudio, el IP se incrementó para todos los tratamientos a lo largo del almacenamiento. Este aumento fue superior en la muestra control (NC) y marcadamente inferior en la muestra NMC (**Fig. 2.1.a.**). El valor de IP en primer día de medición (día 0) fue 0,37 meqO<sub>2</sub>/kg, y no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). En el punto intermedio del período de almacenamiento (día 105), comenzaron a aparecer diferencias en las medias entre tratamientos. En este punto, NMC presentó el valor más bajo para este indicador (0,67 meqO<sub>2</sub>/kg). En el último día de medición (día 210), todos los tratamientos presentaron diferencias significativas para esta variable. NMC exhibió el valor más bajo (1,20 meqO<sub>2</sub>/kg), y fue seguido por NCMC (2,26 meqO<sub>2</sub>/kg), y luego por NPS (2,53 meqO<sub>2</sub>/kg). NC experimentó el IP más alto en este período (3,06 meqO<sub>2</sub>/kg). Estos resultados demostraron que la aplicación de las cubiertas de CMC, MC y PS sobre las nueces, generaron un efecto protector en el alimento contra la oxidación lipídica durante el almacenamiento. Con respecto a este indicador, la cobertura que tuvo el mayor efecto protector fue la MC, lo que indica que ejerció una mejor propiedad de barrera disminuyendo el proceso de oxidación los granos de nueces. La MC es un polisacárido flexible y transparente que algunos han reportado que tiene una fuerza moderada, resistencia a la migración de aceite y grasas y actúa como una barrera moderada contra la humedad y el oxígeno (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005). Moslehi *et al.* (2015) también, pudo comprobar el efecto protector de una cobertura elaborada en base a MC en muestras de pistacho, luego de 4 meses de almacenamiento, al lograr un menor incremento del IP. En otro estudio, el máximo valor de IP ocurrió en nueces sin cobertura, en comparación con aquellas recubiertas con quitosano (polisacárido) y extracto de té verde,

las cuales, presentaron un valor significativamente más bajo ( $p < 0,05$ ) luego de 18 semanas de almacenamiento (Sabaghi *et al.*, 2015). Otros trabajos han demostrado que las cubiertas de CMC también proveen una protección significativa contra el deterioro lipídico en alimentos como almendras (Larrauri *et al.*, 2016) y maníes tostados (Riveros *et al.*, 2013).

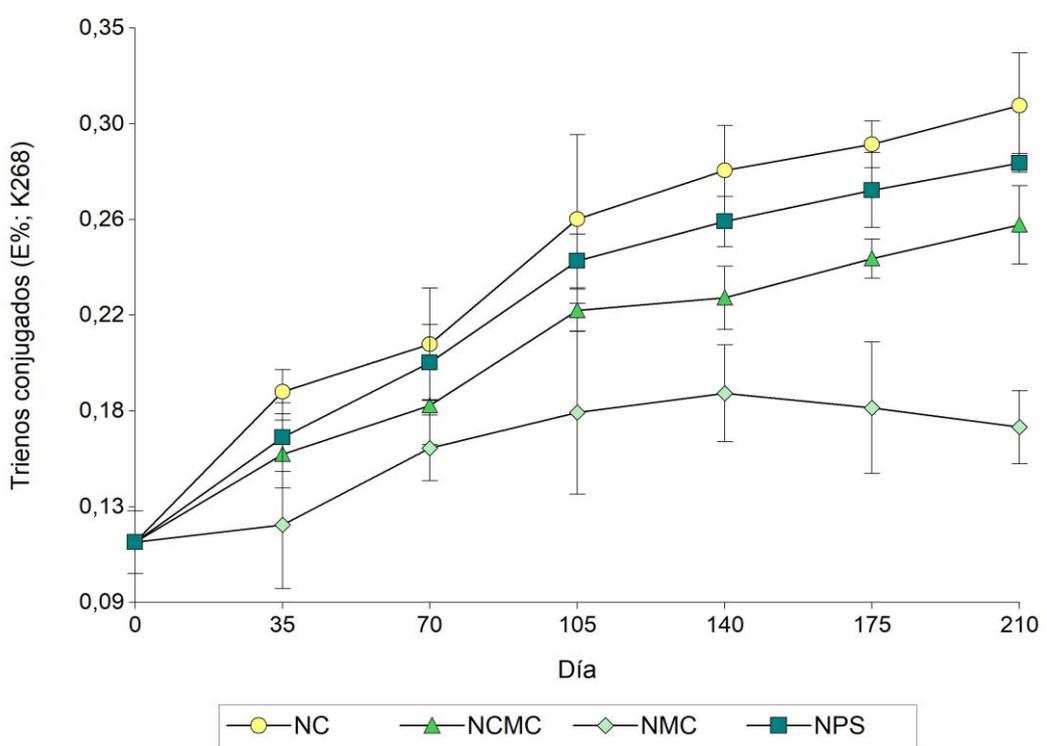
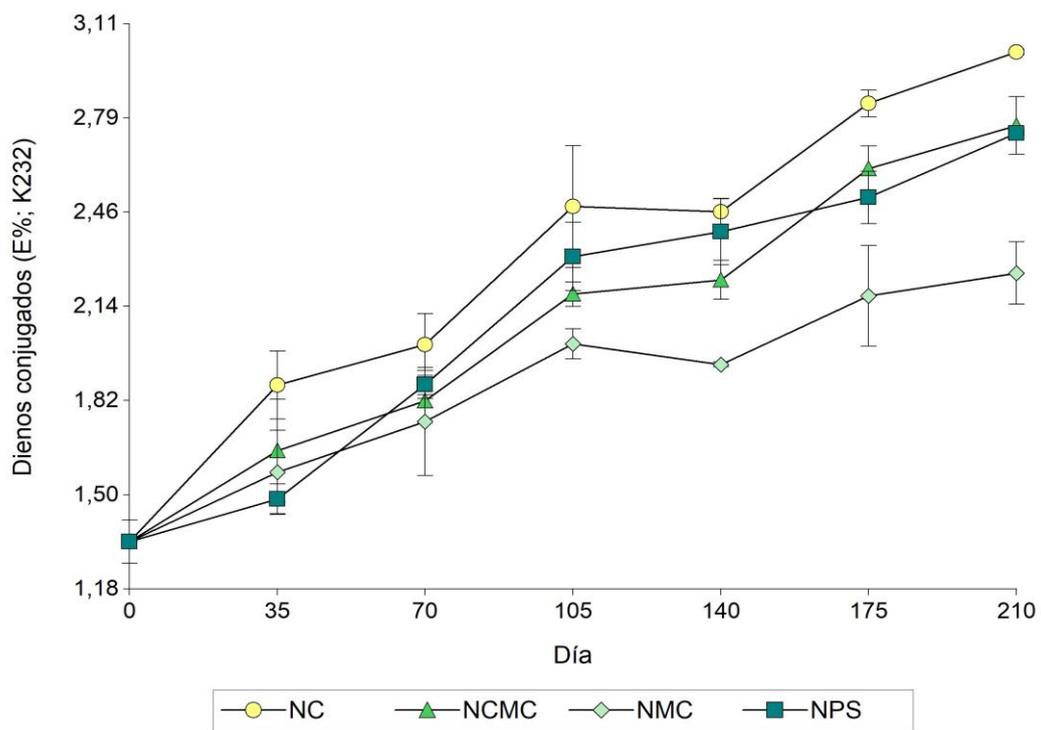
El coeficiente extinción K232 está relacionado con la formación de hidroperóxidos, dienos conjugados (DC) y compuestos carboxílicos, mientras que K268 refleja la concentración de productos de oxidación secundaria (TC) como consecuencia de la oxidación de los compuestos detectados en K232 (Ancin Azpilicueta y Martínez Remírez, 1991; Asensio *et al.*, 2011). Las muestras de nueces exhibieron un incremento de ambos indicadores durante el período de almacenamiento. Para ambos indicadores, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras ( $p > 0,05$ ) en el primer día de medición (día 0), encontrando valores de 0,34 para dienos (**Fig. 2.1.b.**) y de 0,12 para trieno (**Fig. 2.1.c.**). Las diferencias comenzaron a hacerse visibles en los períodos siguientes de medición. En el último día de almacenamiento (210 días), NMC exhibió los valores más bajos de K232 y K268 (2,26 y 0,17, respectivamente), mientras que, NC los valores más altos ( $p < 0,001$ ) (3,01 y 0,31, respectivamente). Nuevamente, MC actuó como una barrera eficaz entre las nueces y la atmosfera circundante, previniendo el intercambio gaseoso, y como consecuencia disminuyendo el deterioro oxidativo de los lípidos. En pistachos (Moslehi *et al.*, 2015) y paltas (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005) recubiertas, encontraron que MC actuó reduciendo las pérdidas de humedad y los niveles de respiración. Otros estudios también encontraron valores bajos de K232 en alimentos que fueron protegidos con cubiertas comestibles. Riveros *et al.* (2013) reportó que maníes con CMC exhibieron valores más bajos de DC luego de 56 días de almacenamiento, y fue seguido por las muestras recubiertas con MC. Riveros *et al.* (2016) también, describió que las semillas de girasol sin cobertura presentaron valores más altos de DC comparadas con aquellas recubiertas películas comestibles.

Los carotenoides son compuestos que juegan un rol esencial en la estabilidad oxidativa de las nueces, ya que pueden comportarse como antioxidantes (Özrenk *et al.*, 2012) siendo esta acción su principal cause de perdida por el deterioro oxidativo (Dias *et al.*, 2014). En este estudio se observó que el contenido de carotenoides de las muestras

disminuyó a lo largo del almacenamiento, aunque las diferencias significativas en los valores se comenzaron a detectar a partir del día 140 del almacenamiento (**Fig. 2.1.d.**). En el día 0 de almacenamiento, se encontraron 0,83 mg/kg de carotenoides en el aceite, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos ( $p>0,05$ ). En el último día de medición la muestra con el contenido más bajo fue NC (0,48 mg/kg). Los tratamientos restantes (NCCM, NMC, y NPS) presentaron un valor más alto de carotenoides, pero sin diferencias significativas entre ellos (0,60, 0,67 y 0,58 mg/kg, respectivamente). Este efecto puede deberse a las propiedades de barrera de las cubiertas contra la penetración del oxígeno, así, logrando una menor oxidación de los carotenoides, en comparación con las nueces sin cobertura.

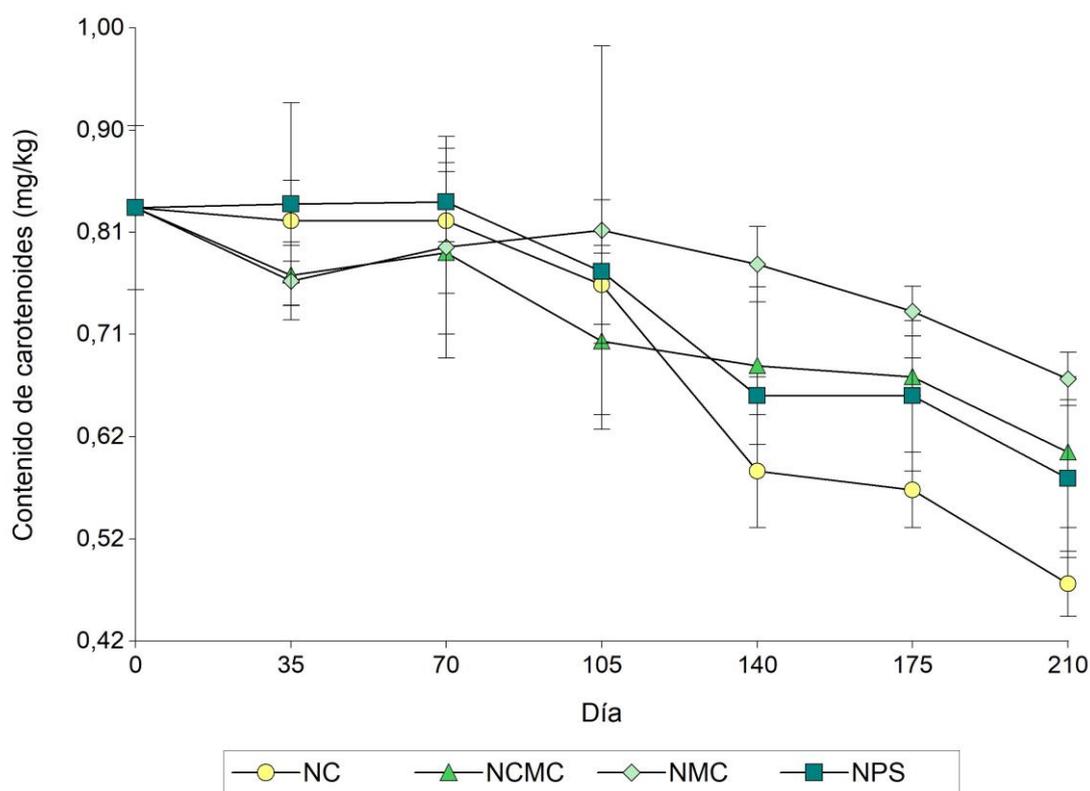


**Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCCM), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3;  $\alpha = 0,05$ ).



**Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3; α = 0,05). Continuación.

D.



**Fig. 2.1.** Valores de (A) índice de peróxido (meq O<sub>2</sub>/kg), (B) dienos conjugados (E1%, K232), (C) trienos conjugados (E1%, K268), y (D) contenido de carotenoides (mg/kg) en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces control sin cobertura (NC); obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (23±1 °C) (n = 3; α = 0,05). Continuación.

Algunos estudios han encontrado efectos similares. Yousuf *et al.* (2018) descubrió que distintas cubiertas comestibles elaboradas a partir del almidón (polisacárido) aplicadas sobre rodajas de calabaza, redujeron la degradación de los carotenoides durante el proceso de secado del mismo, permitiendo una mejor conservación de la calidad del alimento.

### Análisis físico: color

El color de las nueces tiene una relación directa con sus pigmentos y con su contenido fenólico, el cual se encuentra principalmente en el tegumento de la semilla (Christopoulos y Tsantili, 2011). Estos compuestos tienen un rol esencial en la protección de los ácidos grasos contra el deterioro oxidativo (Salcedo *et al.*, 2010). Los cambios en el color del aceite de nuez fueron evaluados al analizar los cambios en luminosidad (L\*),

componentes verde/rojo ( $a^*$ ), y componentes azul/amarillo ( $b^*$ ). En el día 0 de almacenamiento, los parámetros de color de las muestras estudiadas (NC, NCMC, NMC y NPS) mostraron valores negativos de  $a^*$ , positivos de  $b^*$  y un valor alto de luminosidad ( $L^*$ ). En el último día de almacenamiento, el valor  $a^*$  fue más negativo en NC (-1,145) dado por un incremento en sus tonalidades verdosas, seguido por NMC, NPS y NCMC. Este cambio se le puede atribuir a la oxidación de los pigmentos del tegumento. Resultados opuestos fueron encontrados en paltas recubiertas con MC, donde el valor de  $a^*$  al inicio del almacenamiento fue negativo tanto en muestras recubiertas, como en muestra control, indicando una coloración más verdosa. Luego, a lo largo del almacenamiento, el valor de  $a^*$  fue incrementando su positividad, lo cual indica una coloración más rojiza que ocurre como resultado de un mayor grado de madurez en la palta (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005). En el caso del parámetro  $b^*$ , se produjo un incremento de los valores de las muestras de nueces estudiadas, pero sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, el valor de  $L^*$  disminuyó a medida que transcurrió el almacenamiento, indicando que hubo un oscurecimiento en las muestras. En el último día de medición, NMC (70,46) y NCMC (70,36) presentaron los valores más bajos, seguidos por NPS (70,65) y NC (70,74). Manzocco *et al.* (2001) también observaron que los valores de  $L^*$  en nueces disminuyeron a lo largo del almacenaje. Adicionalmente, Maftoonazad y Ramaswamy (2005) encontraron que las muestras de palta recubiertas con MC presentaron un menor decrecimiento de  $L^*$ , que aquellas sin cobertura. En el presente trabajo, el amarronamiento que ocurrió en los tratamientos puede deberse a la oxidación enzimática ejercida por la lipoxigenasa (LOX). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos de las plantas y animales. Normalmente, cataliza la hidroperoxidación de los ácidos grasos libres formando un grupo metileno activado entre los dobles enlaces tal como lo presentan los ácidos linoleico y linolénico, que son muy abundantes en nueces. La LOX tiene un efecto significativo en la estabilidad, gusto y color de los alimentos elaborados a base de vegetales (Baysal y Demirdoven, 2007). La actividad de la LOX puede ser acelerada por la adición de agua o soluciones a los alimentos como ocurre con la mayoría de las enzimas. En este estudio, las reacciones catalizadas por la LOX se pueden haber incrementado en las nueces recubiertas por la presencia de un mayor contenido de humedad aportada por las coberturas comestibles.

## Análisis de compuestos volátiles

Cuando ocurre el proceso oxidación lipídica, la composición química de los alimentos se altera. La reacción de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados genera compuestos característicos como aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, y/o compuestos hidrocarbonados (Grosso y Resurreccion, 2002). Elmore *et al.* (2005) reportaron que la composición de volátiles de la nuez está integrada por hidrocarburos, alcoholes de bajo peso molecular, aldehídos saturados e insaturados, y furanos. En el presente estudio, se detectaron por el análisis GC-MS diversos compuestos volátiles en los granos de nuez. En la **Tabla 2.4** se pueden visualizar los compuestos detectados e identificados en los tratamientos en el día 0 de almacenamiento.

A lo largo del almacenamiento, la proporción de algunos compuestos volátiles se vio alterada (**Fig. 2.2**). Los cambios más remarcables ocurrieron en los siguientes compuestos: pentanal, nonanal, hexanal, y 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano. Todos estos compuestos sufrieron un incremento durante el transcurso del almacenaje, alcanzando sus máximos valores en el último día de medición (día 210).

La presencia de hexanal y nonanal está directamente relacionada con el desarrollo de sabores rancios en alimentos ricos en lípidos (Quiroga *et al.*, 2014; Larrauri *et al.*, 2016). En el día 0 de almacenamiento, ninguno de estos dos compuestos fue encontrado en las muestras (**Tabla 2.2**). El compuesto hexanal comenzó a ser detectado a partir del día 35, mientras que nonanal a partir del día 126 (**Figs 2.2.a y 2.2.b**). En el último día de medición, se detectaron diferencias significativas en las cuentas electrónicas (c.e.) de las áreas de los picos entre tratamientos ( $p < 0,001$ ). Las nueces sin cobertura (NC) presentaron el valor más alto de hexanal ( $8427,89 \cdot 10^6$  c.e.), y fue seguido por los tratamientos: NPS ( $7066,16 \cdot 10^6$  c.e.) y NCMC ( $6177,28 \cdot 10^6$  c.e.). NMC exhibió la media más baja para hexanal, con menos de un tercio de c.e. ( $2604,13 \cdot 10^6$  c.e.) al ser comparado con NC.

Con respecto a nonanal, NC ( $767,29 \cdot 10^6$  c.e.) y NPS ( $688,16 \cdot 10^6$  c.e.) mostraron los valores más altos para este compuesto en el último día de almacenamiento, mientras que, NMC presentó un valor significativamente más bajo ( $285,17 \cdot 10^6$  c.e.). NMC presentó

los valores más bajos de hexanal y nonanal con diferencias significativas con respecto a los tratamientos.

**Tabla 2.4.** Compuestos volátiles (cuentas electrónicas 106) de las muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa (NMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS), y nueces sin cobertura (NC), analizadas sobre producto fresco (día 0 de almacenamiento).

Compuestos volátiles	Tratamiento			
	NC <sup>a</sup>	NMC <sup>a</sup>	NMC <sup>a</sup>	NPS <sup>a</sup>
<b>Alcoholes</b>				
Ciclopropil carbinol	42,22±5,78 a	49,29±0,73 a	49,73±3,25 a	46,40±4,97 a
<b>Aldehídos</b>				
Pentanal	22,62±3,59	44,22±4,55	56,93±7,73	34,27±1,45
Butanal	56,23±4,40 b	40,83±3,36 a	44,87±1,83 a	50,46±3,28 ab
<b>Hidrocarburos alifáticos</b>				
Nonano	99,08±9,90 a	107,54±4,69 a	109,54±6,74 a	125,14±9,72 a
Tridecano	82,52±5,61 a	88,78±1,17 a	85,12±7,33 a	77,14±1,50 a
Tetradecano	1005,19±103,91 a	1037,93±28,97 a	1061,90±128,28 a	958,26±60,88 a
Pentadecano	973,34±46,06 a	1096,18±74,28 a	919,53±10,06 a	1035,50±97,56 a
Hexadecano	1340,96±2,65 a	1611,12±83,74 a	1457,32±111,56 a	1354,51±120,74 a
2-6-10-14-Tetrametil pentadecano	54,70±9,77 a	50,58±4,75 a	44,89±2,92 a	49,27±4,41 a
2,6,10-Trimetil dodecano	362,98±55,88 a	420,24±26,98 a	377,04±12,37 a	384,61±18,52 a
5,6-Bis(2,2-dimetilpropilideno) decano	ND	ND	ND	ND
<b>Hidrocarburos aromáticos</b>				
1-metil-2-(1-metiletil) benceno	295,43±57,90 a	292,79±30,65 a	261,32±20,61 a	264,78±4,81 a
<b>Derivados del benceno</b>				
Benzotiazol	39,26±17,74 ab	0,0075±14,48 a	64,43±6,96 b	90,05±13,12 b
Fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-, metilcarbamato	124,89±8,60 a	199,30±5,75 b	138,08±11,43 a	145,48±11,67 a
<b>Ácidos orgánicos</b>				
Ácido oxálico	35,77±4,21 a	3,502±1,75 a	30,79±2,38 a	32,21±1,17 a
Ácido oxálico, alil pentadecil ester	106,29±7,49 a	125,97±6,52 a	102,30±6,51 a	112,81±8,59 a
<b>Aminas</b>				
N-Tio-valero-morpholina	351,97±33,29 a	356,50±31,21 a	277,33±31,18 a	299,98±18,01 a
<b>Terpenos</b>				
1-Terpinenol	148,04±20,35 a	135,19±2,55 a	132,32±13,91 a	135,63±14,31 a

ND = No detectados.

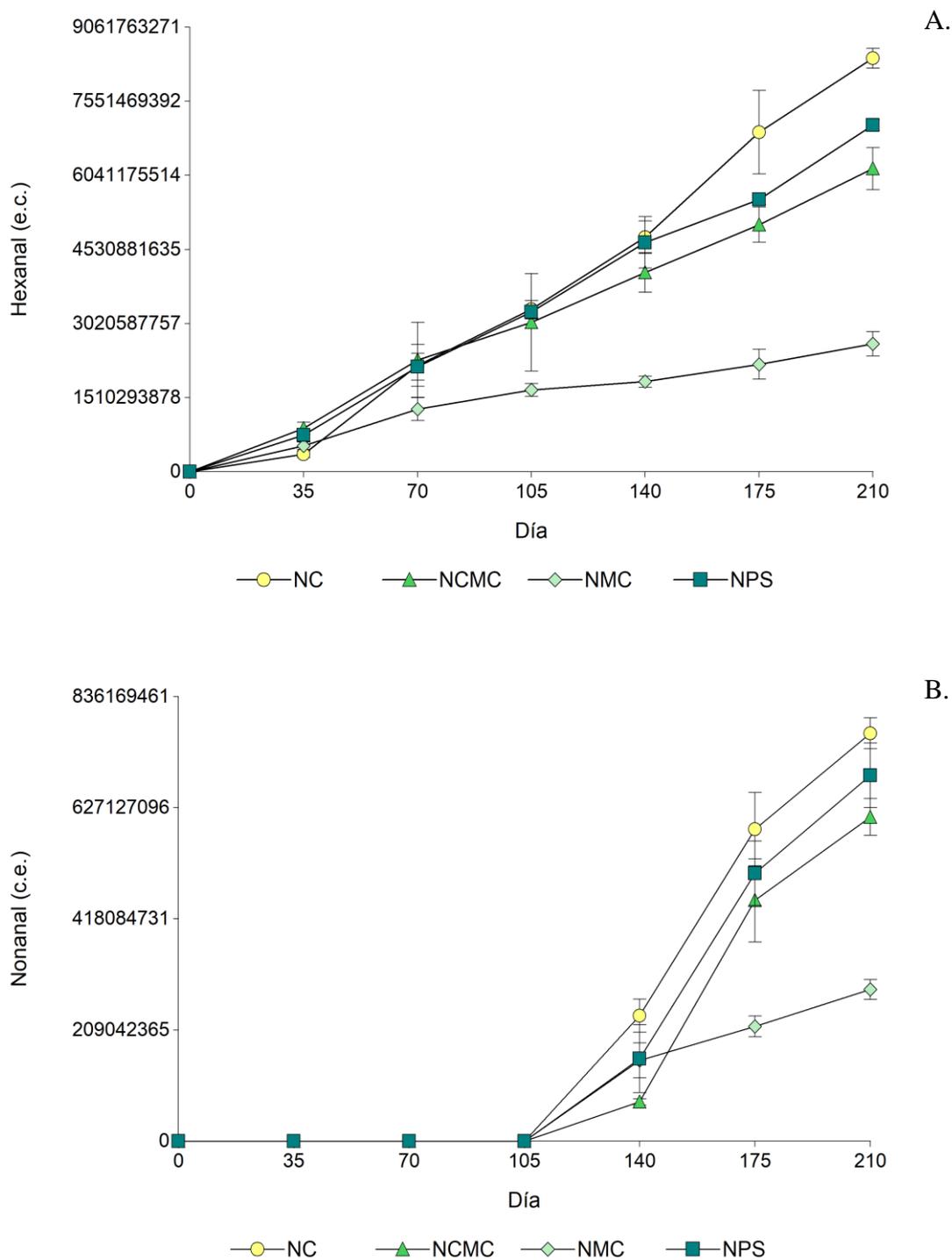
<sup>a</sup> Medias ± desvíos estándar seguidos por letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre las muestras (n = 3, α = 0,05, DGC).

El compuesto pentanal comenzó a incrementarse (Fig. 2.2.c.) a partir del día 35. En el último día del almacenamiento, NMC (193,44\*106 c.e.) presentó el valor más bajo para este compuesto, mientras que, NC (729,36\*106 c.e.) el más alto. Se pudo observar que el

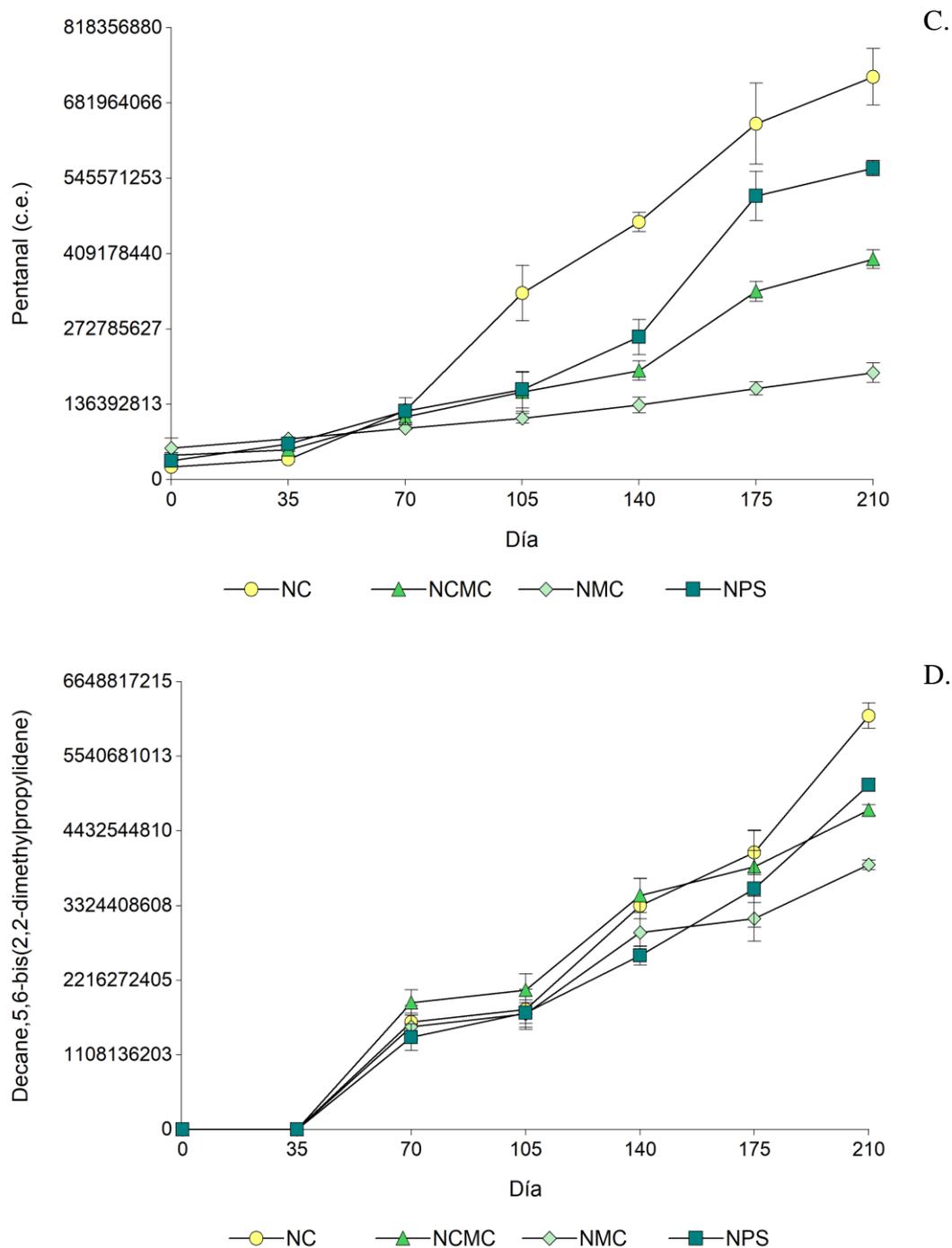
tratamiento control (NC) acumuló una mayor proporción de compuestos volátiles relacionados con la oxidación lipídica como, hexanal, pentanal y nonanal, mientras que, MC mostró una menor proporción durante el almacenamiento.

Estos resultados indican que las nueces con MC consiguieron una mejor protección contra las reacciones de oxidación lipídica. Larrauri *et al.* (2016) reportó que, en almendras tostadas recubiertas, almacenadas durante 126 días a 40 °C, los compuestos hexanal y nonanal se incrementaron para todas las muestras. Sin embargo, las almendras recubiertas con CMC y CMC+antioxidantes presentaron niveles significativamente más bajos de estos compuestos. Otro trabajo, dirigido por Crowe *et al.* (2002) demostró que los niveles de hexanal se incrementan a medida que la calidad sensorial de los alimentos se deteriora. Elmore *et al.* (2005) reportaron que el hexanal es el compuesto predominante en la nuez, y es seguido por 1-pentanol, pentanal, 1-hexanol and 1-penten-3-ol, los cuales, son formados a partir de la oxidación del ácido linoleico.

En el presente estudio, 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano mostro un incremento (**Fig. 2.2.d.**) a partir del día 35 hasta el último día (210). En el primer día de almacenamiento, este compuesto no fue encontrado en ninguno de los tratamientos, mientras que, en el último día, NC presentó la mayor proporción del mismo ( $6142,79 \cdot 10^6$  c.e.), seguido por NPS y NCMC. NMC presentó el nivel más bajo en el mismo período ( $3928,99 \cdot 10^6$  c.e.). Martín *et al.* (2016) informó un comportamiento similar de este compuesto en un ensayo de maní tostado utilizando distintos tipos de empaque. En ese estudio, reportó que los granos de maní sufrieron un incremento de este compuesto en su composición y que el mismo se incrementó a medida que transcurrió el almacenaje.



**Fig. 2.2.** Contenido en cuentas electrónicas (c.e.) de (A) hexanal, (B) nonanal, (C) pentanal, (D) 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) analizados durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0,05$ ).



**Fig. 2.2.** Contenido en cuentas electrónicas (c.e.) de (A) hexanal, (B) nonanal, (C) pentanal, (D) 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCMC), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) analizados durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente ( $n = 3$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Continuación.

## Análisis sensorial

### Análisis descriptivo

Los resultados promedios de las intensidades de los atributos durante el almacenamiento (día 0, 70, 140, 210) se encuentran en la **Tabla 2.5**. Diferencias en la intensidad de cada atributo fue observada entre tratamientos en el mismo periodo y/o en el mismo tratamiento en distintos momentos del almacenamiento, con la excepción del atributo salado.

Con respecto a los atributos de **apariencia**, la intensidad de color fue cambiando en todas las muestras a lo largo del almacenamiento. La apariencia, y fundamentalmente el color de un alimento, representa el primer indicador de la calidad del mismo (Abdallah *et al.*, 2015). La intensidad de este atributo se incrementó durante el almacenamiento, siendo el tratamiento NMC, el que exhibió el menor aumento con respecto al resto de los tratamientos. En el día 0 del almacenamiento, la muestra NMC presentó el valor más bajo para este atributo (45,96), mientras que, las muestras NPS y NCMC, no mostraron diferencias significativas al ser comparadas con NC (48,99). Esto sugirió que la adición de la cobertura MC afectó el color natural de la nuez. En el último día del almacenamiento (día 210), se observaron diferencias significativas en el color de las muestras. El valor de intensidad más alto se presentó en la muestra NC (62,60), y fue seguido por NCMC (57,23) y NPS (56,79) con valores intermedios y finalmente NMC (51,94) con el valor más bajo. La muestra sin cobertura (NC) tuvo el mayor incremento en la intensidad de color en el tiempo, haciendo que el producto sufra mayor oscurecimiento o amarronamiento. El tegumento de la nuez es particularmente rico en compuestos fenólicos, que influyen sobre el color del mismo (Labuckas *et al.*, 2008). Manzocco *et al.* (2001) reportó, en un estudio de almacenaje, que el parámetro de color L\* en nueces, mostró una disminución en el tiempo, implicando un oscurecimiento de la misma. Dichos autores sugirieron que el amarronamiento, junto con el deterioro de la calidad, se puede deber a la oxidación enzimática de los polifenoles. En otro estudio, se reportó que las nueces dentro de cáscaras durante el almacenamiento resultan en un menor amarronamiento que aquellas que se almacenan sin cáscaras (Christopoulos y Tsantili, 2012). Los autores de ese estudio sugirieron que esto se debe a que las cáscaras de las nueces tienen un efecto protector

disminuyendo el intercambio de oxígeno. En el presente estudio, las nueces recubiertas, principalmente aquellas con MC, presentaron un menor amarronamiento que la nuez control (NC). Esto puede deberse a que las cubiertas comestibles actuaron retardando el proceso de oxidación lipídica y de los polifenoles del tegumento, al formar una capa protectora que disminuye la penetración del oxígeno. El Brillo es otro atributo de apariencia que fue afectado por la adición de las cubiertas. En el día 0 de almacenamiento, se detectó una diferencia entre las nueces recubiertas y la no recubiertas (NC). Mientras que el tratamiento NMC (28,62) presentó valores menores que NC (30,07), NCMC (32,69) y NPS (32,27). A lo largo del almacenamiento, estos valores no variaron para los tratamientos, manteniéndose sin diferencias significativas en el tiempo.

El **sabor** nuez, es un atributo sensorial característico de este alimento que, además, determina su calidad y estado de conservación. Se produjeron cambios significativos en la intensidad de este atributo para los tratamientos durante el almacenamiento. En el día 0, todas las muestras (NC, NCMC, NMC y NPS) presentaron intensidades altas de este atributo (81,55; 79,45; 78,16 y 79,06; respectivamente), sin presentar diferencias significativas entre ellas. A medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, se pudo evidenciar que los valores de este sabor fueron decreciendo. En el último día de medición (día 210), el tratamiento NC exhibió el valor más bajo para este atributo (61,68) mientras que la muestra NMC exhibió el valor más alto (75,86). Esto demuestra que las coberturas, principalmente la de MC, ayudaron a preservar este atributo sensorial característico de las nueces en el tiempo y por lo tanto, también, su calidad. Este efecto protector de cubiertas comestibles en la preservación del sabor original de los alimentos, también, fue descrito en otros estudios. Riveros *et al.* (2013) reportaron que las cubiertas comestibles MC y CMC ayudaron a preservar el sabor a maní en el tiempo de almacenaje. Lo mismo fue observado con respecto al sabor a girasol en granos tostados de este producto (Riveros *et al.*, 2016). Larrauri *et al.* (2016) también reportaron el efecto protector de las cubiertas comestibles en la preservación del sabor característico de la almendra, en almendras tostadas recubiertas con CMC.

Los gustos dulce, salado, amargo y ácido son atributos sensoriales básicos de los alimentos. El gusto dulce de un alimento está directamente relacionado con el contenido de azúcar del mismo. En el día inicial de medición, los tratamientos presentaron valores

similares para este atributo. La intensidad del atributo dulce mostró un decrecimiento a lo largo del almacenamiento. Este proceso fue menos pronunciado en la muestra NMC (de 12,75 a 12,09), en comparación con los otros tratamientos (NC, NCMC y NPS). Esto puede explicarse por el efecto de la reacción de “Maillard”. Esta es una de las reacciones predominantes que ocurren durante los tratamientos de calor o almacenamiento prolongado de los alimentos y consiste un grupo de reacciones bastante complejo, en donde, en primera instancia, ocurre la condensación de los grupos amino libres, generalmente de los aminoácidos, con los grupos carbonilo de los azúcares reductores (Nursten, 2005). Se define también como una especie de caramelización de los alimentos y que favorece el desarrollo de un color tostado en los mismos. Downs et al. (2016) también reconocieron esta reacción en un estudio realizado en nueces. Ellos, reportaron que los niveles de azúcares reductores y no reductores, determinados mediante HPLC, variaron a lo largo del almacenamiento en los granos de nueces, debido a las “reacciones de Maillard”. Por el contrario, la intensidad de los atributos amargo y ácido se incrementó durante el almacenamiento.

En el día 0, el tratamiento NMC presentó el valor más bajo para el atributo amargo (20,53), en relación con el resto de los tratamientos (NC 21,86; NCMC 21,68 y NPS 21,93). En el último día de medición, este tratamiento continuó exhibiendo el valor más bajo para sabor amargo y fue seguido por NPS. En cuanto al gusto ácido, el incremento que sufrió este atributo fue superior en NC. En cuanto al gusto salado, no se detectaron alteraciones durante el almacenamiento, ni tampoco hubo diferencias entre tratamientos.

Los atributos **aromáticos**, sabor oxidado y sabor cartón, están relacionados con sabores rancios y desagradables que pueden afectar en forma negativa la opinión y aceptabilidad de los consumidores sobre un alimento (Grosso y Resurrección, 2002). A lo largo del almacenaje, se pudo observar que los valores de ambos atributos se incrementaron para todos los tratamientos. Diferencias significativas fueron detectadas entre tratamientos en distintos períodos; las muestras con cubiertas comestibles fueron significativamente diferentes a la muestra control.

**Tabla 2.5.** Medias y desvíos estándar de la intensidad de los atributos sensoriales, evaluados por un panel de jueces entrenados en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCCM), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (n = 3;  $\alpha = 0.05$ ).

Atributos	Tratamiento <sup>a</sup>	Día de almacenamiento			
		Día 0 <sup>b</sup>	Día 70 <sup>b</sup>	Día 140 <sup>b</sup>	Día 210 <sup>b</sup>
Intensidad de color	NC	48,99±0,69 <sup>C</sup>	54,21±0,63 <sup>B</sup>	53,66±0,59 <sup>B</sup>	62,60±0,58 <sup>A</sup>
	NCCM	48,70±0,66 <sup>C</sup>	52,43±0,62 <sup>B</sup>	51,95±0,55 <sup>B</sup>	57,23±0,61 <sup>A</sup>
	NMC	45,96±0,61 <sup>B</sup>	47,44±0,55 <sup>A</sup>	48,02±0,50 <sup>B</sup>	51,94±0,55 <sup>A</sup>
	NPS	49,58±0,63 <sup>B</sup>	50,44±0,57 <sup>B</sup>	51,03±0,52 <sup>B</sup>	56,79±0,57 <sup>A</sup>
Dureza	NC	87,88±0,48 <sup>A</sup>	88,27±0,44 <sup>A</sup>	87,30±0,40 <sup>A</sup>	87,37±0,40 <sup>A</sup>
	NCCM	88,72±0,43 <sup>A</sup>	87,98±0,40 <sup>A</sup>	87,21±0,35 <sup>A</sup>	87,75±0,40 <sup>A</sup>
	NMC	88,92±0,44 <sup>A</sup>	87,61±0,39 <sup>A</sup>	87,38±0,36 <sup>A</sup>	87,54±0,40 <sup>A</sup>
	NPS	87,98±0,45 <sup>A</sup>	88,12±0,41 <sup>A</sup>	87,65±0,37 <sup>A</sup>	88,08±0,41 <sup>A</sup>
Brillo	NC	30,07±0,56 <sup>A</sup>	29,26±0,60 <sup>B</sup>	29,61±0,45 <sup>B</sup>	29,87±0,47 <sup>A</sup>
	NCCM	32,69±0,41 <sup>A</sup>	30,49±0,46 <sup>B</sup>	30,62±0,40 <sup>B</sup>	29,55±0,80 <sup>B</sup>
	NMC	28,62±0,60 <sup>A</sup>	26,5±0,46 <sup>B</sup>	25,79±0,24 <sup>B</sup>	26,11±0,54 <sup>B</sup>
	NPS	32,27±0,62 <sup>A</sup>	28,18±0,53 <sup>C</sup>	27,68±0,26 <sup>C</sup>	29,69±0,43 <sup>B</sup>
Sabor nuez	NC	81,55±0,70 <sup>A</sup>	77,97±0,64 <sup>B</sup>	68,91±0,60 <sup>C</sup>	61,68±0,59 <sup>D</sup>
	NCCM	79,45±0,64 <sup>A</sup>	77,26±0,59 <sup>B</sup>	71,42±0,53 <sup>C</sup>	65,40±0,59 <sup>D</sup>
	NMC	78,16±0,65 <sup>A</sup>	77,79±0,59 <sup>A</sup>	75,13±0,54 <sup>B</sup>	75,86±0,59 <sup>B</sup>
	NPS	79,06±0,67 <sup>A</sup>	76,62±0,61 <sup>B</sup>	69,99±0,55 <sup>C</sup>	63,83±0,61 <sup>D</sup>
Oxidado	NC	0,13±0,38 <sup>D</sup>	6,89±0,35 <sup>C</sup>	25,21±0,32 <sup>B</sup>	38,76±0,32 <sup>A</sup>
	NCCM	0,00±0,00 <sup>D</sup>	4,78±0,37 <sup>C</sup>	24,82±0,33 <sup>B</sup>	31,79±0,37 <sup>A</sup>
	NMC	0,00±0,00 <sup>C</sup>	2,86±0,37 <sup>B</sup>	7,07±0,34 <sup>A</sup>	7,81±0,37 <sup>A</sup>
	NPS	0,40±0,42 <sup>D</sup>	7,5±0,38 <sup>C</sup>	25,75±0,35 <sup>B</sup>	34,62±0,38 <sup>A</sup>
Cartón	NC	14,55±0,66 <sup>D</sup>	17,66±0,60 <sup>C</sup>	19,07±0,56 <sup>B</sup>	22,25±0,56 <sup>A</sup>
	NCCM	14,35±0,59 <sup>D</sup>	17,00±0,55 <sup>C</sup>	18,15±0,49 <sup>B</sup>	20,08±0,55 <sup>A</sup>
	NMC	15,59±0,59 <sup>B</sup>	16,95±0,53 <sup>A</sup>	16,73±0,49 <sup>A</sup>	16,58±0,53 <sup>A</sup>
	NPS	14,26±0,62 <sup>C</sup>	17,82±0,56 <sup>B</sup>	18,01±0,51 <sup>B</sup>	20,36±0,57 <sup>A</sup>

<sup>a</sup> Distinto número en la misma columna para cada variable dependiente significa que hay diferencias significativas entre tratamientos para cada período de tiempo evaluado y distinta letra en la misma fila significa que hay diferencias significativas en el tratamiento, durante los periodos de almacenamiento evaluados para cada variable dependiente.

**Tabla 2.5.** Medias y desvíos estándar de la intensidad de los atributos sensoriales, evaluados por un panel de jueces entrenados en muestras de nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCCM), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) obtenidos durante el almacenamiento de 210 días a temperatura ambiente (n = 3;  $\alpha = 0.05$ ). Continuación.

Atributos	Tratamiento <sup>a</sup>	Día de almacenamiento			
		Día 0 <sup>b</sup>	Día 70 <sup>b</sup>	Día 140 <sup>b</sup>	Día 210 <sup>b</sup>
Dulce	NC	12,24±0,50 <sup>2A</sup>	12,46±0,46 <sup>2A</sup>	11,35±0,42 <sup>2B</sup>	10,42±0,42 <sup>2C</sup>
	NCCM	12,64±0,45 <sup>2A</sup>	12,22±0,42 <sup>2A</sup>	10,8±0,37 <sup>2B</sup>	10,78±0,42 <sup>2B</sup>
	NMC	12,75±0,44 <sup>1A</sup>	12,68±0,40 <sup>1A</sup>	12,8±0,36 <sup>1A</sup>	12,09±0,40 <sup>1B</sup>
	NPS	12,68±0,45 <sup>2A</sup>	12,35±0,40 <sup>2A</sup>	10,57±0,37 <sup>2B</sup>	10,53±0,41 <sup>2B</sup>
Salado	NC	5,17±0,10 <sup>1A</sup>	5,53±0,09 <sup>2A</sup>	5,19±0,08 <sup>2A</sup>	5,19±0,08 <sup>2A</sup>
	NCCM	5,16±0,09 <sup>2A</sup>	5,47±0,09 <sup>2A</sup>	5,27±0,08 <sup>1A</sup>	5,24±0,09 <sup>1A</sup>
	NMC	5,28±0,20 <sup>1A</sup>	5,46±0,08 <sup>2A</sup>	5,25±0,07 <sup>2A</sup>	5,26±0,08 <sup>2A</sup>
	NPS	5,06±0,10 <sup>2A</sup>	5,54±0,09 <sup>1A</sup>	5,35±0,08 <sup>1A</sup>	5,17±0,09 <sup>2A</sup>
25Amargo	NC	21,86±0,59 <sup>1B</sup>	21,83±0,54 <sup>2B</sup>	24,00±0,50 <sup>1A</sup>	24,54±0,50 <sup>1A</sup>
	NCCM	21,68±0,66 <sup>1C</sup>	22,95±0,62 <sup>1C</sup>	24,10±0,55 <sup>1B</sup>	24,03±0,62 <sup>1A</sup>
	NMC	20,53±0,47 <sup>2B</sup>	22,11±0,43 <sup>2A</sup>	22,38±0,39 <sup>2A</sup>	22,42±0,43 <sup>3A</sup>
	NPS	21,93±0,66 <sup>1B</sup>	21,90±0,60 <sup>2B</sup>	24,47±0,54 <sup>1A</sup>	23,34±0,60 <sup>2A</sup>
Acido	NC	7,27±0,50 <sup>2B</sup>	8,55±0,45 <sup>2A</sup>	9,87±0,42 <sup>2A</sup>	10,55±0,42 <sup>1A</sup>
	NCCM	7,54±0,47 <sup>1B</sup>	8,62±0,44 <sup>2A</sup>	9,51±0,39 <sup>2A</sup>	9,84±0,44 <sup>2A</sup>
	NMC	7,67±0,47 <sup>2B</sup>	8,52±0,42 <sup>2B</sup>	9,33±0,38 <sup>1B</sup>	10,01±0,42 <sup>2A</sup>
	NPS	7,02±0,43 <sup>2B</sup>	9,99±0,39 <sup>1A</sup>	9,96±0,36 <sup>2A</sup>	9,75±0,39 <sup>2A</sup>
Astringencia	NC	50,74±0,60 <sup>1B</sup>	51,21±0,55 <sup>1B</sup>	53,01±0,50 <sup>1B</sup>	53,50±0,50 <sup>1A</sup>
	NCCM	49,85±0,58 <sup>1B</sup>	51,48±0,54 <sup>1A</sup>	52,19±0,48 <sup>1A</sup>	52,78±0,54 <sup>1A</sup>
	NMC	48,30±0,59 <sup>2B</sup>	48,82±0,53 <sup>2B</sup>	50,34±0,49 <sup>2A</sup>	49,50±0,53 <sup>2A</sup>
	NPS	48,46±0,63 <sup>2D</sup>	50,09±0,57 <sup>1C</sup>	52,04±0,52 <sup>1A</sup>	52,56±0,57 <sup>1B</sup>
Crujiente	NC	55,29±0,56 <sup>1B</sup>	56,8±0,60 <sup>1A</sup>	57,37±0,45 <sup>1A</sup>	57,01±0,67 <sup>1A</sup>
	NCCM	55,97±0,41 <sup>1B</sup>	56,66±0,46 <sup>1A</sup>	57,29±0,40 <sup>1A</sup>	56,90±0,80 <sup>1A</sup>
	NMC	54,03±0,60 <sup>2B</sup>	56,27±0,46 <sup>1A</sup>	56,64±0,24 <sup>2A</sup>	57,42±0,54 <sup>1A</sup>
	NPS	54,98±0,62 <sup>2B</sup>	56,78±0,53 <sup>1A</sup>	56,38±0,26 <sup>2A</sup>	57,85±0,63 <sup>1A</sup>
Dureza	NC	36,11±0,50 <sup>1B</sup>	36,98±0,50 <sup>1B</sup>	36,36±0,40 <sup>1B</sup>	37,44±0,40 <sup>1A</sup>
	NCCM	35,13±0,45 <sup>1B</sup>	36,41±0,42 <sup>1A</sup>	36,88±0,37 <sup>1A</sup>	37,30±0,42 <sup>1A</sup>
	NMC	33,03±0,50 <sup>2B</sup>	35,79±0,46 <sup>2A</sup>	35,94±0,42 <sup>2A</sup>	36,72±0,46 <sup>2A</sup>
	NPS	36,09±0,43 <sup>1B</sup>	36,97±0,39 <sup>1A</sup>	36,19±0,35 <sup>1B</sup>	37,29±0,39 <sup>1A</sup>

<sup>a</sup> Distinto número en la misma columna para cada variable dependiente significa que hay diferencias significativas entre tratamientos para cada período de tiempo evaluado y distinta letra en la misma fila significa que hay diferencias significativas en el tratamiento, durante los periodos de almacenamiento evaluados para cada variable dependiente.

En el día 0 de almacenamiento, el atributo oxidado fue poco percibido por los panelistas, que le asignaron valores por debajo de 1 (NC = 0,13; NCMC = 0,00; NMC = 0,00 y NPS = 0,40). A medida que transcurrió el almacenamiento, los valores para este atributo se incrementaron de forma despareja entre los tratamientos. NC presentó el valor más alto de oxidado (38,76) en el último día de almacenamiento (día 210), seguido por NPS (36,72) y, finalmente, NMC que presentó el valor más bajo (7,81). Resultados similares se observaron con respecto al atributo sabor a cartón. En el último día de almacenaje, NC presentó el valor más alto (22,25), seguido por NPS (20,36) y luego NCMC (20,08). NMC mostró un valor significativamente inferior para este atributo (16,58) ( $p < 0,001$ ). Estos resultados proveen la evidencia de que existe un efecto protector de las cubiertas en contra del desarrollo de la rancidez en la nuez, dado que estos dos atributos tienen una relación directa con la misma (Nepote *et al.*, 2004; Quiroga *et al.*, 2014). La rancidez oxidativa consiste en un complejo importante de reacciones químicas, que incluyen, el desarrollo de diversos sabores y olores desagradables que hacen que los alimentos dejen de ser aceptados por los consumidores lo que conlleva a una disminución de su vida útil (O'Brien, 2009). Un incremento en los valores de sabor oxidado y cartón, también, ha sido observado en otros alimentos recubiertos con películas comestibles, incluyendo maníes tostados (CMC, MC y NPS) (Riveros *et al.*, 2013, 2016) y almendras tostadas (CMC) (Larrauri *et al.*, 2016). En ambos trabajos se ha demostrado un efecto protector de dichas cubiertas, en relación con los alimentos que no poseían las mismas, debido a que en estos productos se produjo un menor incremento de las intensidades de estos atributos. En el presente trabajo, el uso de cubiertas de CMC, MC y NPS mejoró la estabilidad sensorial de la nuez. El tratamiento NMC presentó los valores más bajos para estos atributos y también presentó los valores más altos para sabor a nuez y dulce en el último día del almacenamiento. Esto sugiere que las cubiertas comestibles, particularmente la que tiene MC, preservan mejor el sabor y los atributos positivos en las nueces en el tiempo.

La astringencia es **un factor de sensación** que ha sido asociado con una sensación de sequedad en la boca debido a la presencia de diversos compuestos de los alimentos del tipo de fenoles (Tapia *et al.*, 2013). La intensidad de este atributo se incrementó durante el almacenamiento. El incremento de la astringencia fue inferior en el tratamiento con

cobertura de MC (de 48.30-49.50) y superior en la muestra control (NC; de 50.74-53.50). Las reacciones de Maillard afectan diversos parámetros de calidad de los alimentos incluyendo propiedades organolépticas, color y funcionalidad de las proteínas (Lund y Ray, 2017). En relación a los aspectos sensoriales, se han descrito y caracterizado diversos compuestos de sabores amargos originados por estas reacciones, además, de presentar un sabor astringente concomitante (Nursten, 2005). Esto podría explicar el incremento de astringencia ocurrido en las muestras, principalmente en NC que, además, presento una mayor disminución del atributo dulce.

Los atributos de **textura** dureza y crujiente se incrementaron durante el almacenamiento para todas las muestras. NMC presento los valores más bajos para el atributo dureza en el comienzo del almacenaje (33,03) comparado con los otros tratamientos (NC 36,11; NCMC 35,13; NPS 36,09). Esto se puede deber al mayor contenido de humedad como resultado de la aplicación de la cobertura. En cuanto a crujiente, MC exhibió una intensidad más baja para este atributo (54,03) en el primer día de almacenamiento. Sin embargo, en el último día no presento diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

### **Análisis de regresión**

Las ecuaciones de regresión lineal de las variables dependientes (atributos sensoriales) analizadas, están exhibidas en **Tabla 2.6**. Diferencias significativas fueron encontradas entre pendientes ( $\beta_1$ ) de distintos tratamientos para un mismo atributo. Las pendientes de los atributos gusto dulce y sabor nuez fueron negativas, ya que, estos atributos presentaron valores decrecientes a medida que fue avanzando el almacenamiento. En oposición, los otros atributos que presentaron cambios durante el almacenaje presentaron pendientes positivas. Las pendientes más pronunciadas se observaron en la muestra control (NC), mientras que, las menos pronunciadas en las muestras con MC (NMC). Estos resultados sugieren que la muestra control cambio con más intensidad las intensidades de los atributos a lo largo del almacenamiento.

Los atributos: dulce, sabor nuez, oxidado y cartón presentaron un valor de  $R^2$  superior a 0,50 en las muestras, con excepción en NMC, donde, los atributos cartón y sabor

nuez presentaron un R2 inferior. Esto probablemente se deba a que estos atributos en NMC no tuvieron cambios significativos a lo largo del almacenamiento. El R2 más alto para sabor nuez fue observado en la muestra NC (0,876), que también, presentó la pendiente negativa más pronunciada (-0,100), mientras que, NMC la menos pronunciada (0,014). el valor de R2 más alto fue observado en la muestra NC (0,9650) para sabor oxidado que también exhibió la pendiente más pronunciada para este atributo (0,2106), indicando que NC presentó procesos de deterioro superiores al resto de las muestras. Los tratamientos, NCMC (0,183) y NPS (0,192) mostraron valores intermedios de pendiente y NMC (0,046) tuvo la pendiente más baja. Asensio et al. (2012) reportó una mayor pendiente de sabor rancio en muestras de aceite de oliva sin la presencia de antioxidantes, en relación a aquellas muestras con antioxidantes. Nepote et al. (2004) también reportó una mayor pendiente en el tratamiento control para el atributo oxidado, en maníes tostados con miel, con respecto a los tratamientos que presentaban antioxidante natural y BHT. Con respecto al sabor cartón, el tratamiento control junto con NCMC y NPS, presentaron la pendiente más pronunciada, mientras que, NMC tuvo una pendiente menos marcada. Tanto el sabor oxidado, como el sabor cartón, son atributos sensoriales relacionados con la oxidación lipídica (Grosso y Resurreccion, 2002; Nepote et al., 2009). Quiroga et al. (2013), también encontró una pendiente lineal positiva para este atributo en semillas de girasol tostadas almacenadas a 23 °C, donde esta pendiente fue superior en el tratamiento control en comparación con los tratamientos con aceites esenciales (orégano y poleo) y BHT, utilizados como antioxidantes.

Por otra parte, el atributo **dulce**, fue el único tratamiento que tuvo una pendiente poco marcada y significativamente menor en NMC con respecto a las otras muestras.

En todas las pendientes de los atributos previamente mencionados, siempre fue menos pronunciada en las muestras con cubiertas comestible y, principalmente, en aquellas recubiertas con MC. Esto, probablemente se explica debido a las propiedades de las cubiertas que actúan reduciendo el intercambio gaseoso y la humedad entre el medio ambiente circundante y la muestra, ejerciendo así, un efecto protector contra los procesos de deterioro del alimento. Por lo tanto, las cubiertas comestibles actuaron mejorando la preservación de la calidad sensorial de las nueces en el tiempo, especialmente las nueces recubiertas con MC.

**Tabla 2.6.** Coeficientes de regresión y  $R^2$  ajustados de los atributos evaluados por jueces entrenados en el análisis sensorial descriptivo para nueces recubiertas con carboximetil-celulosa, (NCCM), metil-celulosa (NMC), proteína del suero de la leche (NPS) y nueces sin cobertura (NC) durante el almacenamiento de 210 días.

Muestra <sup>a</sup>	Coefficiente de regresión <sup>b</sup>	Intensidad de color	Rugosidad	Brillo	Oxidado	Cartón	Sabor nuez	Dulce	Salado	Amargo	Acido	Astringente	Crujiente	Dureza
NC	$\beta_0$	491,984	878,81	290,732	-26,401	148,975	815,163	124,827	52,958	212,853	78,337	507,073	561,88	362,966
	$\beta_1$	0,0521 a	-0,003 a	0,0003 a	0,2106 a	0,0366 a	-0,1007 d	-0,0113 b	-0,0006 a	0,017 ab	0,0128 a	0,0117 ab	0,0057 b	0,0044 b
	$R^2$	0,6151	0,0131	0,0002	0,965	0,5717	0,8764	0,678	0,0083	0,2382	0,1957	0,1345	0,047	0,0337
NCCM	$\beta_0$	493,526	882,676	319,398	-24,342	148,656	809,836	125,571	52,028	216,116	78,415	503,456	562,762	358,768
	$\beta_1$	0,0364 b	-0,0048 a	-0,0117 b	0,1834 c	0,0277 a	-0,0749 b	-0,0102 b	0,0004 a	0,0224 a	0,0103 a	0,0137 ab	0,0048 b	0,0081 ab
	$R^2$	0,5122	0,0517	0,1012	0,9141	0,4548	0,8163	0,8321	0,0034	0,3144	0,1373	0,1625	0,0398	0,096
NMC	$\beta_0$	476,328	880,879	275,342	0,3173	154,626	787,359	132,015	52,52	209,488	74,095	485,193	549,04	340,849
	$\beta_1$	0,0147 c	-0,0027 a	-0,0075 ab	0,0464 d	0,0067 b	-0,0147 a	-0,0024 a	-0,0001 a	0,0109 b	0,0114 a	0,0055 b	0,0149 a	0,0139 a
	$R^2$	0,126	0,015	0,0478	0,7613	0,046	0,1571	0,1114	0,0002	0,1468	0,181	0,0272	0,2218	0,2145
NPS	$\beta_0$	488,031	876,89	292,727	-16,621	155,241	799,418	126,273	52,876	218,774	79,813	495,666	548,315	362,623
	$\beta_1$	0,0309 b	0,0003 a	-0,0031 ab	0,1916 b	0,0264 a	-0,0815 c	-0,0113 b	-0,0004 a	0,017 ab	0,0106 a	0,0191 a	0,0154 a	0,0058 b
	$R^2$	0,4568	0,0002	0,0102	0,9272	0,4143	0,8271	0,818	0,0044	0,1899	0,1552	0,2126	0,2607	0,0418

<sup>a</sup> Ecuación de regresión lineal:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ , donde Y = variable dependiente (atributo) y X = variable independiente (tiempo).

<sup>b</sup> Letras diferentes en una misma columna para cada atributo sensorial significan que las pendientes de la ecuación de regresión ( $\beta_1$ ) fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

Quiroga et al. (2013), también encontró una pendiente lineal positiva para este atributo en semillas de girasol tostadas almacenadas a 23 °C, donde esta pendiente fue superior en el tratamiento control en comparación con los tratamientos con aceites esenciales (orégano y poleo) y BHT, utilizados como antioxidantes.

Por otra parte, el atributo **dulce**, fue el único tratamiento que tuvo una pendiente poco marcada y significativamente menor en NMC con respecto a las otras muestras.

En todas las pendientes de los atributos previamente mencionados, siempre fue menos pronunciada en las muestras con cubiertas comestibles y, principalmente, en aquellas recubiertas con MC. Esto, probablemente se explica debido a las propiedades de las cubiertas que actúan reduciendo el intercambio gaseoso y la humedad entre el medio ambiente circundante y la muestra, ejerciendo así, un efecto protector contra los procesos de deterioro del alimento. Por lo tanto, las cubiertas comestibles actuaron mejorando la preservación de la calidad sensorial de las nueces en el tiempo, especialmente las nueces recubiertas con MC.

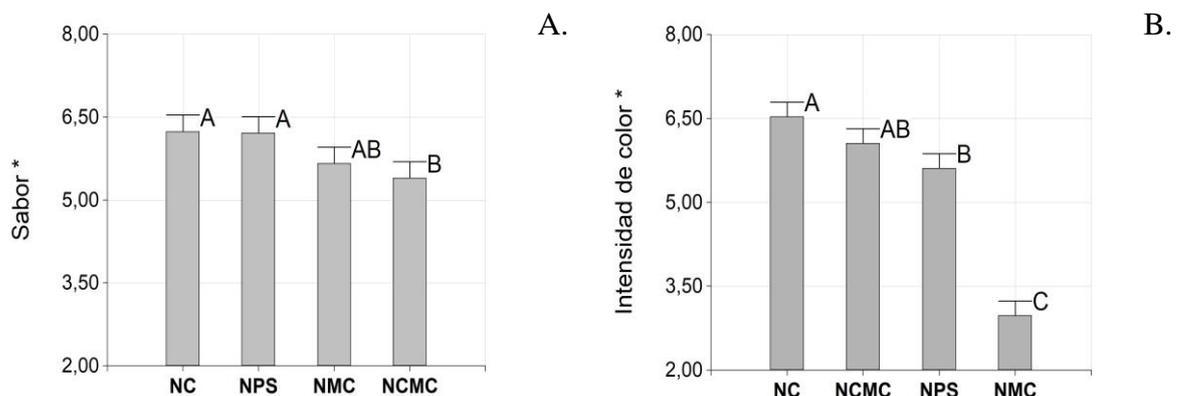
Las ecuaciones de regresión pueden ser utilizadas para estimar el valor de un atributo de un alimento en un determinado punto en el tiempo (Olmedo *et al.*, 2009; Asensio *et al.*, 2012; Riveros *et al.*, 2013). Los frutos secos, al ser cosechados una vez en el año, deben ser almacenados y consumidos antes de la próxima cosecha. Cuando se utilizaron las ecuaciones de regresión de este estudio, se pudo predecir que las nueces recubiertas con coberturas comestibles de MC y almacenadas por 365 días tendrían valores estimados de intensidad de sabor oxidado y sabor a nuez de 17,25 y 73,37, respectivamente. Sin embargo, si las mismas nueces se encuentran sin cobertura (NC) la intensidad de los sabores oxidado y nuez serían de 72,33 y 44,8 respectivamente. Estos resultados predictivos demuestran el gran efecto protector de las cubiertas comestibles, principalmente otorgado por la cobertura comestible MC.

### **Prueba afectiva de aceptabilidad**

Los resultados de la aceptabilidad del sabor están representados en la **Fig. 2.3**. Los valores medios, evaluados según una escala hedónica de 9 puntos, se encontraron dentro

del rango: 5,90-6,75 (NCCM y NC, respectivamente). Los tratamientos NC y NPS presentaron los valores más altos de aceptabilidad, seguidos por NMC (5,66) con un valor medio sin diferencias significativas con respecto a los anteriores. El tratamiento NCCM presentó los niveles de aceptabilidad más bajos (5,90), sin embargo, no mostró diferencias con respecto al tratamiento NMC. Estos resultados indican que la cubierta comestible CMC afectó la aceptabilidad de sabor que tienen los consumidores sobre el producto. Con respecto a la aceptabilidad del color, el tratamiento NMC tuvo una aceptabilidad inferior al resto de los tratamientos (2,97) mientras que, NC tuvo la aceptabilidad más alta (6,53), demostrando así, que está cubierta tuvo una influencia negativa en la percepción del color del alimento.

Las cubiertas comestibles exhibieron un comportamiento positivo contra el deterioro oxidativo. Sin embargo, los resultados de la aceptabilidad demuestran que algunas de ellas tuvieron una percepción negativa por parte de los consumidores. De todas maneras, es necesario recalcar que, a pesar de tener valores inferiores, todos los tratamientos mostraron una aceptabilidad del sabor mayor a 5 (ni me gusta ni me disgusta), lo que indica que todas las muestras se encuentran dentro de un valor aceptable para los consumidores.



**Fig. 2.3.** Medias obtenidas en la aceptabilidad de los consumidores (escala hedónica de 9 puntos) con respecto a (A) sabor y (B) intensidad del color, evaluadas en nueces frescas no recubiertas (NC) y con la adición de cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa (NCCM), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS).

\*Letras diferentes en cada barra significa que hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ).

## **Análisis de componentes principales (ACP)**

El biplot obtenido del análisis de componentes principales está representado en la **Fig. 2.4**. Las dos primeras componentes explicaron el 91,9% de la variabilidad, siendo la componente principal 1 (CP 1) la que representó el mayor porcentaje (73,8%). En este análisis se evaluaron todos los indicadores físico-químicos (IP, CD, CT, CC, a\*, b\*, L\*), volátiles (pentanal, hexanal, nonanal y 5,6-bis 2,2-dimetil-propildieno decano) y atributos sensoriales (intensidad de color, dureza, brillo, sabor nuez, oxidado, cartón, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza) medidos a lo largo del almacenamiento, para de esa manera visualizar la interacción entre variables y entre tratamientos.

En la CP 1, los atributos sensoriales sabor nuez, gusto dulce, y el indicador químico carotenoides se posicionaron en el lado izquierdo del biplot, mientras que, los atributos e indicadores químicos, volátiles y sensoriales relacionados al deterioro lipídico como, sabor oxidado, cartón, TC, DC, IP, hexanal, pentanal, nonanal y 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano se posicionaron del lado izquierdo. El tratamiento NMC se posicionó del lado izquierdo, por lo cual, se encontró relacionado con los atributos e indicadores relacionados a una mejor conservación de la nuez (sabor nuez, dulce y carotenoides) que presentando asociaciones positivas entre ellos. Esto nuevamente indica el poder de esta cubierta en la preservación sensorial y de la composición química de los granos de nuez durante el almacenaje. El tratamiento NC tuvo mucho peso en la CP 1, pero, en este caso, se posiciono del lado derecho, donde se encontraron los indicadores de deterioro químico (TC, IP y DC), compuestos volátiles (nonanal, pentanal, nonanal, 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano y atributos sensoriales negativos (sabor oxidado, cartón, intensidad de color). Estos atributos presentaron interacciones muy fuertes entre sí.

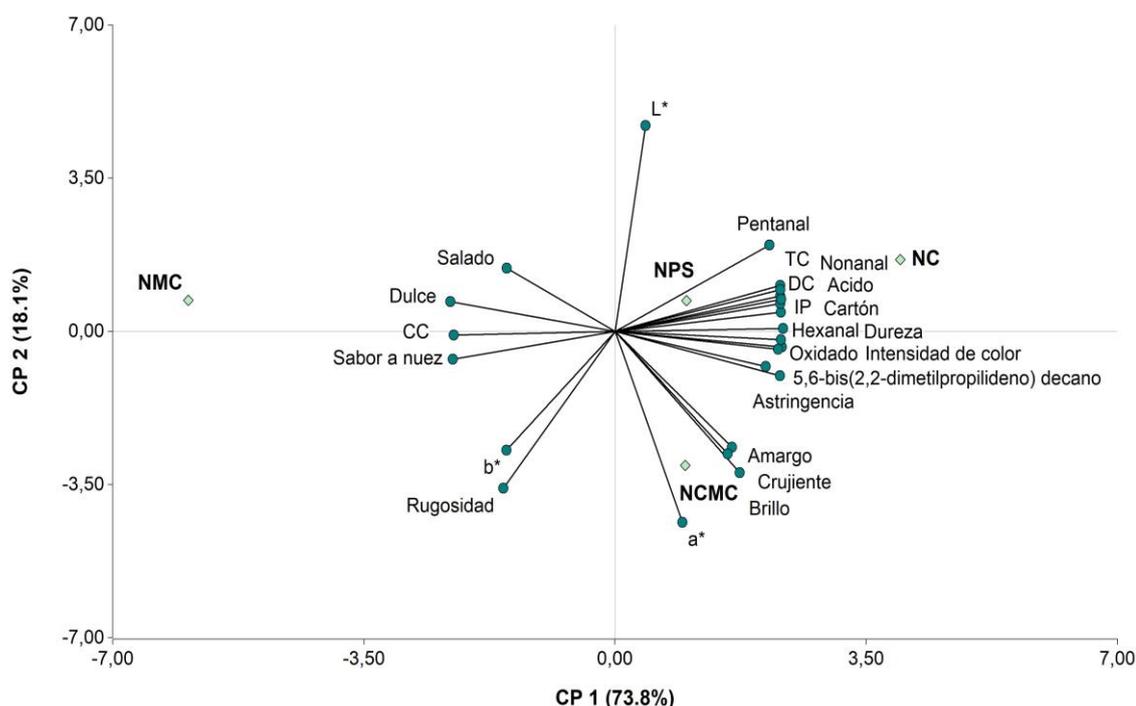
Los tratamientos NPS y NCMC se localizaron en el lado derecho del biplot, en un punto intermedio entre NC y NMC. Analizando la CP2, el tratamiento NCMC mostró asociación positiva con rugosidad y b\*, mientras NCMC se posiciono de manera opuesta a L\*, esto se debió al incremento que tuvo para esta variable durante el almacenamiento.

El resultado de este ACP indica que las nueces sin cobertura (NC) desarrollaron un mayor grado de deterioro de su calidad en el tiempo, al estar relacionadas con indicadores

químicos IP, DC, TC que miden el grado de deterioro por la formación de compuestos primarios y secundarios de oxidación lipídica. También se relacionaron con compuestos volátiles como pentanal, hexanal, nonanal, 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno) decano, que son compuestos que aparecen en los alimentos por la oxidación secundaria de los lípidos. En cuanto a los atributos sensoriales, también se relacionaron con los atributos sabor oxidado, cartón e intensidad de color que son representativos de las reacciones del deterioro de la calidad sensorial del producto. En contraste, la cubierta a base de MC demostró proveer una mejor protección de las nueces contra el deterioro sensorial, ya que estuvo relacionada con el sabor nuez y el sabor dulce, además mostró una mejor protección de los carotenoides del alimento. Las otras cubiertas (CMC y PS) también presentaron un efecto protector, sin embargo, el mismo fue inferior al ser comparado con la cubierta de MC.

Las asociaciones entre variables fueron confirmadas en el estudio de las correlaciones (Pearson). Se pudieron comprobar muchas correlaciones significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las variables medidas. Una correlación positiva muy fuerte se dio entre pentanal con hexanal (0,93) y también entre hexanal con nonanal (0,84). Otros estudios previos han encontrado, también, correlaciones positivas entre hexanal y nonanal. Un ejemplo es aquel estudio de almacenaje realizado sobre almendras con y sin cubiertas comestibles en el cual se obtuvo un valor de correlación de 0,82 (Larrauri *et al.*, 2016). Otras variables químicas, también, tuvieron correlación positiva como por ejemplo DC con TC (0,86) o IP con DC (0,89). En un trabajo llevado a cabo por Martín *et al.* (2016) observaron correlaciones superiores a 0,65 entre los indicadores IP y CD, en un estudio de almacenaje de maníes utilizando distintos tipos de envases. Asensio *et al.* (2011) encontró una correlación entre IP y CT en un estudio de estabilidad realizado sobre aceite de oliva usando aceites esenciales como antioxidantes. Volviendo a este estudio, algunas variables sensoriales tuvieron marcada correlación como sabor oxidado con los atributos sabor cartón (0,89), sabor nuez (-0,98), intensidad de color (0,79) y gusto dulce (-0,80). Las correlaciones más fuertes entre variables compuestos volátiles de oxidación con sensoriales fueron entre pentanal con los atributos sabor nuez (-0,93) y sabor oxidado (0,91), y entre hexanal con el atributo color (0,83). Adicionalmente, se encontraron correlaciones entre indicadores químicos de oxidación con volátiles como IP con pentanal (0,90) y entre indicadores químicos con variables sensoriales como TC con sabor nuez (0,81), IP con

sabor oxidado (0,95) y carotenoides con sabor oxidado (-0,65) y con sabor nuez (0,66). Quiroga *et al.* (2014) reportó una correlación positiva entre contenido de hexanal e IP en un estudio de almacenaje sobre semillas de girasol adicionadas con aceites esenciales como antioxidantes naturales. Riveros *et al.* (2013) también describió una correlación significativa entre el indicador IP con el atributo sabor oxidado (0,93), en un estudio de almacenamiento de maní tostado recubierto con películas comestibles.

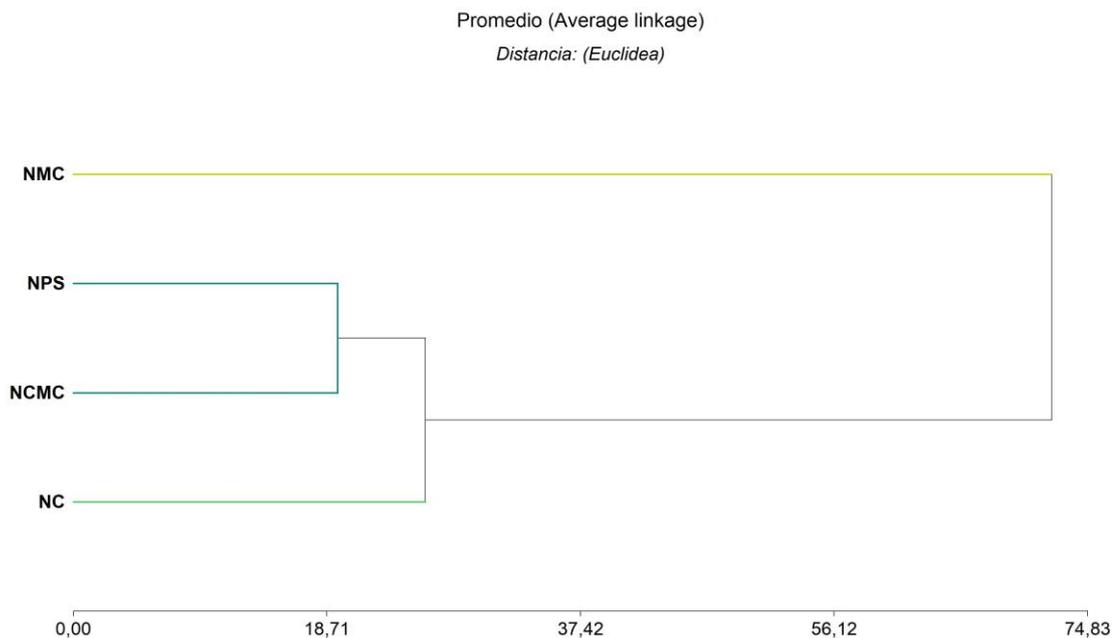


**Fig. 2.4.** Biplot de las componentes 1 y 2 provenientes del análisis de componentes principales. Variables: intensidad de color, rugosidad, brillo, oxidado, cartón, sabor nuez, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza, IP, DC, TC, CC, a\*, b\*, L\*, pentanal, nonanal, hexanal y decano, 5,6-bis(2,2-dimetilpropilideno). Tratamientos: nueces no recubiertas (NC) y nueces con la adición de cubiertas comestibles de carboximetilcelulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS) almacenadas por 210 días a temperatura ambiente.

## Análisis de conglomerados

El resultado del análisis de conglomerados, considerando las variables dependientes fisicoquímicas, volátiles y sensoriales, está representado en un dendograma (**Fig. 2.5**). Tres grupos fueron identificados en el análisis. El grupo 1 estuvo conformado por NC, el grupo

2 por las muestras NCMC y NPS, y el grupo 3 por la muestra NMC. Estos resultados indican que la muestra control, la cual experimentó los cambios más grandes durante el almacenamiento y la que sufrió la mayor oxidación, fue distinta al resto de los tratamientos. Basado en los indicadores medidos, los tratamientos NCMC and NPS mostraron un comportamiento intermedio y muy similar entre sí. El tratamiento NMC se encontró solo en el grupo 3 debido a que sufrió los menores cambios en las variables durante el almacenamiento. Este resultado coincidió con lo obtenido en ACP, en el cual el tratamiento NMC fue el que se encontró más separado de los otros tratamientos en el biplot y se localizó de manera opuesta en el gráfico con respecto a los indicadores de oxidación lipídica.



**Fig. 2.5.** Dendrograma obtenido del análisis de clúster de las nueces no recubiertas (NC) y con la adición de cubiertas comestibles de carboximetil-celulosa (NCMC), metil-celulosa (NMC) y proteína del suero de la leche (NPS), almacenadas durante 210 días a temperatura ambiente.

## CONCLUSIONES

El uso de cubiertas comestibles de CMC, MC y PS prolonga la vida útil de los granos de nuez al preservar sus propiedades, físicas, químicas, y sensoriales.

La cubierta comestible MC tiene un efecto superior con respecto al resto de las cubiertas, en la prevención del deterioro en las nueces, ya que consigue disminuir la pérdida de intensidad de los atributos positivos para el producto y produce un menor incremento de los atributos negativos. Sin embargo, este recubrimiento tiene un impacto negativo en la aceptabilidad de color por parte de los consumidores, sin afectar de manera marcada la aceptabilidad del sabor.

Desde el punto de vista de la calidad química dada por los parámetros indicadores de oxidación lipídica y la formación de compuestos volátiles, la cobertura de MC ayuda a preservar las nueces dado que estos parámetros incrementan a menor velocidad durante el almacenamiento, mientras que el contenido de carotenoides disminuye más lentamente.

Por lo tanto, se puede concluir que el uso de cubiertas comestibles, principalmente aquellas elaboradas con MC, pueden ser utilizadas por la industria como un método alternativo para prolongar la vida útil de las nueces.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah I.B., Tlili N., Martinez-Force E., Rubio A.G.P., Perez-Camino M.C., Albouchi A. and Boukhchina S. 2015. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry* 173: 972-978.
- American Association of Cereal Chemists (AACC). 2000. *Approved Methods of the AACC*. (10 ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Estados Unidos.
- Ancin Azpilicueta M.C. y Martínez Remírez M.T. 1991. Estudio de la degradación de los aceites de oliva sometidos a fritura. I . Determinación estadística del parámetro que mejor cuantifica esta degradación. *Grasas y Aceites* 42: 22-31.
- AOAC. 2010. *Official methods of analysis of the AOAC*. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2011. Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science* 76: 445-450.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2013. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science & Technology* 48: 2417-2428.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2012. Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. *Journal of Food Science* 77: 294-301.
- Baysal T. and Demirdoven A. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 491-496.
- Boskou D. and Elmadfa I. 2011. *Frying of food: oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos, 318 pp.
- Bourtoom T. 2008. Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15: 237-248.
- Bravin B., Peressini D. and Sensidoni A. 2006. Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering* 76: 280-290.
- Christopoulos M.V. and Tsantili E. 2012. Storage of fresh walnuts (*Juglans regia* L.) - Low temperature and phenolic compounds. *Postharvest Biology and Technology* 73: 80-88.
- Christopoulos M.V. and Tsantili E. 2011. Effects of temperature and packaging atmosphere on total antioxidants and colour of walnut (*Juglans regia* L.) kernels during storage.

Scientia Horticulturae 131: 49-57.

- Chung K.H., Shin K.O., Hwang H.J. and Choi K.S. 2013. Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. *Nutrition Research and Practice* 7: 82-88.
- COI. 2001. Método de análisis prueba espectrofotométrica en el ultravioleta. Document COI/T 20/Doc n° 19/Rev 1. Madrid, España: International Olive Oil Council (IOOC).
- Crowe T.D., Crowe T.W., Johnson L.A. and White P.J. 2002. Impact of extraction method on yield of lipid oxidation products from oxidized and unoxidized walnuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 453-456.
- InfoStat. 2016. Infostat/Profesional, versión 2016p. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C. and Oliveira L. 2014. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards - effect of storage temperature and time. *Food Chemistry* 156: 37-41.
- Downs M.L., Baumert J.L., Taylor S.L., Mills E.N.C. 2016. Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *Journal of Proteomics* 142: 62-69.
- Elmore J.S., Nisyrios I. and Mottram D.S. 2005. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 20: 501-506.
- Gayol M.F., Pramparo M.C., Nepote V., Fernandez H. and Grosso N.R. 2013. Optimization of the protein concentration process from residual peanut oil-cake. *Grasas y Aceites* 64: 489-496.
- Gayol M.F., Soliani S., Quiroga P.R., Nepote V. and Grosso N.R. 2009. Effect of prickly pear and algarrobo pod syrup coatings on consumer acceptance and stability of roasted almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2415-2420.
- Ghanbarzadeh B. and Almasi H. 2011. Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 48: 44-49.
- Gontard N., Guilbert S. and Cuq J.L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science* 57: 190-195.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2017. Sensory Quality Preservation of Coated Walnuts. *Journal of Food Science* 82: 185-193.
- Grosso N.R. and Resurreccion A.V.A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science* 67: 1530-1537.
- Guckian S., Dwyer C. and O'Sullivan M. 2005. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey

- protein solutions. *Food Hydrocolloids* 223: 91-93.
- Han J.H. and Krochta J.M. 2007. Physical properties of whey protein coating solutions and films containing antioxidants. *Journal of Food Science* 72: 308-314.
- Huber K.C. and Embuscado M. 2009. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Ed. Springer Media, New York, Estados Unidos, 416 pp.
- Iannamico L. 2015. *Cultivo del Nogal*. Eds. INTA, Allen, Río Negro, Argentina, 11 pp.
- Jensen P. and Sørensen G. 2001. Evaluation of quality changes in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5790-5796.
- Labuckas D.O., Maestri D.M., Perelló M., Martínez M.L. and Lamarque A.L. 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry* 107: 607-612.
- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygadlo J., Grosso N.R. and Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1751-1757.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2016. Chemical and Sensory Quality Preservation in Coated Almonds with the Addition of Antioxidants. *Journal of Food Science* 81: 208-215.
- Lund M.N. and Ray C.A. 2017. Control of Maillard reactions in foods: strategies and chemical mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 4537-4552.
- Maftoonazad N. and Ramaswamy H.S. 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Science and Technology* 38: 617-624.
- Manzocco L., Mastrocola D., Nicoli M. C. and Marangoni V. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science Technology* 11: 340-346.
- Martín M.P., Nepote V. and Grosso N.R. 2016. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. *LWT - Food Science and Technology* 68: 174-182.
- Martínez M., Barrionuevo G., Nepote V., Grosso N.R. and Maestri D. 2011. Sensory characterisation and oxidative stability of walnut oil. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 1276-1281.
- Martínez M.L., Penci C.P., Ixtaina V., Ribotta P.D. and Maestri D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology* 51: 44-50.

- Mehyar G.F., Al-Ismaïl K., Han J.H. and Chee G.W. 2012. Characterization of edible coatings consisting of pea starch, whey protein isolate, and Carnauba wax and their effects on oil rancidity and sensory properties of walnuts and pine nuts. *Journal of Food Science* 77: 52-59.
- Meilgaard M., Civille G. and Carr T. 2006. *Sensory Evaluation Techniques*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 416 pp.
- Minguez-Mosquera I.M., Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas B., Sanchez-Gomez A.H. and Garrido-Fernandez J. 1991. Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68: 332-336.
- Montalvo C., López Malo A. y Palou E. 2012. Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 2: 32-46.
- Moslehi Z., Garmakhany A.D., Araghi M. and Moslehi M. 2015. Effect of methyl cellulose coating on physicochemical properties, porosity, and surface diameter of pistachio hull. *Food Science & Nutrition* 3: 355-361.
- Nepote V., Mestrallet M.G. and Grosso R. 2004. Natural antioxidant effect from peanut skins in honey-roasted peanuts. *Journal of Food Science* 69: 295-300.
- Nepote V., Olmedo R., Mestrallet M.G. and Grosso N.R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science* 74: 1-8.
- Nursten H. E. 2005. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications*. Ed. Royal Society of Chemistry, Gran Bretaña, 214 pp.
- O'Brien R. D. 2009. *Fats and oils, formulating and processing for applications*. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 744 pp.
- Olmedo R.H., Asensio C.M., Nepote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2128-2136.
- Özrenk K., Javidipour I., Yarilgac T., Balta F., Gündogdu M. 2012. Fatty acids, tocopherols, selenium and total carotene of pistachios (*Pistacia vera* L.) from Diyarbakir (Southeastern Turkey) and walnuts (*Juglans regia* L.) from Erzincan (Eastern Turkey). *Food Science and Technology International* 18: 55-62.
- Pei Y., Yang J., Liu P., Xu M., Zhang X. and Zhang L. 2013. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. *Carbohydrate Polymers* 92: 1752-1760.
- Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A. and Estevinho L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2103-2111.

- Perez-Gago M.B., Serra M., Alonso M., Mateos M., del Rio M.A. 2005. Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology* 36: 77-85.
- Plemmons L.E. and Resurreccion A. 1998. A warm up sample improves reliability of responses in descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies* 13: 359-376.
- Quiroga P.R., Asensio M. and Nepote V. 2014. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 471-479.
- Quiroga P.R., Grosso N.R. and Nepote V. 2013. Antioxidant Effect of Poleo and Oregano Essential Oil on Roasted Sunflower Seeds. *Journal of Food Science* 78: 1904-1912.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Quiroga P.R., Nepote V. and Grosso N.R. 2013. Preserving sensory attributes of roasted peanuts using edible coatings. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 850-859.
- Riveros C.G., Nepote V. and Grosso N.R. 2016. Thyme and basil essential oils included in edible coatings as a natural preserving method of oilseed kernels. *Journal of Science of Food and Agriculture* 96: 183-191.
- Sabaghi M., Maghsoudlou Y., Khomeiri M. and Ziaifar A.M. 2015. Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology* 110: 224-228.
- Salcedo C.L., López de Mishima B., Nazareno M. 2010. Walnuts and almonds as model systems of foods constituted by oxidisable, pro-oxidant and antioxidant factors. *Food Research International* 43: 1187-1197.
- Seacheol M. and Krochta J.M. 2007. Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2964-2969.
- Shahidi F., Arachchi J.K.V. and Jeon Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10: 37-51.
- Stone H. and Sidel J.L. 2004. *Sensory evaluation practices*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Holanda, 377 pp.
- Sze-Tao K.W.C. and Sathe S.K. 2000. Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1393-1401.
- Tapia M.I., Sanchez-Morgado J.R., García-Parra J., Ramírez R., Hernández T., González-Gómez D. 2013. Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 232-237.
- Van Vliet T., Lakemond C.M.M. and Visschers R.W. 2004. Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9: 298-304.

- Wambura P., Yang W., Walker L.T., Wang Y. and Williams L. 2008. Improvement of oxidative stability of roasted peanuts by edible coatings and ultrasonication. *Journal of Food Processing and Preservation* 32: 469-485.
- Yousuf B., Qadri O.S. and Srivastava A.K. 2018. Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology* 89: 198-209.
- Zwarts L., Savage G. and McNeil D.L. 1999. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 189-194.

## CAPITULO III

# EXTRACCIÓN, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES DE LA HARINA DE NUEZ

## INTRODUCCIÓN

Como se mencionó previamente en el capítulo II, las nueces son un alimento de origen vegetal, muy apreciado a nivel mundial por sus características sensoriales y sus propiedades benéficas para la salud (Fukuda *et al.*, 2003; Grosso *et al.*, 2017). Este fruto seco, es comúnmente utilizado en productos de panadería, barras de cereal, en alimentos gourmet, como ingrediente en algunos tipos de snacks o simplemente como postre (López-Calleja *et al.*, 2015). El aceite de nuez solo se puede extraer en pequeña escala, y es utilizado, principalmente, como condimento de ensaladas o para cocinar productos de pastelería. También, suele ser utilizado en la industria de la cosmética como un componente importante en la síntesis de cremas, productos antiarrugas y antiedad (Martínez *et al.*, 2011).

La nuez es considerada un alimento muy nutritivo debido a su alto contenido de lípidos, proteínas, vitaminas y minerales (Slatnar *et al.*, 2015). El contenido de lípidos de este fruto seco varía entre 52 a 72% dependiendo del cultivar, localización geográfica y tasa de irrigación (Zwarts *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2006; Slatnar *et al.*, 2015). Como la mayoría de los frutos secos, las nueces son un recurso importante de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs: 69,55-75,54% del aceite según Pereira *et al.* (2008)), donde predominan los ácidos linoleico y linolénico (Slatnar *et al.*, 2015). Los PUFAs han sido previamente asociados a propiedades promotoras de la salud, al reducir el riesgo de contraer enfermedades relacionadas con el estilo de vida, entre ellas, las cardiovasculares (Estruch *et al.*, 2013). También, se conoce que el consumo de aceite de nuez reduce el colesterol en sangre, al disminuir el nivel de lipoproteínas de baja densidad, aumentando

las de alta densidad. Este efecto, es además acompañado por una disminución del nivel de triglicéridos totales (Liang *et al.*, 2013). Sin embargo, como se mencionó en el capítulo II, la presencia de estos ácidos grasos (PUFAs) limitan la vida útil de las nueces y de sus subproductos, debido a su alta susceptibilidad a la oxidación lipídica. Esta oxidación ocurre durante el almacenamiento y desmejora sus propiedades nutricionales, sensoriales y fisicoquímicas, y como consecuencia su valor económico (Grosso *et al.*, 2017; Grosso *et al.*, 2018).

Además de los lípidos, la nuez contiene cantidades significativas de proteína cruda (15.17–19.24%), carbohidratos (8.05–13.23%) y otros compuestos bioactivos como esteroides, fibra dietaria y compuestos fenólicos (Regueiro *et al.*, 2014). Estudios Recientes han descubierto que las nueces contienen diversos grupos de polifenoles, compuestos principalmente por taninos (Ito *et al.*, 2007). La mayoría de estos compuestos contribuyen con la actividad antioxidante cuando se preparan extractos de los granos de nuez. Estos compuestos, se encuentran en altas concentraciones en el tegumento de la nuez y están, además, asociados a propiedades antiinflamatorias y antimutagénicas. La proporción de estos compuestos, en la nuez, está fuertemente influenciada por factores como temperatura, precipitación, causas naturales (infección, daño, pestes), madurez y condiciones de almacenamiento (Slatnar *et al.*, 2015).

Como se vio en el capítulo I, las reacciones de oxidación lipídica en los alimentos generan la síntesis de radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes actúan deteniendo estas reacciones al secuestrar los radicales libres e inhibir otras reacciones, pero, como consecuencia se oxidan durante el proceso (Belitz *et al.* 2009). Por este motivo, la adición de antioxidantes en alimentos ricos en lípidos es una manera simple de reducir las reacciones de oxidación lipídica. El desarrollo y uso de antioxidantes sintéticos, como el butil-hidroxitolueno (BHT) y el hidroxibutilanisol (BHA), en un principio fue visto como uno de los aspectos del progreso tecnológico. Luego, a finales del siglo 20, se comenzó a pensar en su uso con una mirada más escéptica (Berdahl *et al.*, 2010), principalmente debido a la asociación de algunos de estos con el desarrollo de cáncer en animales (Hudson, 1990). El BHT, es uno de los antioxidantes sintéticos más utilizados en alimentos por su alta eficacia, pureza y su bajo costo. Sin embargo, la inocuidad de este aditivo ha sido fuertemente cuestionada. En

oposición, los antioxidantes de origen natural son más aceptados por los consumidores al ser percibidos como productos inocuos, lo cual conllevó a que las industrias comiencen a interesarse por estos. Varios antioxidantes naturales han demostrado ser efectivos al actuar contra la oxidación de varios alimentos ricos en lípidos, como el aceite esencial de orégano, en la preservación del aceite de oliva (Asensio *et al.*, 2011), los polifenoles del tegumento de maní aplicados a través de cubiertas comestibles sobre almendras tostadas (Larrauri *et al.*, 2016a), extracto de té aplicado en cubiertas comestibles de quitosano en nueces (Sabaghi *et al.*, 2015), etc. Sin embargo, la industria de los alimentos está prestando atención a los serios problemas de alergias de muchos consumidores a determinados productos. Esto se traduce en el establecimiento de regulaciones más fuertes con respecto al apropiado etiquetado de los alimentos, y en la búsqueda de minimizar la contaminación cruzada de los alérgenos entre los alimentos durante los procesos de fabricación (López-Calleja *et al.*, 2015). En consecuencia, el uso de antioxidantes que tienen el mismo origen que el alimento en el cual van a ser aplicados es una gran ventaja para la industria.

Debido al incremento en la producción de nuez y a la demanda de nuevos aceites especiales (Martínez *et al.*, 2011), sumado a las propiedades del aceite de nuez (altamente susceptible a la degradación lipídica por presencia de oxígeno, altas temperaturas, luz, humedad ambiente, catalizadores, entre otros) (Liang *et al.*, 2013), lo convierte en un buen sustrato para la incorporación de antioxidantes. Considerando que los polifenoles de las nueces podrían exhibir actividad secuestrante de radicales libres, el uso de estos podría mejorar la estabilidad del aceite de la nuez y su calidad, cuidando la inocuidad del alimento y el bienestar del consumidor. Adicionalmente, los polifenoles obtenidos podrían ser utilizados como antioxidantes en otros alimentos ricos en lípidos.

El *objetivo* del presente capítulo fue extraer compuestos polifenólicos de la harina de nuez, determinar su composición química, actividad antioxidante y efecto preservante en el aceite de nuez.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

Aceite de nuez prensado en frío ‘VitaNuss’ y las nueces mariposa de variedad Chandler, cosechadas en el año 2015, provistas por Los Nogales SRL, La Rioja, Argentina. Las nueces fueron utilizadas para la obtención de los extractos ricos en polifenoles.

## MÉTODOS

### Extracción de la fracción fenólica

Los extractos ricos en polifenoles utilizados en las muestras fueron obtenidos de la siguiente manera: nueces mariposa fueron procesadas y luego desengrasadas utilizando n-hexano, en un *Soxhlet*, por 10 horas. Luego la fracción hidrocarbonada, donde están contenidos los polifenoles, fue extraída de la torta de nueces desengrasadas usando un agitador magnético con una solución de etanol-agua (70:30 v/v) por 24 horas a temperatura ambiente ( $23\pm 1$  °C) (Nepote *et al.*, 2004; Larrauri *et al.*, 2016b). La fracción obtenida fue filtrada para evitar la incorporación de fragmentos de nuez, y luego, el solvente fue removido por evaporación bajo presión reducida. Finalmente, la fracción fue purificada mediante una partición utilizando agua destilada y acetato de etilo como solventes. El acetato de etilo fue elegido por que los compuestos fenólicos son conocidos por tener una buena solubilidad en el mismo (Nepote *et al.*, 2004). Primero se realizó una disolución de la fracción en agua destilada y luego se agregó acetato de etilo a la solución (50% v/v). Esta mezcla se colocó en una ampolla de separación para obtener dos fases, que fueron colocadas en recipientes separados. En la fase compuesta por la solución de acetato de etilo, se realizó una remoción del solvente mediante evaporación bajo presión reducida a 40 °C (Larrauri *et al.*, 2016b). El extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo se denominó PAE. Mientras que, la fase compuesta por la solución con agua destilada fue liofilizada para obtener un extracto seco (Pizzolitto *et al.*, 2012). El extracto acuoso seco

de polifenoles se denominó PH. Todos los extractos fueron almacenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en freezer.

### **Determinación de fenoles y flavonoides totales**

Se realizó la medición de fenoles totales en ambos extractos (PAE y PH) usando el método de Folin-Ciocalteu (F-C). Para ello, se colocó en un tubo de ensayo 0,1 mL de la muestra, 8,4 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y 0,5 mL de reactivo de F-C. Se mezcló la solución, se esperaron 1-8 min y se agregó 1 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 g/100 mL de agua destilada) agitando vigorosamente. Al cabo de una hora se registró la absorbancia. Como muestra se utilizaron los extractos PAE (0,0050 g + 1 mL de etanol), PH (0,0050 + 1 mL etanol-agua 70:30), y se utilizaron 2 blancos, uno con 1 mL de etanol y otro con 1 mL de etanol-agua, respectivamente. La absorbancia de la muestra se midió usando un espectrofotómetro (Spectrum SP-2100, Zhejiang, China) a una longitud de 760 nm. Se utilizó ácido gálico (GAE) como estándar para la realización de una curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg GAE/g muestra.

El contenido de flavonoides totales se determinó en ambos extractos (PAE and PH) usando el método de  $\text{AlCl}_3$  (Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Primero se prepararon las soluciones madres con las muestras PAE (se pesaron 0,0025 g del extracto y se le adicionó 1 mL etanol) y PH (se pesaron 0,0503 g del extracto y se adicionó 1 mL de etanol-agua). De cada solución madre se extrajeron 150  $\mu\text{L}$  y se colocaron en tubos de ensayo. Posteriormente se agregaron 1,350 mL de etanol para PAE y de etanol-agua para PH para alcanzar un volumen final de 1,5 mL. Luego, se agregaron iguales cantidades de solución 2% de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 g en 100 mL agua). Para el blanco, se realizaron 3 repeticiones de 1,5 mL alcohol + 1,5 mL de solución 2% de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . La medición de la absorbancia se realizó luego de 10 minutos de incubación a una longitud de onda de 367 nm. La curva de calibración se preparó usando quercetina (QE) y los resultados fueron expresados en mg QE/g muestra.

## **Ensayo o *test* de DPPH**

La actividad secuestrante de radicales (RSA) de ambos extractos fue determinada usando radical difenil picril hidrazil (DPPH). Primero, se preparó una solución de DPPH pesando 0,002g en un matraz de 100 mL y completando el volumen con etanol (20 ug/mL). Luego, se prepararon las soluciones madres pesando 0,005 g de extracto (PAE y PH) y agregando 1 mL de etanol. A partir de esta solución se prepararon 9 diluciones seriadas de ½ (500 µL de solución + 500 µL de etanol), agitando vigorosamente cada una de ellas, conformando 10 muestras. Se preparó la gradilla con un blanco de DPPH (950 µL de solución de DPPH + 50 µL de etanol) y las 10 muestras restantes (950 µL de solución de DPPH + 50 µL de muestra). La absorbancia de las muestras fue medida a 517 nm a los 20 minutos de preparadas. La capacidad secuestrante de radicales se calculó usando la siguiente formula: % RSA =  $[1 - (\text{absorbancia de DPPH con la muestra} - \text{absorbancia de la muestra}) / \text{absorbancia del DPPH}] \times 100$ . La concentración inhibitoria del 50% (IC50) fue calculada usando la ecuación obtenida de la curva formada a partir del porcentaje de inhibición vs la concentración final de los extractos (Quiroga *et al.*, 2011).

## **Test o ensayo de ABTS**

Un método modificado de Re *et al.* (1999) fue utilizado de acuerdo con (Asensio *et al.*, 2015). Se pesó el reactivo ABTS (0,0384 g), el persulfato de potasio (0,0066 g) y se adicionaron 10 mL de etanol. A las 24 horas se midió la absorbancia a 734 nm y se corroboró que fuera un valor entre 0,72-0,68 (absorbancia  $0.7 \pm 0.02$ ). Luego, se conformaron las muestras; 0,05 g del extracto PAE en 1 mL de etanol y 0,0503 g del extracto PH en 1 mL de etanol-agua. Luego, se tomaron 10 µL de las muestras y se le adicionaron 990 µL de la solución de ABTS. Se agitó la solución y se reservó por 25 minutos hasta su medición. La concentración de Trolox (mg/g) de los extractos de polifenoles (PAE and PH) fue calculada usando la inhibición de la absorbancia del catión radical ABTS+ a 734 nm, mediante una curva de calibración con Trolox estándar.

## **Actividad quelante del ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>)**

Actividad quelante del Fe<sup>2+</sup> de los extractos fue determinada según lo establecido por Yamaguchi *et al.* (2000). Primero se prepararon las soluciones madres de las muestras, pesando 0,0125 g de PAE y 0,0504 g de PH, y adicionando 1 mL de etanol y etanol-agua (70:30), respectivamente. Luego, se realizó una solución con 0,25 mL de FeSO<sub>4</sub> y 0,25 mL de solución madre, ambas conteniendo 1% de dodecil sulfato de sodio. A esta solución se le adicionaron 0,5 mL de buffer tris-HCL, 0,5 mL de solución de 2,2'-bipiridil junto con 0,4 mL de hidroxilamina-HCL, 0,6 mL de agua Milli-Q, y 2,5 mL de etanol. Con la solución previamente mencionada, se realizaron distintas diluciones de 200, 100, 40 y 30 µL, completando un volumen de 2 mL con dodecil sulfato de sodio. Para el análisis, se preparó el blanco de reactivos, el cual, en vez de utilizar muestra, se utilizó etanol. Adicionalmente, por cada dilución se realizó un blanco que se reemplazó el uso de agua Milli-Q por hidroxilamina. Las diluciones, una vez preparadas, se agitaron con vortex y se midieron 10 minutos después de su agitación. La medición se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de 522 nm. Se utilizó EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Biopack, Buenos Aires, Argentina) para realizar una curva de calibración. La habilidad para quelar el ion hierro fue expresado como equivalentes de EDTA.

## **Test de oxidación acelerada del aceite de nuez**

La actividad antioxidante de los extractos fue también evaluada mediante una prueba de oxidación acelerada, utilizando BHT compuesto sintético de alto poder antioxidante a modo de tener un control positivo con que comparar. Los extractos obtenidos de la nuez (PAE y PH) y el antioxidante comercial (BHT) fueron adicionados en el aceite de nuez en las siguientes concentraciones: 0,1% (w/w) PAE (WPAE), 0,1% PH (WPH), y 0.02% (w/w) BHT (WBHT). También, se preparó un tratamiento de aceite de nuez sin antioxidante ni polifenoles (muestra control: WC). Las muestras se almacenaron en tubos de ensayo a 60±1 °C por un período de 16 días. El diseño experimental consistió en 4 tratamientos (WC, WPAE, WPH, y WBHT) x 3 repeticiones x 5 períodos de tiempo. Las variables independientes analizadas en las muestras extraídas en cada período fueron 4

indicadores químicos (índice de peróxidos, contenido de carotenoides, dienos y trienos conjugados) y 9 compuestos volátiles (hexanal, nonanal, butanal, (E)-2-heptenal, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno, 2-propilfurano, d-limoneno, butil-hidroxitolueno).

### **Análisis químicos del aceite de nuez**

El índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC) y contenido de carotenoides (CC) corresponden a indicadores químicos de deterioro de los lípidos. Estos se midieron de acuerdo a lo descrito en el capítulo II:

### **Compuestos volátiles**

Se realizó, al igual que en el capítulo II, un análisis mediante el sistema de microextracción en fase sólida de acuerdo con lo realizado por Larrauri *et al.* (2016a) y Martín *et al.* (2016). Las muestras de aceite de nuez fueron pesadas (2 g) y colocadas en viales de vidrio a 70 °C por 20 min. La fibra (Carboxen/polydimethylsiloxane, PDMS 75 µm, Stable Flex, 1-cm long, Supelco) fue expuesta en el espacio de cabeza del vial por 10 min y luego inyectada al cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 600) acoplado con un detector de masa. La columna utilizada fue la ELITE 5MS (30 \* 0,25 mm i.d., 0,25 mm film de espesor; Perkin Elmer). Para la temperatura del horno se utilizó un programa de la temperatura con 2 rampas de calentamiento. Se inició la corrida a una temperatura de 40 °C durante 3 minutos, en la primera rampa se incrementó 10 °C/min hasta alcanzar los 100 °C, y luego comenzó una segunda rampa de 15 °C/min y manteniendo la última temperatura por 2 minutos antes de finalizar la corrida. Se utilizó helio como gas portador a una presión constante de 38.1 psi y un caudal de 0,9 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y el tiempo para la desorción de la fibra fue de 10 min en el modo *splitless* (1,5 min sin división del período). El tiempo total de la corrida fue 20.67 minutos y el método utilizado por el espectrómetro de masas fue el siguiente: MS Scan, tiempo de 0 a 20.67 minutos, Mass 50.00 a 300.00 EI+. La ionización para el análisis de masa se realizó por impacto electrónico a 70 eV. La identificación de los compuestos fue realizada de la misma manera que en el capítulo II.

Las respuestas cromatográficas de los compuestos volátiles detectados (cuentas electrónicas de las áreas de los picos: c.e.) fueron monitoreadas para poder conocer la concentración de los compuestos volátiles en las muestras.

### **Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron en 3 repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados con el software InfoStat, versión 2016p (InfoStat, 2016). Se calcularon medias y desvíos estándares, y se realizó análisis de la varianza bifactorial (factores: 'tratamiento' y 'tiempo') y DGC para detectar las diferencias significativas en las medias ( $\alpha = 0,05$ ). Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para explorar las asociaciones entre tratamientos y variables. Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación (coeficientes de Pearson) para confirmar y cuantificar las correlaciones entre las variables dependientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de fenoles y flavonoides totales

Se conoce que, los compuestos fenólicos se encuentran de manera natural y en altas concentraciones en las nueces y son los principales compuestos responsables de la estabilidad de sus lípidos durante el almacenamiento (Fu *et al.*, 2016). Según los resultados arrojados de la evaluación de ambas muestras, el extracto PAE presentó el contenido más alto de fenoles totales (230,45 mg GAE/g muestra) en relación con el extracto PH (41,40 mg GAE/g muestra) (**Tabla 3. 1.**). Kornsteiner *et al.* (2006) detectaron un nivel de 1625 mg GAE/100 g de compuestos fenólicos en nueces frescas, siendo este valor superior al resto de los frutos secos evaluados en el ensayo: castañas de caju < almendras con tegumento < avellanas < maní con tegumento < pistachos < nuez de pecan. Gharibzahedi *et al.* (2013) detectó diferentes valores de compuestos fenólicos en el aceite de nuez según el método de extracción utilizado. El método “Bligh–Dyer” (MBD), consiste en la extracción, a partir de la nuez molida, mediante una mezcla de solventes (180 mL de agua, 200 mL metanol y 100 mL cloroformo), mientras que, el método “Maceration extraction” (MAC) consistió en un macerado usando n-hexano como solvente. Tales autores observaron que los valores más altos de fenoles se registraron en el aceite de nuez extraído por el método MBD (0,22 mg GAE/g), mientras que, el método MAC mostró un contenido más bajo (0,17 mg GAE/g).

Los flavonoides son muy valiosos para el tratamiento de varias enfermedades debido a su potente poder antioxidante (Middleton, 1998; Dryden *et al.*, 2006). Para este análisis, la muestra PAE también presentó un mayor contenido de flavonoides (49,85 mg QE/g muestra) (**Tabla 3.1.**) en relación con la muestra PH (20,00 mg QE/g muestra). Fu *et al.* (2016) demostró que, entre otros factores, el contenido final de flavonoides de las nueces estaba influenciado por los tres métodos de secado aplicados sobre la nuez. Los métodos de secado que evaluaron tales autores fueron los siguientes: secado por la luz solar por 60 horas; secado tradicional en estufa a 45° C por 60 horas; secado discontinuo en estufa a 35 °C por 5 horas, luego a 50 °C por 25 horas y finalmente a 30 °C por 30 horas. Según este estudio, mediante el método de secado discontinuo se obtuvo la mayor proporción de

flavonoides (1,07g QE/kg de nueces frescas) y fue seguido por secado directo en estufa (0,87 g QE/kg de nueces frescas), y secado por el sol (0,45 g QE/kg de nueces frescas).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la fracción PAE exhibió una mayor proporción de fenoles y flavonoides totales, por lo tanto, se evidencia una mayor solubilidad de estos compuestos en el solvente acetato de etilo. La presencia de estos compuestos podría proveerle una mayor actividad antioxidante al extracto, ya que, diversos estudios han demostrado que un mayor contenido de los mismos, en alimentos ricos en lípidos, proveen una mejor conservación de tales alimentos (Larrauri *et al.*, 2013).

### **Ensayo o *test* de DPPH**

El ensayo de DPPH mide la habilidad de determinadas sustancias con propiedades antioxidantes para secuestrar radicales libres (Slatnar *et al.*, 2015). Los extractos (PH y PAE) tuvieron la capacidad de reducir el radical estable DPPH de color violeta a su versión DPPH-H amarillo, exhibiendo un 50% de inhibición (IC50), con valores de 2,57 para PAE y 2,13 para PH (**Tabla 3.1.**). Un valor de IC50 más bajo indica que se produjo dicha inhibición con una menor proporción de muestra, lo cual equivale a una actividad antioxidante más alta. De acuerdo a esta afirmación, el extracto PH debería ser considerado el más eficiente para el secuestro de radicales libres de las muestras. A pesar de eso, ambos extractos presentaron valores muy similares para dicha actividad. Este resultado contrastó con lo presentado por Larrauri *et al.* (2016b) en un estudio sobre la extracción de polifenoles del tegumento de maní y la medición de su actividad antioxidante. En dicho trabajo, el extracto soluble en acetato de etilo de polifenoles de tegumento de maní tostado y de maní blanqueado demostraron un valor de IC50 inferior (2,09 y 1,51, respectivamente) al extracto soluble en agua de los mismos productos (5,62 y 3,03, respectivamente).

### ***Test* o ensayo de ABTS**

Comparado con el ensayo de DPPH, el *test* ABTS puede proveer una estimación de la actividad antioxidante más precisa para extractos tanto lipofílicos como hidrofílicos, como así también, para aquellos que presenten un nivel alto de pigmentación (Floegel

*et al.*, 2011). Según este *test*, el extracto PH mostró actividad antioxidante más alta en comparación con PAE (1136,96 y 1105,00 mg Trolox/g muestra, respectivamente) (**Tabla 3.1.**), sin embargo, las diferencias entre muestras no fueron tan altas, al igual a lo que ocurrió con el *test* DPPH, lo que puede indicar que ambas podrían presentar una actividad antioxidante bastante similar. Otros trabajos han evaluado la capacidad antioxidante de los polifenoles de las nueces usando el *test* ABTS. Entre ellos, Regueiro *et al.* (2014) reportó una cantidad de 25.7 mmol Trolox/100 g para un extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo.

### Actividad quelante del ion ferroso ( $Fe^{2+}$ )

La capacidad para quelar metales es un atributo importante en los antioxidantes, ya que reduce la concentración de metales de transición que catalizan la peroxidación lipídica. (Gülçin *et al.*, 2005). En el presente estudio, la actividad quelante del  $Fe^{2+}$  más marcada fue aquella observada en el extracto PAE (70,29 mg EDTA/g muestra), mientras que, el extracto PH solo exhibió una pequeña actividad (11,59 mg EDTA/g muestra) (**Tabla 3.1.**). Larrauri *et al.* (2016b) también describió que el extracto soluble en acetato de etilo proveniente del tegumento del maní exhibió una mejor capacidad para quelar el ion  $Fe^{2+}$  comparado con el extracto soluble en agua. De acuerdo con este resultado, el extracto PAE podría exhibir un mayor efecto protector contra la peroxidación lipídica.

**Tabla 3.1.** Medias y desvíos estándar de fenoles totales, flavonoides totales, ABTS, actividad quelante del ion ferroso y el IC50 del DPPH para los extractos de la nuez (PH y PAE).

Muestra <sup>1</sup>	Contenido de fenoles totales (mg GAE/g muestra) <sup>1,2</sup>	Contenido de flavonoides totales (mg QE/g muestra) <sup>1,2</sup>	ABTS: mg trolox/g muestra <sup>1,2</sup>	Actividad quelante del ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) mg EDTA/ g muestra <sup>1,2</sup>	IC50 (g/mL) <sup>1</sup>
					Actividad secuestrante de radicales libres: DPPH <sup>1,2</sup>
PH	41,39±1,89a	20,00±0,12a	1136,96±1,17b	11,59±0,19a	2,13±0,04a
PAE	230,45 ±2,04b	49,85±1,27b	1105,00±6,93a	70,29±0,56b	2,57±0,05b

<sup>1</sup>Abreviaciones. PH = extracto de polifenoles solubles en agua; PAE = extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo; GAE = equivalentes de ácido gálico/g extracto; QE = equivalentes de quercetina/g extracto; DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidracil; IC50 = actividad quelante/secuestrante requerida para inhibir el 50% radical/ion. <sup>2</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. ANOVA, DGC ( $\alpha = 0,05$ ; n = 3).

## **Test de oxidación acelerada del aceite de nuez**

### **Análisis químicos: IP, DC, TC y CC**

El IP representa uno de los métodos más tradicionales para la cuantificación de la rancidez por oxidación lipídica en las nueces y en otros tipos de frutos secos (Jensen y Sørensen, 2001). Según el Codex Alimentarius (CODEX STAN 210-1999), el límite de aceptabilidad del IP para aceites vegetales crudos es de 15 meqO<sub>2</sub>/kg aceite. En el presente estudio, el IP se incrementó para todos los tratamientos a lo largo del almacenamiento, superando ampliamente dicho valor de aceptabilidad límite. En el día 0 de almacenamiento, el valor medio de IP (**Fig. 3.1.a.**) para los tratamientos, fue de 6,30 meqO<sub>2</sub>/kg, sin presentar diferencias significativas entre estos ( $p > 0,05$ ). En el siguiente día de medición (día 4), el IP comenzó a incrementarse para todos los tratamientos. Durante este período, WPAE presentó el valor más bajo (9,32 meqO<sub>2</sub>/kg) en relación con el resto de los tratamientos: WC, WBHT y WPH (11,76; 12,97 y 12,03 meqO<sub>2</sub>/kg aceite de nuez, respectivamente). Finalmente, en el último día de medición (día 16), los tratamientos que presentaron el valor más bajo de IP fueron WPAE y WBHT (23,49 y 23,07 meqO<sub>2</sub>/kg, respectivamente) sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), mientras que, WPH presentó un valor intermedio (28,46 meqO<sub>2</sub>/kg) y WC el valor más alto (31,99 meqO<sub>2</sub>/kg). El extracto PAE expresó una actividad equivalente al antioxidante sintético BHT para el índice de peróxido, permitiendo con esto una mejor preservación del aceite que PH. En otros trabajos realizados sobre nuez, se ha podido confirmar el efecto protector de antioxidantes naturales y sintéticos, sobre la evolución del índice de peróxidos. Martínez *et al.* (2013) confirmó el efecto protector de 2 tipos de antioxidantes comerciales (tert-butilhidroquinona o TBHQ y palmitato de ascorbilo) y un antioxidante natural (extracto de romero) en el IP del aceite de nuez durante un almacenamiento a 25 °C. En dicho estudio, se pudo comprobar que, en el día 90 de almacenaje, el tratamiento con TBHQ (con 200 mg/g aceite) presentó un valor inferior de IP (1,31 meqO<sub>2</sub>/kg) comparado con el tratamiento con extracto de romero (800 mg/g aceite) que presentó 2,53 meqO<sub>2</sub>/kg, sin embargo, ambos presentaron una media sumamente inferior al tratamiento control (17,69 meqO<sub>2</sub>/kg). En otro estudio de almacenamiento (4 meses; 25 °C) realizado con aceite de nuez de la variedad Franquette se determinó que, a medida que se incrementaba el tiempo de

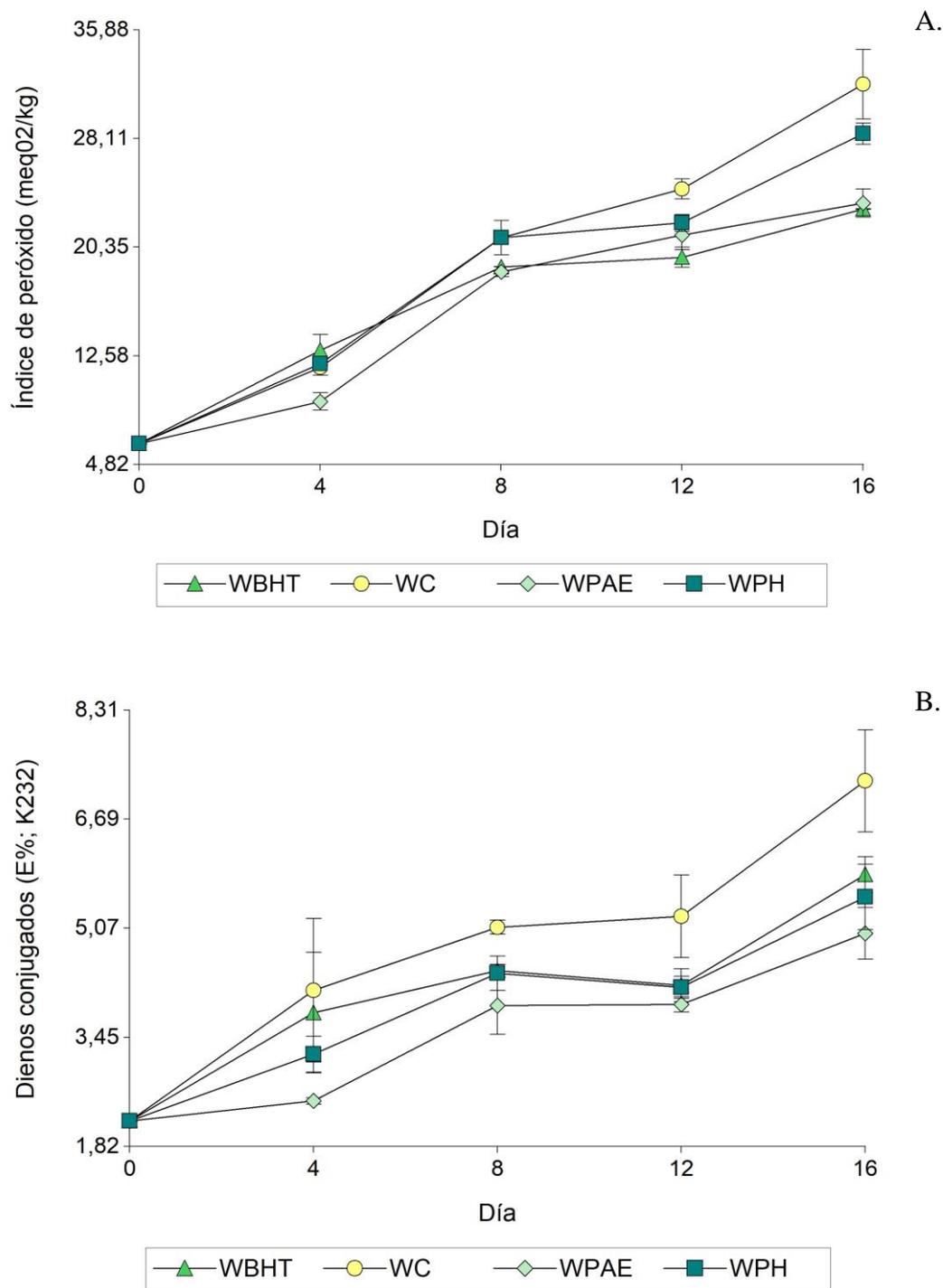
almacenamiento, se registraba un incremento lineal del IP, y junto con éste se aumentó la intensidad de sabor oxidado (Martínez *et al.*, 2011).

El coeficiente de extinción específico de las longitudes de onda 232 y 268 nm, también representado por las siglas K232 and K268, es un marcador sensible del deterioro lipídico de los aceites. Mientras que, K232 es un indicador de la formación de productos de oxidación primaria (DC), K268 refleja las concentraciones de productos de oxidación secundaria, principalmente TC y compuestos carbonilos (Ayadi *et al.*, 2009). Con respecto al indicador DC (**Fig. 3.1.b.**), los tratamientos presentaron una media inicial (día 0) de 2,20 sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En el segundo momento de medición (día 4), los valores de DC comenzaron a incrementarse para todos los tratamientos. En este período, WPAE y WPH presentaron los valores más bajos (DC de 2,50 y 3,20, respectivamente), mientras que WBHT y WC exhibieron los valores más altos (DC 2,50 y 3,20, respectivamente). En el último día de medición (día 16), el tratamiento control (WC) fue el que acumuló una mayor proporción de DC (7,26). Los tratamientos restantes obtuvieron una menor acumulación de DC sin presentar diferencias significativas entre ellos (WBHT: 5,86; WPH: 5,53 y WPAE: 4,99). Los resultados obtenidos pusieron en evidencia que WC fue el tratamiento que sufrió una oxidación primaria más pronunciada en relación al resto de los tratamientos. Martínez *et al.* (2013) describió que los valores de DC se incrementaron a lo largo del almacenamiento para todas las muestras de aceite de nuez almacenadas a 25 °C, sin embargo, la muestra control presentó un valor más alto en el día 90 de medición (3,12) comparado con el tratamiento adicionado con extracto de romero (1,52).

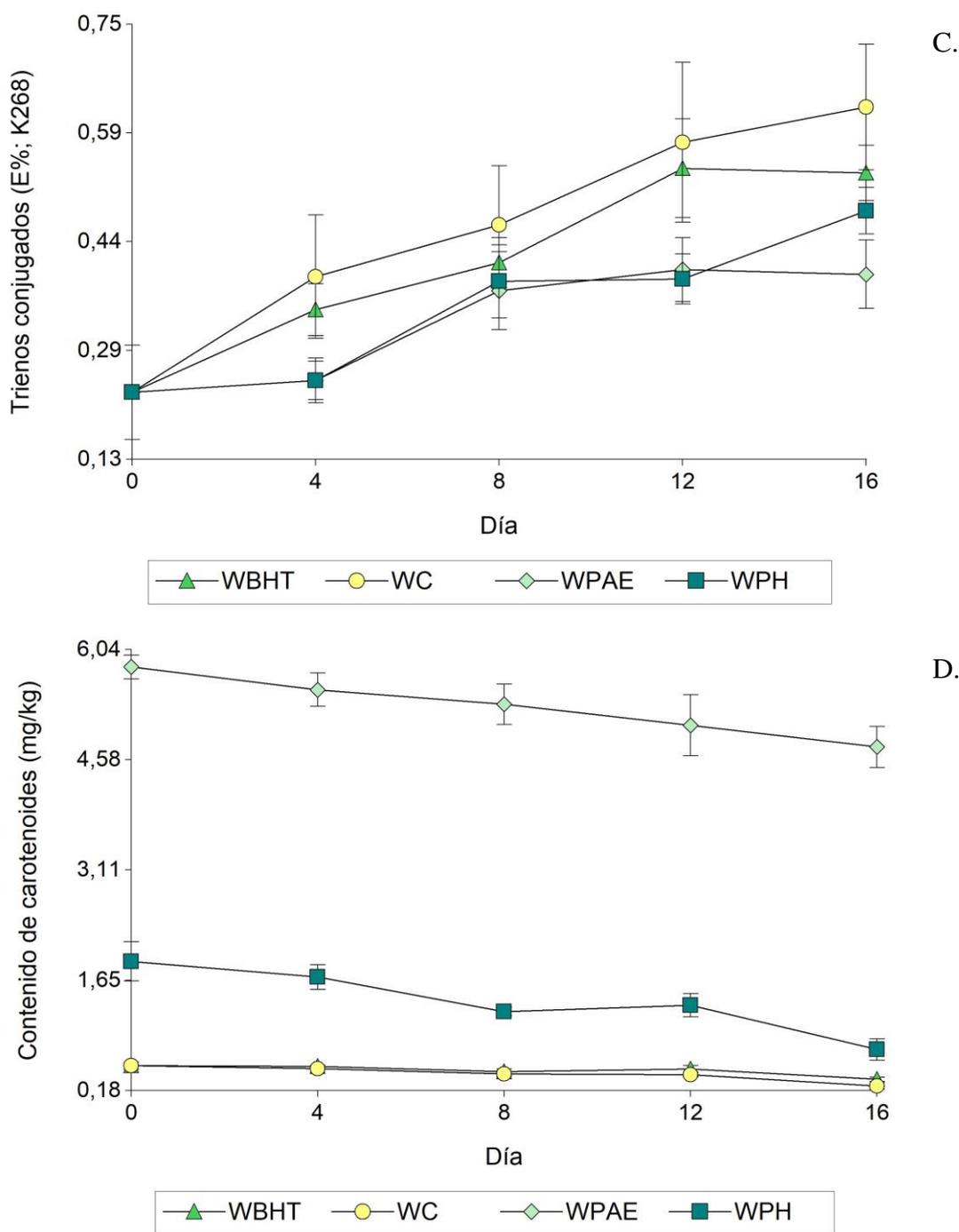
Con respecto a los valores de TC (**Fig. 3.1.c.**), en el día 0 de almacenamiento los tratamientos exhibieron un valor medio de 0,23, sin diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ). A largo del período completo de almacenaje, los tratamientos WPH y WPAE mostraron los valores más bajos, en contraposición con WC, que presentó los valores más altos. En el último día de almacenamiento (día 16), los tratamientos WPAE y WC exhibieron el valor más bajo (K268; 0,39) y el más alto (K268; 0,63), respectivamente. Ayadi *et al.* (2009) reportaron que no encontraron diferencias en los valores de K268 en muestras de aceite de oliva con antioxidantes naturales utilizando aceites esenciales de

romero y albahaca y la muestra control, pero si detectaron valores menores de este indicador en la muestra adicionada con ralladura de limón.

Las propiedades antioxidantes presentes en los vegetales se deben a la presencia de diversos compuestos fitoquímicos activos generados en sus propios tejidos (Bukhari *et al.*, 2008). Entre estos compuestos se encuentran los carotenoides, que pueden jugar un rol importante en la estabilidad oxidativa de las nueces, no obstante, su principal causa de pérdida es su propio deterioro oxidativo (Dias *et al.*, 2014). En el presente estudio, el contenido de carotenoides de los tratamientos disminuyó en todas las muestras de aceite a lo largo del almacenamiento (**Fig. 3.1.d.**). El tratamiento WPAE presentó el valor medio inicial (día 0) más alto para este indicador (5,81 mg/kg), y el segundo lugar lo ocupó WPH (1,90 mg/kg). En ambos tratamientos, el CC permaneció superior al resto durante todo el experimento. A pesar de eso, este indicador en ambos tratamientos presentó la pendiente más pronunciada llegando a valores de 4,75 (WPAE) y 0,73mg/kg (WPH) al final del almacenamiento. Con respecto a las muestras WC y WBHT, el CC sufrió una disminución sin diferencias significativas entre tratamientos y entre períodos de medición, comenzando con una media de 0,51 mg/kg que fue que bajó a 0,24 y 0,33, respectivamente. En otra investigación en granos de soja que estudió este indicador, se concluyó que la presencia de  $\beta$ -caroteno en concentraciones entre 5-20 mg/g aceite tiene un efecto protector contra el deterioro lipídico inducido por la luz, (Warner y Frankel, 1987). Es posible que la concentración de carotenoides presentes en el tratamiento WPAE en el día 0, podría ser suficiente para ejercer un efecto protector contra la degradación lipídica. Sin embargo, el motivo por el cual se encontraron mayores valores de lectura (CC) en los tratamientos WPH y WPAE podría deberse a la presencia de compuestos bioactivos presentes en los extractos aplicados. Slatnar *et al.* (2015) reportó que los taninos hidrolizables son los compuestos fenólicos más importantes encontrados en las nueces, seguido por los flavonoles). Estos compuestos oscuros y amarillentos, respectivamente, influyen sobre el color del tegumento de las nueces y los productos en los cuales estas son incorporadas. Gómez-Caravaca *et al.* (2008) reportó un contenido más alto de glansreginina A en la variedad Fernette, ésta podía ser la razón por el color más oscuro de su tegumento en relación con la variedad Franquette.



**Fig. 3.1.** Valores medios y desvíos estándares de (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados y (D) contenido de carotenoides medidos durante el almacenamiento (16 días; 60 °C) para los tratamientos WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua).



**Fig. 3.1.** Valores medios y desvíos estándares de (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados y (D) contenido de carotenoides medidos durante el almacenamiento (16 días; 60 °C) para los tratamientos WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación.

Probablemente, los extractos de polifenoles de la nuez (PH and PAE) incorporados al aceite de nuez, pueden haber sido leídos en el mismo rango de longitud de onda utilizado para la medición de CC (470 nm). Esto explicaría el valor más alto de lectura detectado en las muestras: WPAE y WPH. La disminución posterior de esta lectura (CC) con una pendiente más pronunciada, en relación con los otros tratamientos (WBHT y WC), puede deberse al proceso de oxidación que afecta a los polifenoles durante su acción como antioxidantes naturales. Adicionalmente, dicho comportamiento, puede ser el motivo por el cual las muestras con polifenoles demostraron una mayor actividad antioxidante durante el almacenamiento del aceite de nuez.

### **Análisis de los compuestos volátiles por GC-MS**

Cuando ocurre la oxidación lipídica en los aceites, su composición química se ve alterada, como así también, la calidad y seguridad de estos alimentos. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados genera aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos y otros compuestos carbonados. De acuerdo con Elmore *et al.* (2005), la fracción de compuestos volátiles en nueces está representada por compuestos hidrocarbonados, alcoholes de bajo peso molecular, aldehídos, y furanos.

Una gama amplia de compuestos volátiles fue encontrada en las muestras en el día inicial de medición (día 0) (**Tabla 3.2.**). Las proporciones de algunos de estos compuestos se vieron modificadas a medida que transcurrió el almacenaje (**Fig. 3.2.**), mientras, que otros no se vieron modificados significativamente en el tiempo. Nonanal, hexanal, butanal y (E)-2-heptenal, 2-propilfurano, butil-hidroxitolueno, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno y d-limoneno fueron los compuestos que sufrieron cambios significativos durante el almacenamiento.

La presencia de hexanal y nonanal en alimentos ricos en lípidos está directamente relacionada con el desarrollo de sabores rancios (Larrauri *et al.*, 2016a). El hexanal tuvo un contenido inicial (día 0) similar entre los tratamientos, presentando una media de  $162,69 \times 10^3$  c.e. (**Fig. 3.2.a.**) ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 3.2.** Compuestos volátiles expresados en cuentas electrónicas (c.e.,  $10^3$ ) por gramo de aceite de nuez para los tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua) analizados en el primer (día 0) y en el último período (día 16) de almacenamiento a 60 °C.

Compuestos volátiles	Día 0				Día 16			
	WC <sup>1</sup>	WBHT <sup>1</sup>	WPH <sup>1</sup>	WPAE <sup>1</sup>	WC <sup>1</sup>	WBHT <sup>1</sup>	WPH <sup>1</sup>	WPAE <sup>1</sup>
<i>Alcoholes</i>								
Ciclopropil carbinol	ND	10,01±1,83b	7,56±0,66b	ND	14,65±1,55a	15,84±0,48a	ND	ND
2-Octenol	ND	ND	ND	ND	ND	8,68±0,57a	ND	ND
Ciclobutanol	38,05±1,35ab	44,72±3,29ab	34,72±7,62b	47,89±4,83a	ND	ND	ND	ND
<i>Aldehídos</i>								
Butanal	15,32±0,87d	13,84±0,73d	13,65±2,02d	14,65±1,19d	86,97±4,27a	54,67±1,44b	48,04±1,16c	43,69±2,55c
Pentanal	ND	ND	ND	ND	15,54±1,81a	ND	10,78±0,52b	9,61±0,87b
Heptanal	ND	ND	ND	ND	24,64±0,37a	ND	ND	ND
Octanal	ND	ND	ND	ND	17,56±0,78	ND	ND	ND
Hexanal	168,52±33,57b	181,86±17,33b	155,19±23,19b	145,19±18,15b	645,55±64,85a	228,95±15,74b	204,15±32,51b	218,66±10,99b
2,4-Octadienal	10,89±1,70de	8,85±0,59e	12,22±1,21de	10,72±1,75de	52,88±0,13a	15,77±3,02cd	41,54±1,66c	48,68±2,65b
(E)-2-Heptenal	8,61±0,17c	9,28±0,48c	6,96±0,81c	8,30±0,67c	133,41±12,72a	101,30±2,92b	95,03±4,77b	90,71±0,91b
Nonanal	10,07±1,31de	8,41±1,15e	8,68±1,10e	9,07±0,90e	32,79±1,13a	19,31±2,50b	13,35±1,32cd	14,86±0,72c
3-Metilbutanal	5,67±0,44	ND	ND	ND	50,12±1,09a	ND	40,96±5,16b	30,54±2,39c
Decanal	6,58±2,33	ND	ND	ND	26,66±0,90	ND	ND	ND
<i>Hidrocarbonos aromáticos</i>								
1,2,3-Trimetilbenceno	ND	ND	ND	6,63±0,81a	ND	ND	ND	6,10±0,24a
1,3,5-Trimetilbenceno	ND	ND	ND	34,70±0,52a	ND	ND	ND	46,85±3,10a

ND = No detectado

<sup>1</sup> Medias ± error estándar ( $\alpha = 0,05$ ;  $n=3$ ).

**Tabla 3.2.** Compuestos volátiles expresados en cuentas electrónicas (c.e., 10<sup>3</sup>) por gramo de aceite de nuez para los tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua) analizados en el primer (día 0) y en el último período (día 16) de almacenamiento a 60 °C. Continuación.

Compuestos volátiles	Día 0				Día 16			
	WC <sup>1</sup>	WBHT <sup>1</sup>	WPH <sup>1</sup>	WPAE <sup>1</sup>	WC <sup>1</sup>	WBHT <sup>1</sup>	WPH <sup>1</sup>	WPAE <sup>1</sup>
<i>Ácidos orgánicos</i>								
Ácido Oxálico	119,22±11,56a	131,23±2,30a	95,88±8,45b	132,42±2,29a	ND	ND	37,26±1,06c	ND
<i>Furanos</i>								
2-Pentilfurano	16,33±1,85	ND	ND	ND	26,51±1,26a	14,96±0,78b	ND	14,90±0,21b
2-Propilfurano	1,36±0,27c	1,82±0,13c	1,59±0,21c	1,68±0,13c	47,83±1,75a	45,51±2,14ab	48,25±1,32a	41,64±1,61b
<i>Cetonas</i>								
3-Hexanone, 2,5-dimetil-	14,56±1,00a	15,06±0,99a	13,89±1,54a	12,79±0,60a	8,30±0,26b	ND	ND	ND
3,5-Octadien-2-one	10,63±1,14c	11,63±1,29c	9,97±1,47c	11,63±1,29c	24,42±0,45b	36,49±8,27a	8,12±0,93	ND
<i>Terpenos</i>								
D-Limoneno	85,76±3,71a	92,43±8,72a	79,09±4,33a	75,76±6,33a	ND	13,73±1,15b	14,73±0,80b	15,57±1,80b
α-Sabineno	1,574±1,83a	14,48±1,03a	15,79±0,42a	16,81±0,84a	ND	ND	ND	ND
<i>Aminas y amidas</i>								
1-Nonanamine, N,N-dimetil-	ND	30,12±2,03a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Bromo-N-metil-2-propen-1-amine	16,16±1,61a	14,49±0,26a	14,49±0,83a	16,18±1,07a	21,47±10,03a	ND	ND	10,26±0,85a
<i>Otros</i>								
Butil-hidroxitolueno	ND	100,70±4,88a	ND	ND	ND	29,70±0,55b	ND	ND

ND = No detectado

<sup>1</sup> Medias ± error estándar (α = 0,05; n=3).

A partir del día 4, WC presentó un contenido superior de hexanal en comparación con los tratamientos restantes (WBHT, WPAE y WPH). En día 16 de almacenamiento, el contenido de hexanal fue superior en el tratamiento WC ( $645,55 \times 10^3$  c.e.) comparado con WBHT ( $228,95 \times 10^3$  c.e.), WPAE ( $218,66 \times 10^3$  c.e.) y WPH ( $204,15 \times 10^3$  c.e.). Estos últimos no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a nonanal, basado en el valor medio de cada tratamiento y considerando el período completo de almacenamiento, WC presentó el contenido más elevado para este compuesto ( $32,79 \times 10^3$  c.e.) y los otros tratamientos, los valores más bajos (WBHT  $19,31 \times 10^3$  c.e., WPAE  $14,86 \times 10^3$  c.e. y WPH  $13,35 \times 10^3$  c.e.). Esta diferencia se comenzó a observar en el día 8 de almacenamiento (**Fig. 3.2.b.**), en el cual WC comenzó a exhibir los valores más altos, y esta tendencia se mantuvo hasta el final (día 16). Otros trabajos han encontrado una relación entre el aumento del hexanal en nueces y otros indicadores de deterioro. Bakkalbaşı *et al.* (2012) reportó que en distintas variedades de nueces (Yalova-1, Yalova-3), almacenadas en distintos envases que variaban en espesor y permeabilidad del oxígeno, el contenido de hexanal se incrementaba según la temperatura en la cual se almacenaban las muestras. En el mismo trabajo, se pudo corroborar la misma tendencia para el indicador IP. Adicionalmente, se pudieron observar resultados similares en otros frutos secos. Larrauri *et al.* (2016a) encontró un menor incremento del contenido de nonanal y hexanal en almendras recubiertas con una cobertura comestible adicionada con antioxidantes sintéticos (BHT) y naturales (polifenoles del maní) almacenadas durante 126 días a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que en la muestra control fue mayor.

Con respecto al compuesto butanal, los valores promedio, considerando la totalidad de las mediciones realizadas en el período de almacenamiento, están exhibidas a continuación en orden decreciente: WC ( $55,71 \times 10^3$  c.e.) > WBHT ( $37,25 \times 10^3$  c.e.) > WPAE ( $28,58 \times 10^3$  c.e.) y WPH ( $27,22 \times 10^3$  c.e.). En el día 0, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $14,37 \times 10^3$  c.e.). Sin embargo, a partir del día 8, la muestra control (WC) mostró un mayor contenido de butanal (**Fig. 3.2.c.**) ( $66,23 \times 10^3$  c.e.). Esta tendencia se sostuvo hasta el final del almacenamiento (día 16) donde WC ( $86,97 \times 10^3$  c.e.) presentó el contenido más alto, seguido por WBHT ( $54,67 \times 10^3$  c.e.) y finalmente, WPAE ( $48,04 \times 10^3$  c.e.) y WPH ( $43,69 \times 10^3$  c.e.) sin diferencias

significativas entre dos tratamientos con extractos de polifenoles ( $p < 0.05$ ). Butanal es un aldehído que ha sido previamente encontrado en nueces (Elmore *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006). Este compuesto es un derivado de la oxidación del ácido linoleico (Frankel, 1983), lo cual explica su presencia en las nueces principalmente en WC, que muestra una menor capacidad de conservación.

(E)-2-Heptenal es considerado uno de los compuestos volátiles que más se forma durante la oxidación de los ácidos grasos insaturados. En el presente estudio, este compuesto presentó un valor promedio de  $8,28 \times 10^3$  c.e. (**Fig. 3.2.d**) en el día 0 de almacenamiento, sin diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). Al final del almacenamiento, el tratamiento control mostró el valor más alto ( $133,41 \times 10^3$  c.e.), que fue significativamente distinto al resto de los tratamientos (WBHT =  $101,30 \times 10^3$ , WPH =  $95,03 \times 10^3$  y WPAE =  $90,71 \times 10^3$  c.e.). Estos resultados nuevamente confirmaron que WC fue el tratamiento más afectado por los procesos de oxidación. Frankel (2005) describió la importancia que tiene (E)-2-heptenal, como uno de los principales componentes responsables del sabor oxidado en granos de soja mediante un análisis, en el cual, se relaciona la cromatografía gaseosa con el análisis sensorial. En este estudio ordenaron los 11 compuestos más importantes responsables del sabor oxidado en soja (alcoholes y aldehídos), colocando al (E)-2-heptenal en un tercer lugar de importancia.

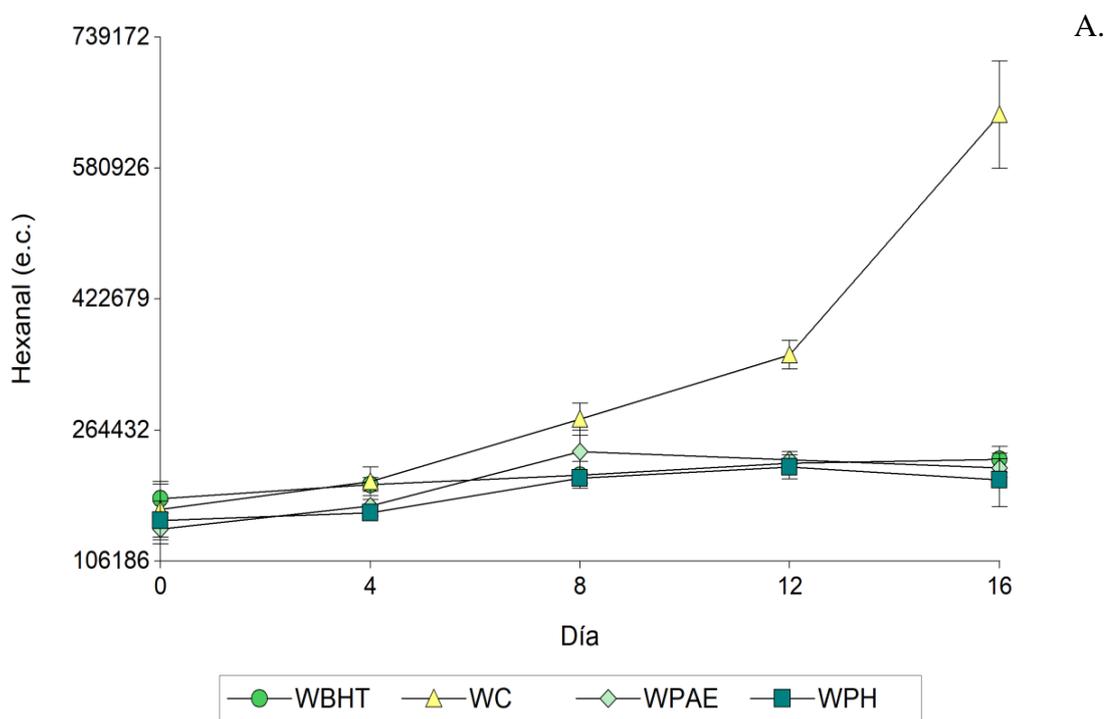
El 2-propilfurano fue otro de los compuestos volátiles detectados en las muestras. La proporción de este fue incrementándose a lo largo del almacenamiento. Basado en las medias de los tratamientos considerando todos los períodos del almacenamiento, WC mostró el contenido más alto de 2-propilfurano ( $24,91 \times 10^3$  c.e.), seguido por WBHT y WPH ( $21,20 \times 10^3$  y  $22,36 \times 10^3$  c.e., respectivamente), y finalmente WPAE ( $14,09 \times 10^3$  c.e.) con el valor más bajo ( $p < 0,05$ ). Los furanos son productos de la oxidación secundaria y se conforman a partir de la disrupción de hidroperóxidos (Guillen y Cabo, 2002). Este puede ser el motivo por el cual se observó un incremento en su contenido a lo largo del almacenaje. La menor acumulación de este volátil se presenció en el tratamiento WPAE, lo cual puede deberse a la actividad antioxidante superior ejercida por el extracto polifenólico de nuez.

Con respecto al BHT, este solamente fue presenciado en el tratamiento WBHT. Este compuesto se encontró de manera más abundante en el día 0 ( $100,70 \times 10^3$  c.e.) que en el día 16 ( $29,70 \times 10^3$  c.e.), disminuyendo así su contenido con una pendiente pronunciada. Se puede concluir que, su contenido disminuyó por la degradación ocurrida a lo largo del proceso oxidativo que fue avanzando en WBHT.

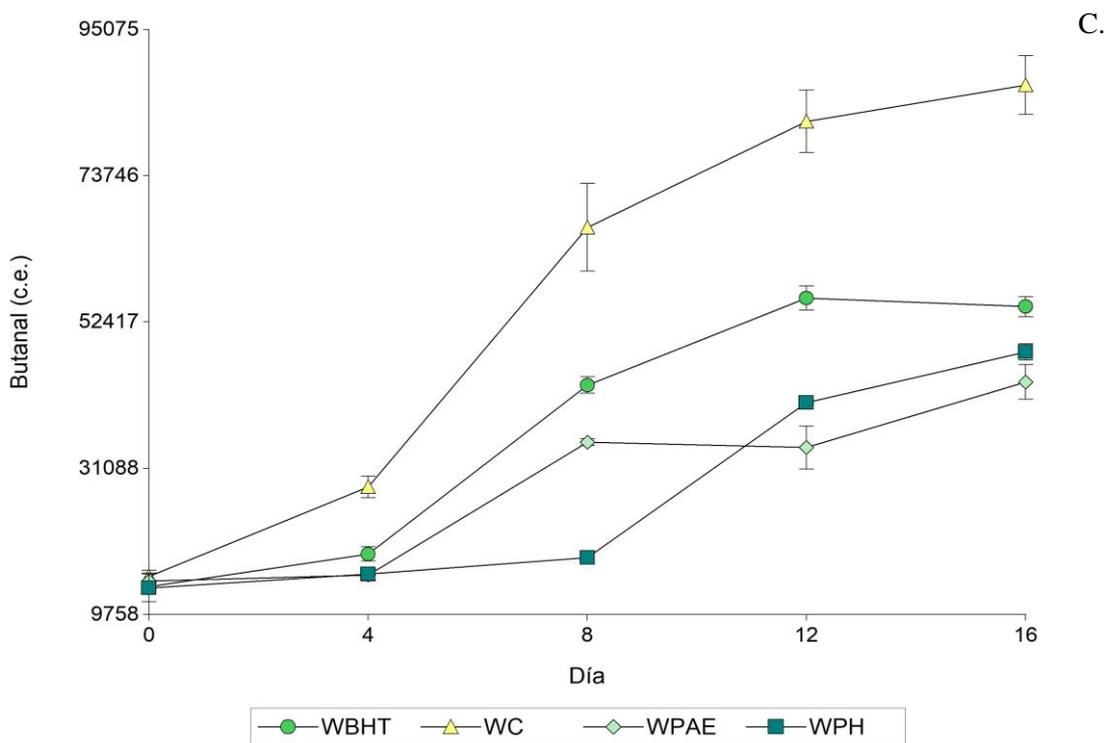
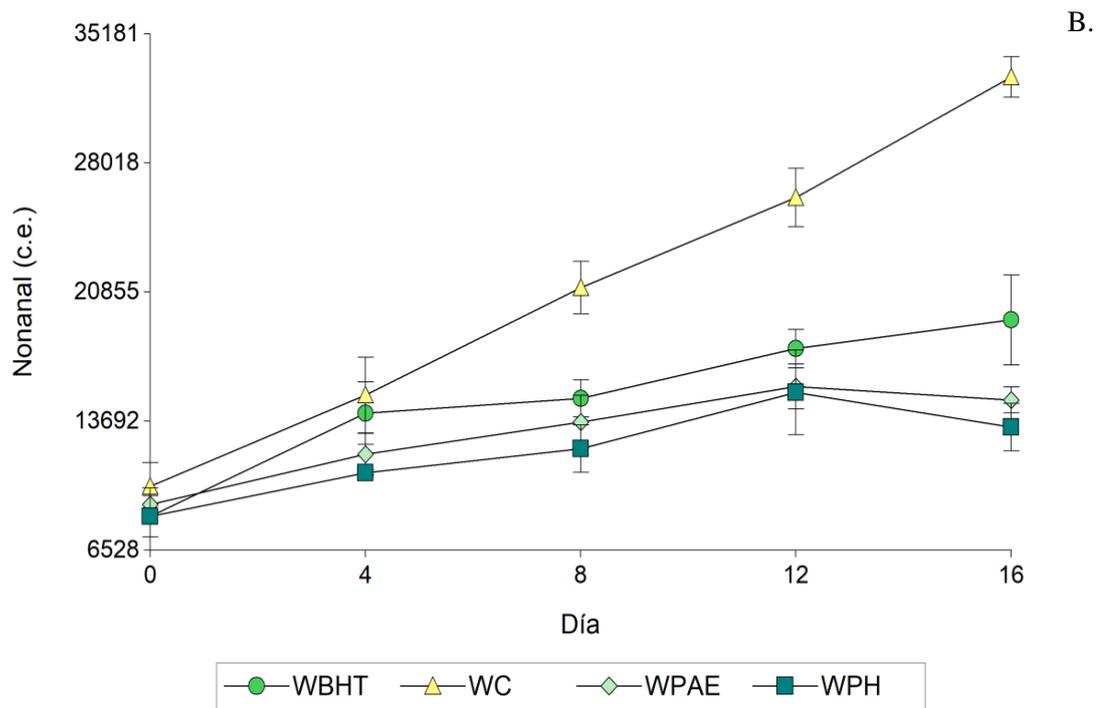
Los compuestos 1,2,3-trimetilbenceno y 1,3,5-trimetilbenceno han sido previamente detectados por Buchbauer y Jirovetz (1992) en el tegumento del nogal negro o americano (*Juglans nigra*). Estos compuestos solo se presenciaron en el tratamiento WPAE y no cambiaron significativamente a lo largo del almacenamiento. Su presencia en este tratamiento podría estar relacionada con la composición del extracto PAE que a su vez se relaciona con el solvente de extracción.

D-limoneno es un compuesto aromático que hace una contribución importante en el sabor característico de diversos alimentos. Este compuesto ha sido previamente reportado como uno de los constituyentes aromáticos en la nuez (Elmore *et al.*, 2005). El contenido de D-limoneno fue disminuyendo gradualmente en los tratamientos a medida que fue avanzando el período de almacenamiento. Inicialmente (día 0), los tratamientos no exhibieron diferencias significativas en el contenido de este compuesto (valor medio:  $83,26 \times 10^3$  c.e.). Sin embargo, WC perdió todo el contenido de D-limoneno cuando llegó al día 16 de almacenamiento, mientras que el compuesto permaneció en baja proporción en los tratamientos WPH ( $14,73 \times 10^3$  c.e.), WPAE ( $15,57 \times 10^3$  c.e.) y WBHT ( $13,73 \times 10^3$  c.e.), sin mostrar diferencias significativas entre ellos. La presencia de D-limoneno en el último día de almacenaje para WBHT, WPH y WPAE, puede deberse a la protección provista por los antioxidantes, a diferencia de la muestra control. Por lo tanto, las muestras con antioxidantes (WPH, WPAE y WBHT) tuvieron mayor capacidad para preservar este compuesto que, junto con otros cinco terpenos, representan en promedio un  $80\% \pm 4\%$  de los volátiles presentes la composición de nueces frescas (San Román *et al.*, 2015) Los compuestos antioxidantes como polifenoles y BHT, además, retardaron la formación de compuestos relacionados con la oxidación lipídica como hexanal, butanal, nonanal, (E)-2-heptenal y 2-propilfurano y la aparición, por lo tanto, de sabores desagradables con notas rancias.

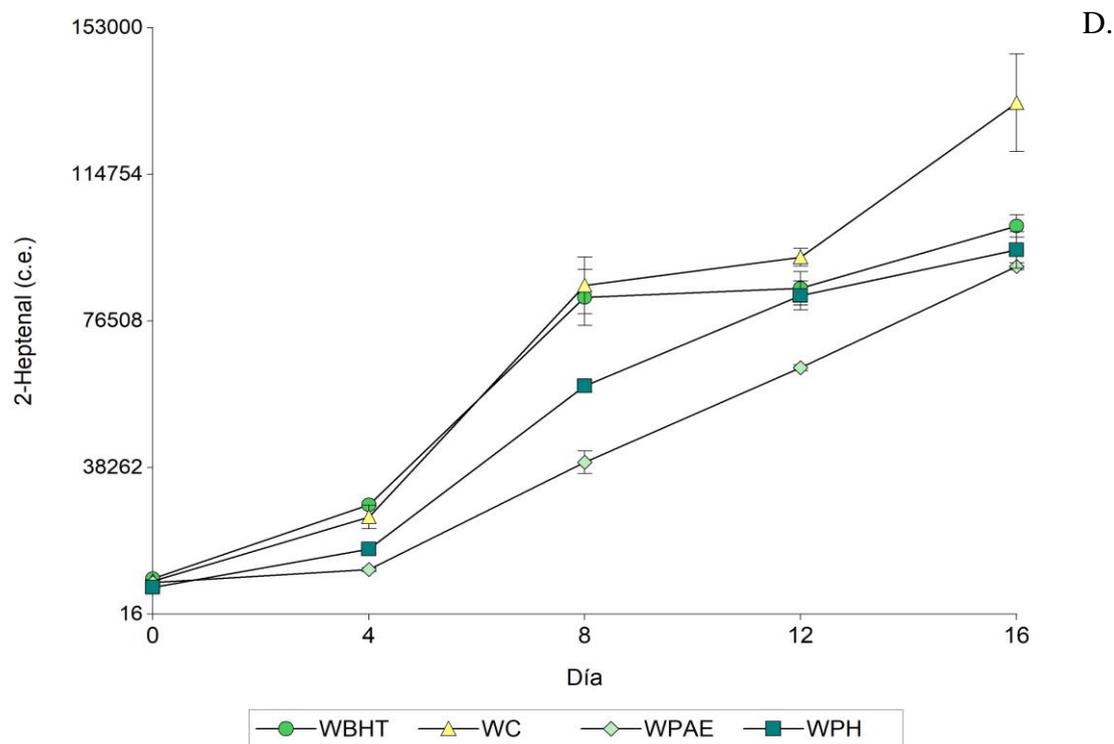
Durante el estudio, hubo algunos compuestos volátiles que no se detectaron en el día 0 de almacenamiento, pero que se fueron formando a medida que transcurrió el tiempo. Estos compuestos estuvieron principalmente integrados por aldehídos y alcoholes: 2-octenol, pentanal, 3-metilbutanal, heptanal, octanal y decanal, 2,4-octadienal. Aunque estos compuestos están relacionados con procesos oxidativos, no cambiaron significativamente en función del tiempo de almacenamiento o, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos analizados en un mismo período de almacenaje.



**Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (A) hexanal, (B) nonanal, (C) butanal y (D) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua).



**Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (A) hexanal, (B) nonanal, (C) butanal y (D) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación.



**Fig. 3.2.** Compuestos volátiles en nueces almacenadas 16 días a 60 °C: (A) hexanal, (B) nonanal, (C) butanal y (D) (E)-2-heptenal. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua). Continuación.

### Análisis de componentes principales

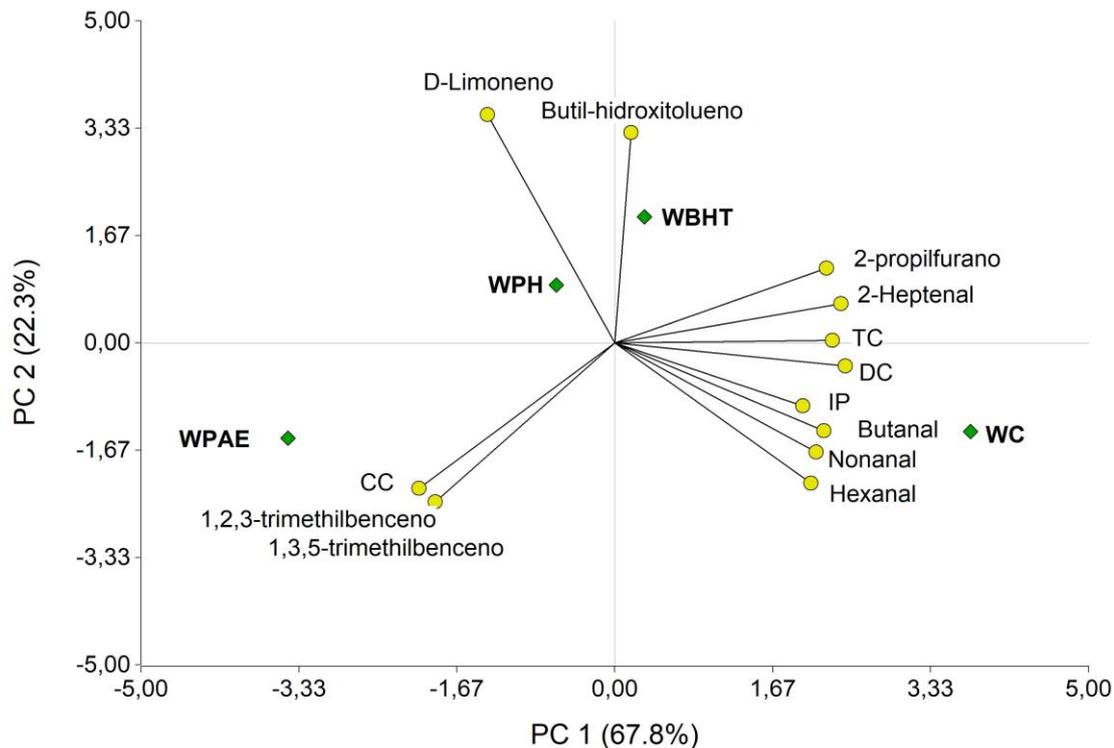
El análisis de componentes principales se realizó con el objeto de establecer las asociaciones de los indicadores de calidad de aceite de nuez y los tratamientos estudiados: con agregado de antioxidantes (WBHT, WPAE y WPH) y sin antioxidantes (WC) durante un estudio de almacenamiento de 16 días a 60 °C. El biplot que se muestra a continuación (**Fig. 3.3.**) se obtuvo a partir de las dos primeras componentes principales (CP), que explicaron el 90,1% de la variabilidad del experimento, siendo el CP1 la que presentó la mayor proporción de la variabilidad (67,8%). Las variables químicas y los volátiles indicadores del deterioro lipídico, que sufrieron un incremento a lo largo del almacenaje, se localizaron del lado derecho del biplot (CP1): DC, TC, IP, nonanal, hexanal, butanal, (E)-2-heptenal, 2-propilfurano. Estas variables tuvieron una asociación positiva. En oposición, las variables localizadas del lado izquierdo: CC, 1,2,3-trimetil-benceno, 1,3,5-trimetil-benceno y d-limoneno, decrecieron o se mantuvieron estables con el tiempo de

almacenaje. Todos los indicadores de oxidación se localizaron muy próximos a la muestra WC y se asociaron de manera negativa con la muestra WPAE, que se localizó del lado izquierdo del biplot la cual se asoció con las variables CC, 1,2,3-trimetilbenceno, D-limoneno y 1,3,5-trimetilbenceno. En la mitad superior del biplot (CP2), las variables más importantes fueron D-limoneno y BHT, que se encontraron en proximidad de WBHT y WPH. La localización de las muestras en el biplot evidenció que WPAE, seguida por WPH, se alejaron de las variables relacionadas al deterioro oxidativo, esto se debe a una mayor conservación en el tiempo otorgada por los extractos (PH y PAE).

Las asociaciones entre las variables fueron confirmadas por el análisis de correlación (Pearson). 2-Propilfurano y (*E*)-2-heptenal mostraron una fuerte correlación con un coeficiente (*r*) de 0,92. Butanal (*r* = 0,87) y hexanal (*r* = 0,84) se correlacionaron con otro compuesto volátil relacionado con el deterioro oxidativo como el nonanal ( $p < 0,0001$ ). De la misma manera, Larrauri *et al.* (2016a) encontró una correlación positiva fuerte entre hexanal y nonanal en un estudio de almacenamiento de almendras recubiertas con cubiertas comestibles y antioxidantes.

Otros de los indicadores químicos, que también estuvieron correlacionados entre sí fueron IP y DC (*r* = 0,85) y DC con TC (*r* = 0,73). Riveros *et al.* (2013) encontró una correlación positiva entre los indicadores IP y DC con un *r* = 0,95 en un estudio de almacenaje de maní tostado recubierto con películas comestibles.

También se observó buena correlación entre variables químicas y volátiles como por ejemplo entre CD con (*E*)-2-heptenal (*r* = 0,86) y CC estuvo fuertemente correlacionado con 1,2,3-trimetilbenceno (*r* = 0,95). Mientras que D-limoneno tuvo correlación negativa muy fuerte con PV (*r* = -0,90).



**Fig. 3.3.** Componentes principales para las variables químicas: hexanal, nonanal, BHT, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,3,5-trimetilbenceno, D-limoneno, butanedial, 2-(E)-heptenal, 2-propilfurano, butil-hidroxitolueno, dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC), índice de peróxido (IP) y contenido de carotenoides. Tratamientos: WC (aceite de nuez control), WBHT (aceite de nuez con BHT), WPAE (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en acetato de etilo) y WPH (aceite de nuez con extracto de polifenoles solubles en agua).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos revelan que la aplicación de los antioxidantes PH, PAE y BHT en el aceite de nuez, mejora su estabilidad química disminuyendo los incrementos de los indicadores de oxidación lipídica y la formación de compuestos volátiles relacionados a los procesos de deterioro de este producto.

Ambos extractos de polifenoles de la nuez (PH y PAE), al ser adicionados al aceite de nuez presentan un mejor efecto antioxidante que el aditivo sintético BHT.

La mayoría de los consumidores se encuentran reacios al consumo de alimentos preservados con antioxidantes sintéticos, debido a su asociación a posibles efectos perjudiciales sobre la salud, lo cual hace que los extractos PAE y PH constituyan una alternativa para conservar este producto y hasta podrían ser útiles para preservar otros alimentos. Los polifenoles de las nueces son compuestos naturales que al ser incorporados en su propio aceite, o en sus productos derivados de la nuez, puede ayudar a prolongar su vida útil al actuar retardando las reacciones oxidativas. Adicionalmente, la inclusión de extractos de nueces en productos alimenticios que ya tienen nueces como ingredientes, no implica riesgo de contaminación cruzada de alérgenos. Esta consideración, hoy en día, es un punto sensible dentro de la industria de los alimentos, que busca brindar alimentos seguros para todos los consumidores.

## BIBLIOGRAFÍA

- Asensio C.M., Grosso N.R. and Juliani H.R. 2015. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops & Products* 63: 203-213.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2011. Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science* 76: 445-450.
- Ayadi M.A., Grati-kamoun N. and Attia H. 2009. Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2613-2619.
- Bakkalbaşı E., Yılmaz Ö.M., Javidipour I. and Artik N. 2012. Effects of packaging materials, storage conditions and variety on oxidative stability of shelled walnuts. *LWT - Food Science and Technology* 46: 203-209.
- Belitz H. D., Grosch W. and Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 1070 pp.
- Berdahl D.R., Nahas R.I. and Barren J.P. 2010. Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. En: *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Decker, E., Elias, R., McClements, D.J., (eds.). Sawston, Cambridge, Reino Unido, pp. 272-320.
- Buchbauer G. and Jirovetz L. 1992. Volatile constituents of the essential oil of the peels of *Juglans nigra* L. *Journal of Essential Oil Research* 4: 539-541.
- Bukhari S.B., Bhanger M.I. and Memon S. 2008. Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry* 2: 78-83.
- InfoStat. 2016. Infostat/Profesional, versión 2016p. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C. and Oliveira L. 2014. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards - effect of storage temperature and time. *Food Chemistry* 156: 37-41.
- Dryden G.W., Song M. and McClain C. 2006. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Gastroenterology* 22: 165-170.
- Elmore J.S., Nisyrios I. and Mottram D.S. 2005. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 20: 501-506.
- Estruch R., Ros E., Salas-Salvadó J., Covas M.I., Corella D., Arós F., Gómez-Gracia E. et al. 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England Journal of Medicine* 368: 1279-90.

- Floegel A., Kim D.O., Chung S.J., Koo S.I. and Chun O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 1043-1048.
- Frankel E.N. 1983. Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research* 22: 1-33.
- Frankel E.N. 2005. *Lipid oxidation*. Ed. Woodhead Publishing, Cambirdge, UK, 470 pp.
- Fu M., Qu Q., Yang X. and Zhang X. 2016. Effect of intermittent oven drying on lipid oxidation, fatty acids composition and antioxidant activities of walnut. *LWT - Food Science and Technology* 65: 1126-1132.
- Fukuda T., Ito H. and Yoshida T. 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63: 795-801.
- Gharibzahedi S.M.T., Mousavi S.M., Hamed M., Rezaei K. and Khodaiyan F. 2013. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of Persian walnut oil obtained by several extraction methods. *Industrial Crops and Products* 45: 133-140.
- Gómez-Caravaca A.M., Verardo V., Segura-Carretero A., Caboni M.F. and Fernández-Gutiérrez A. 2008. Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1209: 238-245.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2017. Sensory Quality Preservation of Coated Walnuts. *Journal of Food Science* 82: 185-193.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2018. Quality preservation of walnut kernels using edible coatings. *Grasas y Aceites* 69: 1-9.
- Guillen M.D. and Cabo N. 2002. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine oxidation stability of edible oils. *Food Chemistry* 77: 503-510.
- Gülçin I., Alici H. A. and Cesur M. 2005. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53: 281-285.
- Hudson B. J. 1990. *Food Antioxidants*. Ed. Elsevier, Amsterdam, 317 pp.
- Ito H., Okuda T., Fukuda T., Hatano T. and Yoshida T. 2007. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 672-679.
- Jensen P. and Sørensen, G. 2001. Evaluation of quality changes in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5790-5796.
- Kornsteiner M., Wagner K. and Elmadfa I. 2006. Food Chemistry Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* 98: 381-387.

- Larrauri M., Barrionuevo M.G., Riveros C., Mestrallet M.G., Zunino M.P., Zygadlo J., Grosso N.R. and Nepote V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1751-1757.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2016a. Chemical and sensory quality preservation in coated almonds with the addition of antioxidants. *Journal of Food Science* 81: 208-215.
- Larrauri M., Zunino M.P., Zygadlo J.A., Grosso N.R. and Nepote V. 2016b. Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. *Industrial Crops & Products* 94: 964-971.
- Liang P., Chen C., Zhao S., Ge F., Liu D., Liu B., Fan Q. et al. 2013. Application of fourier transform infrared spectroscopy for the oxidation and peroxide value evaluation in virgin walnut oil. *Journal of Spectroscopy* 2013: 1-5.
- López-Calleja I.M., de la Cruz S., González I., García T. and Martín R. 2015. Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry* 177: 111-119.
- Luximon-Ramma A., Bahorun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T., Aruoma O.I. 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International* 38: 357-367.
- Martín M.P., Nepote V. and Grosso N.R. 2016. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. *LWT - Food Science and Technology* 68: 174-182.
- Martínez M., Barrionuevo G., Nepote V., Grosso N. and Maestri D. 2011. Sensory characterisation and oxidative stability of walnut oil. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 1276-1281.
- Martínez M.L., Mattea M.A. and Maestri D.M. 2006. Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes Varietal and Crop Year Effects on Lipid Composition of Walnut Genotypes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 791-796.
- Martínez M.L., Penci C.P., Ixtaina V., Ribotta P.D. and Maestri D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology* 51: 44-50.
- Middleton E. Jr. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. En: *Flavonoids in the living system*. Manthey, J.A., Buslig, B.S. (eds.). Estados Unidos, pp. 175-182.
- Nepote V., Grosso N.R. and Guzman C.A. 2004. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hypogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *The Journal of the Argentine Chemical Society* 92: 41-49.

- Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A. and Estevinho L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2103-2111.
- Pizzolitto R.P., Dambolena J.S., Zunino M.P., Larrauri M., Grosso N.R., Nepote V., Dalcero A.M. and Zygadlo J.A. 2012. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B 1 production. *Industrial Crops & Products* 47: 286-290.
- Quiroga P.R., Riveros C.G., Zygadlo J.A., Grosso N.R. and Nepote V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 2648-2655.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biomedical Medicine* 26: 1231–1237.
- Regueiro J., Sánchez-gonzález C., Vallverdú-queralt A., Simal-gándara J., Lamuela-raventós R. and Izquierdo-pulido M. 2014. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry* 152: 340-348.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Quiroga P.R., Nepote V. and Grosso N.R. 2013. Preserving sensory attributes of roasted peanuts using edible coatings. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 850-859.
- Sabaghi M., Maghsoudlou Y., Khomeiri M., Ziaifar A.M. 2015. Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology* 110: 224-228.
- San Román I., Bartolomé L., Gee W.S., Alonso R.M. and Beck J.J. 2015. Comparison of ex situ volatile emissions from intact and mechanically damaged walnuts. *Food Research International journal* 72: 198-207.
- Slatnar A., Mikulic-Petkovsek M., Stampar F., Veberic R., Solar A. 2015. Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Research International* 67: 255-263.
- Warner K. and Frankel E.N. 1987. Effects of beta-carotene on light stability of soybean oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* 64: 213-218.
- Yamaguchi F., Ariga T., Yoshimura Y. and Nakazawa H. 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 180-185.
- Zwarts L., Savage G. and McNeil D.L. 1999. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 189-194.

## **CAPITULO IV**

# **ELABORACION DE UNA CUBIERTA COMESTIBLE A PARTIR DE HARINA DE NUEZ CON LA INCLUSIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES Y EVALUACION DE SU EFECTO PROTECTOR EN NUECES**

## **INTRODUCCIÓN**

La nuez es un alimento cuyo alto contenido de lípidos y de ácidos grasos esenciales, la convierte en una buena fuente para la obtención de aceite comestible (Martínez *et al.*, 2013). El aceite de nuez es utilizado por los consumidores como una alternativa más saludable para darle sabor a los alimentos (Torres *et al.*, 2005) y puede ser aprovechado como ingrediente en ensaladas y para la cocción de distintas recetas. A partir de la manufactura del aceite comercial se obtiene como residuo una harina rica en proteínas e hidratos de carbono (Rabadán *et al.*, 2018). Las proteínas de las plantas, en general, tienen una importancia significativa en la nutrición humana, principalmente para aquellos países en desarrollo donde el consumo de proteína es menor al valor requerido para una buena nutrición (Mao y Hua, 2012). Por este motivo, los vegetales que presentan un alto contenido proteico están ganando día a día mayor importancia, ya que pueden ser incorporados en distintos productos alimenticios y su éxito como aditivos va a depender de las características sensoriales que le van a incorporar a los alimentos (Mao y Hua, 2012). De acuerdo con lo estudiado en capítulos previos, los compuestos más abundantes en la composición química de las nueces son los lípidos, y éstos son seguidos en importancia por las proteínas.

Las nueces son consideradas como fuente de proteínas, ya que las mismas representan un 12-15% de su peso seco, y presentan digestibilidad y buen balance de aminoácidos esenciales (Sze-Tao y Sathe, 2000; Amaral *et al.*, 2003). En su composición se encuentran diversas fracciones de proteínas. La glutelina ocupa la mayor proporción (70.1% del total de proteína en nuez), la fracción de globulina ocupa el segundo lugar con

17.6% y es seguida por albumina (6.8%) y prolamina (5.5%). La cantidad, calidad y propiedades funcionales de la proteína de la nuez pueden ser afectadas por el proceso utilizado para la extracción del aceite. Las formas más conocidas para la extracción de aceite son por prensado hidráulico y por solvente químico. Aunque el prensado recupera una proporción inferior de aceite, provee un método eficiente cuando se trata de la extracción de aceite de pequeñas partidas de granos o frutos con alto contenido lipídico. La harina de nuez obtenida como subproducto de la extracción del aceite puede ser utilizada como una fuente adicional de proteína para enriquecer la composición de distintos alimentos (Mao y Hua, 2012).

Como se explicó previamente (capítulo I), las cubiertas comestibles se pueden elaborar a partir de biopolímeros de polisacáridos, lípidos o proteínas (globulares). Para la elaboración de las soluciones o dispersiones proteicas utilizadas para la síntesis de cubiertas o films comestibles se pueden usar los siguientes solventes: etanol, agua o combinación de ambas. Adicionalmente, en muchos casos la proteína es sometida a una desnaturalización mediante el uso de ácidos, bases o calor, para darle forma a estos sistemas (Kester y Fennema, 1986). Las interacciones en cadena determinan la fuerza de la cubierta, que, con interacciones más fuertes, logran films más resistentes y con menor permeabilidad a vapores, líquidos y gases, por lo que son consideradas bloqueadores de oxígeno altamente efectivas (Hassan *et al.*, 2018). Estas cubiertas, también ofrecen propiedades de barrera contra aceites y aromas. Un ejemplo de cubierta a base de proteína es aquella utilizada en el capítulo 2 (proteína del suero de la leche; PS), que aporta un buen efecto protector contra el daño mecánico, y una buena barrera previniendo el intercambio de gases bajo condiciones de baja de humedad relativa. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, estas cubiertas tienen algunas limitantes en relación con la incorporación de la humedad, reduciendo así su eficiencia. Otros tipos de proteínas globulares han demostrado ser eficientes en la formación de films o cubiertas como las proteínas de soja, gluten de trigo, de suero de la leche, etc. En el capítulo 2, se pudo comprobar que las cubiertas comestibles elaboradas a base de polisacáridos (CMC y MC) y proteínas (PS) presentan un efecto protector en las nueces, ya que, actúan retardando los procesos de deterioro oxidativo, al reducir el desarrollo de los indicadores químicos de oxidación lipídica (Grosso *et al.*, 2018b). Adicionalmente, retardan el desarrollo de los

atributos sensoriales relacionados con el deterioro lipídico y la pérdida del atributo característico del sabor a nuez (Grosso *et al.*, 2017).

Los procesos de oxidación, que ocurren en diversos productos y sistemas biológicos, forman radicales libres que son conocidos por ser responsables de deterioro oxidativo, daños en la salud y envejecimiento acelerado (Aruoma, 1998). Como consecuencia de estos procesos, los antioxidantes se han transformado en una tecnología esencial de preservación y una herramienta de protección de la salud. Sin embargo, la toxicidad potencial de los antioxidantes sintéticos ha producido que se intensifique la búsqueda y esfuerzos para descubrir y utilizar antioxidantes de fuentes naturales. Algunos estudios reportan que, en la composición química de las nueces se encuentran diversos grupos fenólicos que han demostrado contribuir a la actividad antioxidante total de los extractos de nueces, en los cuales predominan los taninos (Fukuda *et al.*, 2003). En menor medida, su composición está integrada por algunos monómeros fenólicos de bajo peso molecular ubicados dentro del grupo de ácidos hidrobenczoicos: ácido elágico > protocatecuico > vanílico > siríngico (Anderson *et al.*, 2001; Christopoulos *et al.*, 2010). Estos compuestos son conocidos por presentar significativa actividad antioxidante altamente influenciada por el número de grupos hidroxilos en su composición (Zhang *et al.*, 2009). En el capítulo 3, se pudo demostrar que, los extractos de nueces presentan actividad antioxidante significativa, incluso mejor que BHT. Esto se pudo corroborar mediante la medición de fenoles y flavonoides totales, mediciones de pruebas antioxidantes y en un estudio de almacenaje del aceite de nuez.

En los últimos años, la presencia de alergias en la población está cobrando importancia para el sistema de salud. El consumo de alimentos que contienen alérgenos, para determinados sectores de la población que susceptible, puede causar síntomas severos de alergia incluyendo anafilaxia con riesgo de muerte (López-Calleja *et al.*, 2015). Por ese motivo, la industria de los alimentos está comenzando a tener en cuenta el correcto etiquetado de los productos para que las personas que presentan alergias a determinados alimentos tomen cuidado de ello. Otro detalle muy importante para la industria de los alimentos es la posible contaminación cruzada con alérgenos entre distintos alimentos en las líneas de producción. Por ese motivo se trata de que ingresen al sector de producción la menor cantidad posible de ingredientes que posean proteínas que generan alergias. En

relación a las cubiertas comestibles, hay algunas que han demostrado tener un efecto protector eficiente, pero que pueden ocasionar reacciones alérgicas en algunos consumidores, como, por ejemplo, aquellas elaboradas a partir de PS. Por lo tanto, el consumo de alimentos que contengan este tipo de cubiertas comestibles implica un importante riesgo para la salud de algunos consumidores sensibles a esas alergias (Franssen y Krochta 2003; Huber y Embuscado, 2009)

En la actualidad no existe bibliografía acerca de elaborar cubiertas comestibles a partir de un concentrado proteico de nuez ni del comportamiento de los polifenoles de la nuez aplicados en una cubierta comestible. La elaboración de una cubierta comestible de nuez junto con la adición de polifenoles antioxidantes de nuez podría proteger los granos de nueces del deterioro oxidativo. Por lo tanto, su aplicación no solo ayudaría a prolongar la vida útil de la nuez, disminuyendo la velocidad del deterioro químico, nutricional y sensorial, sino que también evitaría la contaminación cruzada con alérgenos y la utilización de antioxidantes sintéticos, redundando todo esto positivamente hacia la salud y bienestar de los consumidores.

El *objetivo general* del presente estudio fue obtener un concentrado de proteínas a partir de harina de nuez, desarrollar una cubierta comestible a base de este material, con y sin el agregado de extracto antioxidante de nuez (PAE), y evaluar su efecto protector sobre nueces durante su almacenaje.

Los *objetivos específicos* fueron:

1. Obtener un concentrado de proteínas a partir de harina de nuez y analizar su composición química.
2. Desarrollar una cubierta comestible a base de este material para ser aplicada sobre nueces.
3. Realizar un estudio de almacenaje para evaluar el efecto protector de la cubierta comestible, elaborada con y sin la inclusión del extracto antioxidante de nuez

(PAE), contra el deterioro oxidativo, evaluando cambios en indicadores químicos y sensoriales de las nueces recubiertas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

Nueces tipo mariposa sin cáscara, de la variedad Chandler, cosechas en el año 2017, provistas por Nogales SRL, La Rioja, Argentina. Metil-celulosa (MC) (Parafarm ®) adquirida en SAPORITI S.A.C.I.F.I.A. (Buenos Aires, Argentina) y fue utilizada para la elaboración de una cubierta comestible.

## MÉTODOS

### **Obtención de harina de nuez deslipidizada (HND)**

En primera instancia, los granos de nuez fueron molidos utilizando una procesadora Moulinex (AD5663C9). Luego, fueron colocados en sobres de celulosa para la extracción de grasas (deslipidizado) por solvente (n-hexano) durante 8-10 h. Para ese fin, se utilizó un aparato de *Soxhlet*. El producto resultante de la extracción se secó en estufa de circulación forzada a 40 °C por 2 horas para eliminar los restos de n-hexano. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de extracción de carbohidratos solubles utilizando una solución etanol/agua (70:30 v/v) en equipo *Soxhlet* por 8-10 h. El extracto se secó nuevamente en estufa a 40 °C para eliminar los restos de etanol/agua y fue tamizado utilizando una malla de 150 micrones con la finalidad de estandarizar la granulometría de la harina obtenida (HN).

### **Composición química general de la HN**

Se realizaron determinaciones de humedad, materia grasa, proteínas, cenizas, hidratos de carbono, de acuerdo con las metodologías descriptas en el capítulo II (AOAC, 2010; Gayol *et al.*, 2013).

**Fibra cruda (FC).** Se determinó de acuerdo al procedimiento de la AOCS denominado técnica de los sobres de filtrado (AOCS *Standard Procedure* Ba 6a-05, 2017)

utilizando un equipo de digestión (ANKOM 200) capaz de realizar la digestión a 100 °C manteniendo una presión de 10-25 psi. Se pesaron entre 0,95-1,00 g de muestra de harina que fueron colocados en una bolsa de filtrado (F57 o F58, ANKOM *Technology*). Posteriormente, todas las bolsas selladas fueron colocadas en el equipo de digestión. Se adicionó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,255 N) al compartimiento de las muestras y se realizó la digestión a 100 °C por 40 min. Una vez terminada la digestión, se lavó el compartimiento con agua y se adicionó NaOH (0,313 N). Se realizó la digestión a 100 °C por 40 min. Al finalizar, se lavó nuevamente con agua y se colocaron los sobres de filtro en acetona por 5 min. Los sobres secos se calentaron en estufa a 102 °C durante 4 h y luego fueron sometidos a incineración durante 2 h a 600 °C. El resultado se expresó en porcentaje. Para el cálculo se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ Fibra cruda} = 100 \times (\text{g muestra después de la incineración} - (\text{g sobre vacío} \times C1) / \text{g muestra}$$

(ec 4.1.)

Donde: C1 = g sobre blanco después de la incineración/  
G sobre blanco vacío

**Fibra detergente neutro (FDN).** La fibra detergente neutro se determinó de acuerdo al procedimiento aprobado por la AOCS denominado “*Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds*” (AOCS Official Method 2002.04) utilizando un equipo de digestión (ANKOM 200). Primero se pesaron las bolsas de filtrado (F57 o F58, ANKOM *Technology*) y 0,45-0,50 g de muestra de HN previamente secada dentro de dichas bolsas. Adicionalmente, se pesaron dos bolsas de filtrado sin muestra para determinar el blanco. Posteriormente, las bolsas selladas fueron sometidas a un lavado por inmersión con acetona durante 3 min. Luego, las bolsas selladas fueron colocadas en el equipo de digestión. Se adicionó 1900-2000 mL de solución de detergente neutro al compartimiento de las muestras y 4 mL de alfa amilasa termoestable. Se dejó la solución entre 90-100 °C dentro del vaso digestor por 75 minutos. Luego, se liberó la solución y se agregaron 2000 mL de agua destilada entre 70-90 °C con 4 mL de alfa amilasa con agitación por 5 min, se repitió el procedimiento cuatro veces, solo en los dos primeros se agregó la amilasa. Finalmente, se sacaron las bolsas del digestor y se las lavó con acetona durante 3-5

minutos y se las dejó bajo campana extractora. Luego se completó el secado a 102 °C durante 2 horas. Una vez finalizado, se las colocó en desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesaron las muestras.

$$\% \text{ FDN} = 100 \times (W3 - (W1 \times C1)) / W2$$

(ec 4.2.)

Donde:

C1 = g promedio de pesos de bolsas para blanco inicial/ g promedio de pesos de bolsas para blanco luego de la digestión

Donde:

W3 (g): peso final de la bolsa con la fibra.

W1 (g): Peso de la bolsa vacía.

W2 (g): Peso de la muestra.

## **Elaboración de coberturas comestibles en base a HN con la incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos**

Para la elaboración de la cobertura comestible (PN) se siguió el método descrito por (Riveros *et al.*, 2017), con modificaciones. Se utilizó la HN que fue finamente molida mediante un mortero y se dispersó en agua destilada (6,0 g/100 mL). Luego, se adicionó glicerol (10 g/100 g harina) como agente plastificante. La dispersión se mezcló en agitador magnético durante 60 min a 70 °C para acelerar la solubilización de las proteínas. Posteriormente, la solución de la cobertura fue sometida a tratamiento de homogeneización durante 5 minutos. Finalmente, se efectuó un centrifugado de la solución a 1186 G durante 6 min, para decantar los fragmentos de HN que no lograron ser solubilizados en los pasos previos. Las concentraciones utilizadas en esta preparación se basaron en resultados obtenidos en estudios previos (Aguirre *et al.*, 2011; Riveros *et al.*, 2017).

Sobre la cobertura elaborada (PN) se agregaron antioxidantes para conformar distintos tratamientos. Los antioxidantes fueron agregados luego del centrifugado. Los polifenoles de la nuez (PAE) se adicionaron en una concentración de 0,1% p/v y el BHT a una concentración de 0,02% p/v que es el límite permitido en el Código Alimentario

Argentino (Larrauri *et al.*, 2016; CAA). Ambas sustancias fueron disueltas previamente en 1 mL de solución de etanol/agua (70/30) y luego agregadas a la dispersión.

El proceso de elaboración de la cubierta a base de metil-celulosa se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento utilizando la misma proporción de componentes descritos en el Capítulo II.

## **Preparación de las muestras**

Para el proceso de recubrimiento se utilizó una paila rotativa de acero inoxidable con una concentración de 2,5% p/v de cobertura durante 5 min, para así, lograr el recubrimiento uniforme de cada tratamiento. Se prepararon los siguientes tratamientos utilizando 1000 g de nueces para cada uno:

- a) NC = control, granos de nuez sin cobertura.
- b) NMC = granos de nuez con cobertura elaborada en base a metil-celulosa (MC).
- c) NPN = granos de nuez con cobertura elaborada a base de HN (PN).
- d) NPNP = granos de nuez con cobertura elaborada a base de HN (PN) adicionada con extracto PAE (antioxidante natural).
- e) NPNB = granos de nuez con cobertura elaborada a base de HN (PN) adicionada con BHT (antioxidante sintético).

## **Estudio de almacenamiento**

Las muestras fueron colocadas en recipientes plásticos de 15 x 25 x 5 cm (Tupperware, Buenos Aires, Argentina) y almacenadas durante 98 días en una estufa a 40 °C para reproducir condiciones aceleradas de almacenamiento. Cada 21 o 35 días se realizaron extracciones para realizar análisis químicos y pruebas sensoriales descriptivas, con el objetivo de evaluar la estabilidad química y sensorial de las muestras a lo largo del almacenamiento. Adicionalmente, a los tratamientos frescos (día 0 de almacenamiento) se

les realizó una prueba de aceptabilidad con consumidores para evaluar si hubo cambios en el producto final debido a la presencia de las cubiertas. El diseño experimental consistió en 5 tratamientos (NC, NMC, NPN, NPNP y NPNB) x 3 réplicas x 5 períodos de tiempo.

## **Análisis químicos**

Para realizar estos análisis se utilizó el aceite obtenido por prensado en frío de las muestras de nueces proveniente del almacenamiento (NC, NMC, NPN, NPNP y NPNB). Para el prensado se utilizó una prensa hidráulica de 20 toneladas (HE-DU, Hermes I. Dupraz S.R.L., Córdoba, Argentina). Sobre el aceite extraído, se determinaron los siguientes indicadores de deterioro oxidativo: índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC), contenido de carotenoides (CC), índice de anisidina (IA), composición de ácidos grasos y contenido de tocoferoles.

El **Índice de peróxidos (IP), dienos y trienos conjugados (DC, TC) y contenido de carotenoides (CC)** se determinaron de acuerdo con las metodologías descripta en el capítulo II.

**Índice de anisidina (IA).** El método utilizado es una adaptación de la técnica IUPAC (1987). Para ello, se preparó una solución de aceite-hexano (0,02-0,50 gr aceite + 6 mL de n-hexano) en tubo de medio ensayo. Se tomaron 2 mL de esta solución y se midió la absorbancia a 350 nm ( $A_b$ ), utilizando como blanco n-hexano. Sobre los 4 mL restantes de la solución aceite-hexano en el tubo de ensayo, se agregaron 1,3 mL de solución de p-anisidina (0,125 g p-anisidina + 50 mL ácido acético glacial). Se dejaron reposar los tubos con la mezcla anterior por 10 minutos y luego nuevamente la absorbancia a 350 nm ( $A_m$ ), utilizando como blanco una mezcla de 4 mL n-hexano + 1,3 mL solución p-anisidina después de 10 min de reposo.

$$IA = H \times (F \times A_m - A_b) / m$$

(ec 2.3.)

Donde:

$A_b$  = absorción solución aceite-hexano

$A_m$  = absorción mezcla aceite-hexano-anisidina  
 $m$  = peso aceite en gramos  
 $H$  = 6 mL hexano + ( $m/0.9$ g/mL)  
 $F$  = ( $H - 2$  mL + 1,3 mL anisidina) / ( $H - 2$  mL)

**Composición de ácidos grasos.** A partir del aceite de nuez extraído de las muestras, se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos por transmetilación con una solución de ácido sulfúrico en metanol (30 g/L) previa saponificación con KOH 0,5 N en metanol. Los ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 600 (Waltham, Massachusetts, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se usó una columna capilar SAC<sup>TM</sup>-5 (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m espesor; C#24156, Supelco). El gas portador fue helio (1 mL/min). Se corrió bajo el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial 180 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta 240 °C (10 min). El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como un valor porcentual con relación al contenido total de los mismos. La separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó de acuerdo con Quiroga *et al.* (2015).

**Contenido de tocoferoles.** La concentración de tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) en el aceite de nuez se realizó de acuerdo a Martín *et al.* (2016) usando un equipo HPLC Serie LC 200 con un horno de columna Serie 200 equipado con un inyector manual y un detector UV. Se utilizó una columna Zorbax RX-SIL (5  $\mu$ m tamaño de partícula; 4,6 x 250 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Para la fase móvil se utilizó una solución de isopropanol en hexano (0,5% v/v) con un flujo de 1 mL/min. Los tocoferoles se detectaron a una longitud de onda de 292 nm. La temperatura del horno fue fijada a 30 °C. La identificación y cuantificación de los picos se hizo comparando con sus respectivos estándares obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

## **Análisis sensorial descriptivo**

Se realizó en concordancia con la metodología descrita en el Capítulo II con modificaciones menores. Una de esas modificaciones fueron algunas de las referencias utilizadas y sus intensidades. A continuación, se puede visualizar la nueva tabla elaborada

con los atributos, las nuevas referencias, las intensidades de éstas y los valores asignados de la evaluación de la muestra “warm up” (**Tabla 4.1.**)

**Tabla 4.1.** Atributos, intensidades de las referencias y *warm up* usados en el análisis descriptivo de las muestras de nuez.

Atributo <sup>a</sup>	Referencia	Intensidad de la referencia <sup>b</sup>	Intensidad del warm up <sup>b</sup>
<i>Apariencia</i>			
Intensidad de color	Almendras <sup>c</sup>	50	50
	Café <sup>d</sup>	110	
Brillo	Porotos <sup>f</sup>	35	35
<i>Sabor</i>			
Sabor a nuez			80
Oxidado	Granos de girasol oxidado <sup>g</sup>	80	0
Cartón	Cartón húmedo	30	30
<i>Gusto</i>			
Dulce	Solución de glucosa 20 g kg <sup>-1</sup>	20	8
	Solución de glucosa 50 g kg <sup>-1</sup>	50	
	Solución de glucosa 100 g kg <sup>-1</sup>	100	
Salado	Solución de NaCl 2 g kg <sup>-1</sup>	25	5
	Solución de NaCl 3,5 g kg <sup>-1</sup>	50	
	Solución de NaCl 5 g kg <sup>-1</sup>	85	
Amargo	Solución de cafeína 0,5 g kg <sup>-1</sup>	20	30
	Solución de cafeína 0,8 g kg <sup>-1</sup>	50	
	Solución de cafeína 1,5 g kg <sup>-1</sup>	100	
Acido	Solución de ácido cítrico 0,5 g kg <sup>-1</sup>	20	15
	Solución de ácido cítrico 0,8 g kg <sup>-1</sup>	50	
	Solución de ácido cítrico 1,5 g kg <sup>-1</sup>	100	
<i>Factores de sensación</i>			
Astringencia	4 g de té <sup>h</sup> en 250 mL de agua a 90 °C	34	45
<i>Textura</i>			
Crujiente	Copos de maíz	110	40
Dureza	Almendras	70	30

Atributos listados en orden de percepción por los panelistas.

b Las intensidades de los atributos se basan en una escala lineal no estructurada de 0-150 mm

c Almendras, Grandiet, Córdoba, Argentina.

d Café, Nescafé® Clásico, Nestlé Argentina S.A. Buenos Aires, Argentina.

e Copos de maíz, “3 Arroyos”, Buenos Aires, Argentina.

f Porotos, “Egran”, Córdoba, Argentina.

g Tostadas con aceite de nuez oxidado: Se utilizo Pan lactal "Fargo", cada rebanada fue cortada en 9 partes iguales que fueron humedecidas con 2 ml de aceite de nuez oxidado.

h Té clásico “Green Hills”.

Otra modificación fue la presentación de las muestras se realizó sobre material molido grueso proveniente de la trituración de 28 nueces por cada muestra que se distribuyó 14 pirotines (2 por juez). Previo a su evaluación, se instruyó a los jueces que consuman la totalidad del molido para la puntuación de los atributos de sabor. Esta metodología se utilizó con el objetivo de lograr una muestra bien homogénea.

### **Análisis de aceptabilidad**

Se realizó bajo la misma metodología descrita en el Capítulo II. Las variables evaluadas fueron: color, sabor y aceptabilidad general. Se les instruyó a cada uno de los jueces que la aceptabilidad general integraba los atributos: apariencia general, color, sabor, textura.

### **Análisis estadístico**

Los datos experimentales fueron producto de 3 repeticiones y los resultados obtenidos fueron analizados empleando el programa estadístico InfoStat versión 2016 (InfoStat, 2016). Con los resultados obtenidos de todas las variables analizadas (químicas y sensoriales: análisis descriptivo y aceptabilidad) se calcularon medias y desvío estándar, y se compararon medias utilizando ANOVA y *test* posterior DGC ( $\alpha = 0,05$ ). Con los datos del almacenamiento se realizó un análisis de varianza bifactorial (interacción tratamiento\*tiempo) con un *test* de DGC para comparar y detectar diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre las medias de los tratamientos en el mismo y en los distintos períodos de tiempo, y así, evaluar la capacidad de las cubiertas para preservar la estabilidad química y sensorial de la nuez. Adicionalmente, para el análisis sensorial descriptivo, se realizó un análisis de regresión lineal para estudiar la evolución de las intensidades de los atributos en el tiempo y sus pendientes fueron comparadas por ANOVA y DGC ( $\alpha = 0,05$ ) para detectar diferencias significativas entre muestras. Los datos estandarizados de las variables químicas y sensoriales fueron sometidos al análisis de componentes principales (ACP) para detectar relaciones directas e inversas entre tratamientos y variables. Además, se determinaron las correlaciones entre las variables químicas y sensoriales mediante un análisis de correlación utilizando el coeficiente de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición química general de la HN

En la **Tabla 4.2** se exhibe la composición química general de la HN (deslipidizada y sin azúcares solubles) que fue empleada para la elaboración de las coberturas comestibles y de los granos de nuez evaluados en el capítulo II. La composición proximal de ambos productos presentó valores similares a aquellos encontrados en estudios previos (Mao y Hua, 2012).

**Tabla 4.2.** Composición química general de la muestra de nuez y de la harina de nuez (HN).

Composición	Porcentajes (g/100g)	
	Grano de nuez*	HN*
Humedad	4,44±0,37a	8,88±0,30b
Lípidos	64,06±0,25b	0,35±0,13a
Proteína	16,00±0,02a	49,36±2,09b
Ceniza	1,74±0,06a	4,46±0,11b
Hidratos de carbono	18,19±0,24a	45,83±1,92b
Fibra detergente neutro (FDN)	17,38±0,23a	43,79±0,43b
Fibra cruda (FC)	7,19±0,09	18,95±0,44

\*Medias ± desvíos estándar (n = 3; ANOVA y DGC,  $\alpha = 0,05$ ).

Mao y Hua (2012) que reportó valores similares a la harina de nuez deslipidizada utilizó un método de elaboración distinto al seguido en este trabajo. En dicho estudio, las nueces fueron molidas y luego deslipidizadas con n-hexano bajo agitación magnética por 3 horas y posteriormente se procedió a la filtración del molido varias veces. Dicho residuo fue colocado bajo campana extractora para su secado y posterior análisis. Existen otros trabajos en los cuales se ha estudiado la composición química de la harina de nuez deslipidizada pero, en éstos, el contenido de proteína encontrado fue inferior y el de carbohidratos superior. Estos resultados se deben a que en ese tipo de harinas no se realizó el proceso de extracción de los hidratos de carbono solubles con la solución alcohólica del 70%. Uno de estos trabajos mencionados es el de Labuckas *et al.* (2014) que reportó 38,1% de proteína y 49,5% carbohidratos, mientras que, en otro trabajo (Rabadán *et al.*, 2018) encontró 33,34% de proteína y 47,03% de hidratos de carbono. Al comparar el contenido

proteico de los granos de nueces y de la HN, se logró aumentar la concentración proteica en HN desde 16,00 g/100 g en nuez crudo hasta 49,36 g/100 g en la harina. Mientras que el contenido graso disminuyó hasta 0,35% en la HN. Estos resultados indican que esta es una muy buena materia prima proteica para elaborar coberturas comestibles baja en materia grasa y por lo tanto no va a tener cantidades significativas de ácidos grasos insaturados susceptibles al daño oxidativo. Sin embargo, otro estudio (Noshirvani *et al.*, 2017), indicó mejores propiedades en cuanto a hidrofobicidad de películas elaboradas a partir de carboximetil-celulosa dada por la presencia de bajas proporciones de ácidos grasos, lo cual disminuye la permeabilidad al vapor de agua. Esta información podría estar indicando que los lípidos remanentes en la HN podrían tener un efecto positivo en las propiedades de barrera al agua de las coberturas comestibles elaboradas con NH. Con respecto a la concentración de fibras, las FDN mostraron una mayor proporción en el contenido total de hidratos de carbono presentes en la muestra (43,79%, en un total de hidratos de carbono de 45.83%) y que, en conjunto con las proteínas presentes en las HN, conformaron más del 90% de la composición de la HN. La FDN está constituida por hemicelulosa, celulosa y lignina, por lo cual, su utilización para la elaboración de una cubierta podría aportarle las propiedades beneficiosas que tienen los derivados de la celulosa sobre las cubiertas.

## **Evaluación sensorial de las nueces con cubiertas comestibles**

### **Prueba descriptiva**

Las pruebas descriptivas se realizaron para identificar y cuantificar los atributos sensoriales presentes en los diferentes tratamientos para detectar cambios en la nuez al ser recubierta con las películas comestibles con o sin el agregado de antioxidantes. Los resultados de la evaluación sensorial descriptiva de los tratamientos de nueces frescas recubiertas (día 0) están presentes en la **Tabla 4.3**. La mayoría de los atributos no mostraron diferencias significativas en la intensidad entre las muestras, con la excepción de color, sabor oxidado y sabor amargo.

La intensidad del atributo color fue más alta en los tratamientos NPN, NPNP, y NPNB. La incorporación de la cobertura HN en los tratamientos les transfirió una

coloración más oscura a las nueces. Esto difirió con lo observado en el capítulo II, donde, la adición de la cubierta elaborada en base a un concentrado proteico (PS) no tuvo efecto sobre la intensidad de color. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares a aquellos obtenidos por Mehayar *et al.* (2012), donde la aplicación de una cubierta comestible en nueces elaborada a partir de cera carnauba les transfirió una coloración amarillenta a los tratamientos. En oposición, el tratamiento NMC presentó valores más bajos de intensidad de color por el efecto de la incorporación de la cobertura de MC que, produce un decrecimiento de la intensidad de este atributo (Grosso *et al.*, 2017). Un comportamiento similar fue observado en la conservación de paltas donde el color de las paltas recubiertas presentó un  $L^*$  más alto (más claro) que aquellas sin cobertura (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005).

Otro atributo que presentó diferencias entre tratamientos fue el gusto amargo. Los tratamientos NPN, NPNP y NPNB presentaron intensidades más bajas para este atributo, mientras que NMC y NC más altas. El atributo sabor oxidado, también, presentó diferencias entre los tratamientos. En las nueces frescas, el tratamiento control presentó una mayor intensidad de este atributo con respecto a los otros tratamientos. Esto puede explicarse a que la muestra sin cobertura desarrolla más rápidamente volátiles que pueden estar asociado al sabor rancio.

### **Test de aceptabilidad**

Las pruebas de aceptabilidad permiten conocer la percepción que tienen los consumidores con respecto a los tratamientos de nueces frescas recubiertas (día 0 de almacenamiento) y sin recubrimiento (natural) (**Fig. 4.1.**). Uno de los atributos evaluados fue aceptabilidad del sabor. Para este atributo, los tratamientos presentaron valores superiores a 5 (ni me gusta, ni me disgusta). Los valores más bajos de aceptabilidad los presentaron los tratamientos NPN y NMC (5,62 y 5,78, respectivamente), seguidos por NPNB, NC y NPNP con el valor más alto de aceptabilidad de sabor. Esto indica que la aplicación de la cubierta de NPN con extracto PAE tuvo un efecto positivo en el sabor de los tratamientos, ya que a los consumidores puntuaron más alto esta muestra. Esto coincide con lo descrito por Mehayar *et al.* (2012) donde evaluó la percepción de los consumidores

sobre la aplicación de distintas cubiertas comestibles sobre granos de nuez. En este estudio, la cubierta elaborada con PS-almidón de arveja-cera de carnauba (1 : 1 : 1) obtuvo valores mayores en sabor, suavidad, olor y aceptabilidad general, en comparación con el tratamiento sin cubierta comestible.

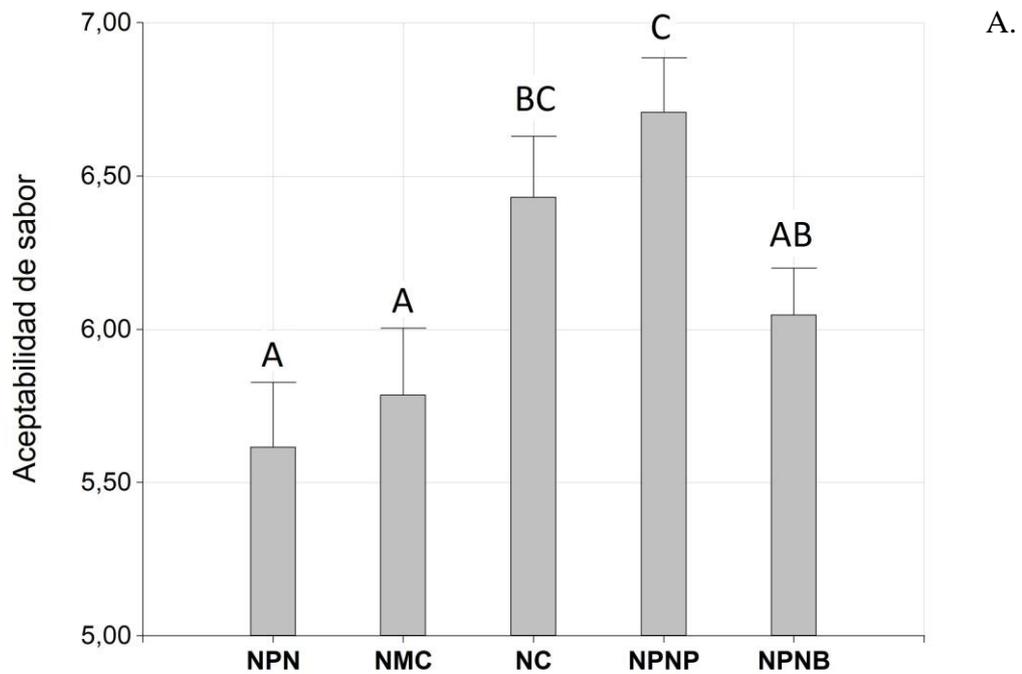
**Tabla 4.3.** Medias y desvíos estándar de las intensidades de atributos evaluados por análisis sensorial descriptivo de las muestras frescas (día 0) de nueces para los tratamientos NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT).

Atributo <sup>a</sup>	Tratamiento				
	NC*	NMC*	NPN*	NPNP*	NPNB*
<i>Apariencia</i>					
Intensidad de color	49,33±1,01 B	44,55±0,62 A	61,28±1,79 C	61,33±0,60 C	62,05±0,64 C
Brillo	35,89±1,24 A	28,61±1,39 A	28,78±3,14 A	29,89±3,75 A	37,11±2,13 A
<i>Sabor</i>					
Sabor a nuez	79,50±0,79 A	77,67±1,07 A	77,22±1,00 A	78,56±0,34 A	80,56±1,00 A
Oxidado	3,89±0,28 B	0,28±0,28 A	0,28±0,28 A	0,83±0,48 A	0,83±0,00 A
Cartón	30,33±1,02 A	28,06±1,28 A	28,00±0,42 A	27,94±0,11 A	29,00±1,01 A
<i>Gusto</i>					
Dulce	9,11±0,62 A	11,05±0,62 A	10,28±0,72 A	9,39±0,40 A	10,78±0,96 A
Salado	5,06±0,06 A	5,06±0,06 A	5,00±0,10 A	4,83±0,10 A	5,00±0,00 A
Amargo	31,78±0,86 B	29,28±1,47 B	26,06±1,33 A	26,55±0,89 A	26,11±0,64 A
Acido	15,06±0,24 A	14,11±0,24 A	15,67±0,51 A	15,39±0,62 A	15,39±1,26 A
<i>Factores de sensación</i>					
Astringencia	44,89±0,53 A	43,56±1,22 A	42,61±0,75 A	43,45±2,29 A	43,78±0,82 A
<i>Textura</i>					
Crujiente	42,89±0,31 A	43,89±0,46 A	43,50±1,01 A	44,78±0,61 A	44,89±0,49 A
Dureza	33,83±0,51 A	33,22±0,78 A	35,11±0,58 A	33,67±0,68 A	33,61±0,89 A

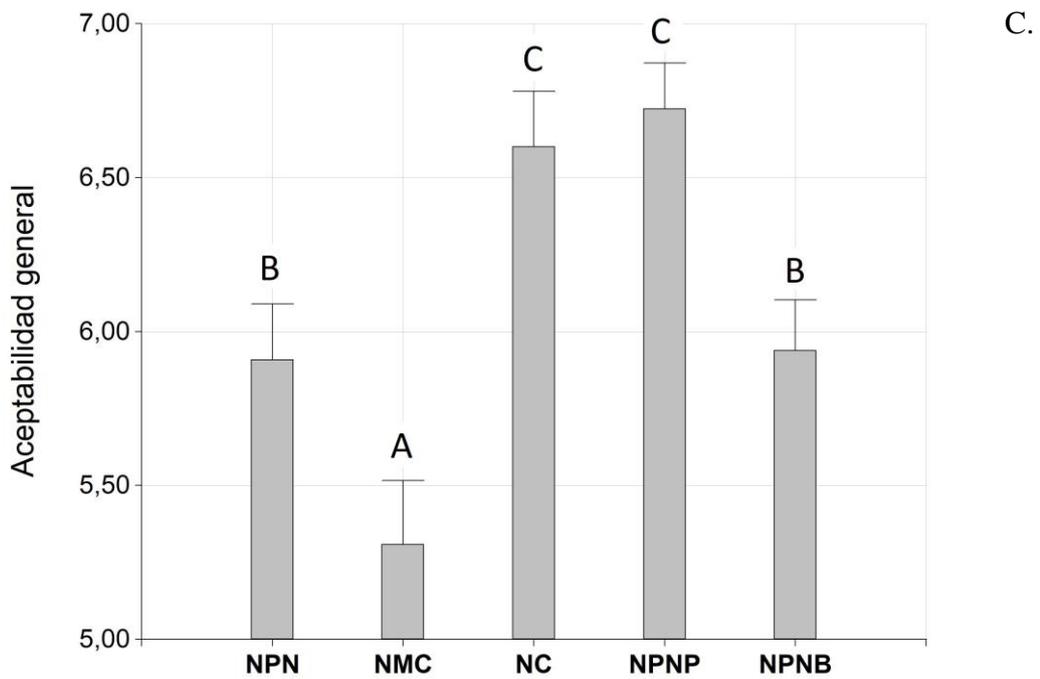
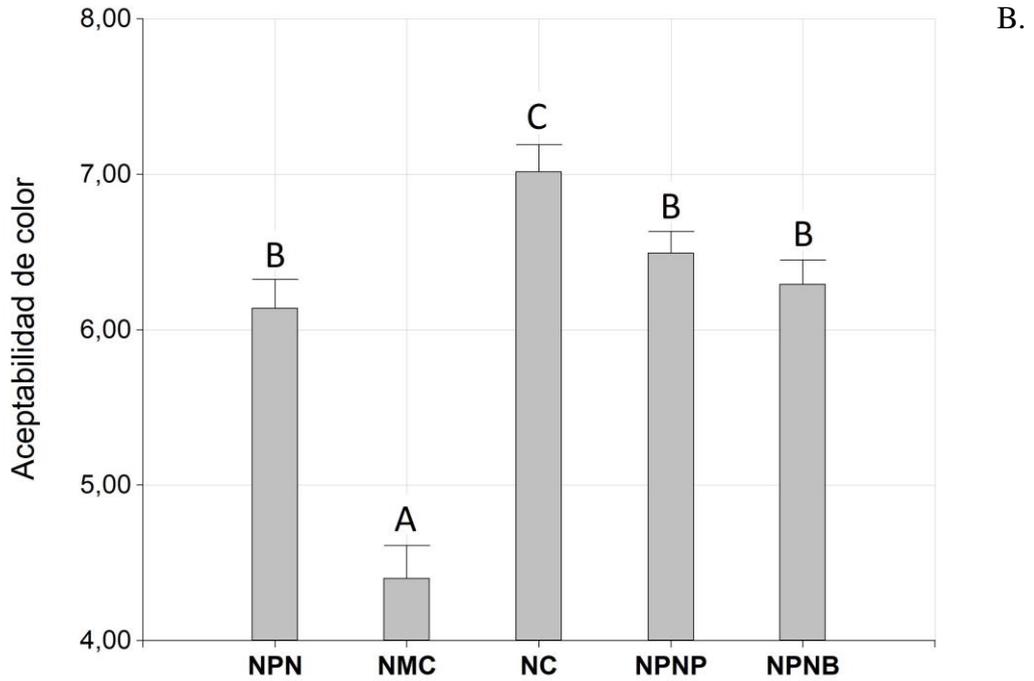
\*Letras distintas en la misma fila significan diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).

Con respecto a la aceptabilidad del atributo color, el tratamiento NMC presento los valores más bajos (4,4), mientras que el tratamiento NC el valor más alto (7,02). Un valor de 4,4 en la escala hedónica de 9 puntos indica una percepción cercana a me disgusta ligeramente, mientras que, un valor de 7 significa me gusta bastante. Esto implica que la aplicación de la cubierta de MC afectó en forma negativa la percepción de los consumidores. En el capítulo II, donde los consumidores también puntuaron a las nueces con esta cobertura de MC, con valores inferiores al resto de los tratamientos. Por el

contrario, la aplicación de la cubierta de NPN demostró valores altos de aceptabilidad de color (NPN 6,14; NPNP 6,49; NPNB 6,29). A pesar de transferirle una coloración un poco más oscura a las nueces este tipo de cobertura resultó positivo para la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.



**Fig. 4.1.** Valores medios y desvíos estándares obtenidos en la evaluación de aceptabilidad (escala hedónica 9 puntos) para las variables (A) color, (B) sabor y (C) aceptabilidad general para las nueces frescas (tiempo 0 días de almacenamiento) NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT y sin recubrimiento (NC).



**Fig. 4.1.** Valores medios y desvíos estándares obtenidos en la evaluación de aceptabilidad (escala hedónica 9 puntos) para las variables (A) color, (B) sabor y (C) aceptabilidad general para las nueces frescas (tiempo 0 días de almacenamiento) NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT y sin recubrimiento (NC). Continuación.

Finalmente, se evaluó la aceptabilidad general del producto nuez lo cual incluye el producto en un todo. El tratamiento que presentó menor aceptabilidad general fue NMC. Esto puede deberse a que fue el tratamiento con los puntajes más bajos para color y sabor. Los tratamientos con el puntaje más alto fueron NC y NPNP. Este resultado coincide con mayor aceptabilidad de color y sabor para estas dos muestras. Gayol *et al.*, (2009) reportó que las coberturas comestibles de sirope de tuna y algarrobo no presentaron diferencias significativas en la aceptabilidad con la muestra control en un experimento con almendras recubiertas siendo los valores observados en una escala hedónica de 9 puntos de 6,83, 6,65 y 6,70, respectivamente.

## **Análisis químicos**

Los resultados de la medición de los indicadores de oxidación lipídica como IP, DC, TC, CC, IA y cambios en la composición de ácidos grasos del estudio de almacenamiento de las nueces recubiertas con película comestible preparada a base de proteína de nuez se muestran en las **Fig. 4.2. y 4.2.** Se observó que los indicadores de oxidación como IP, TC, DC e IA mostraron un incremento en el tiempo para todos los tratamientos, mientras que el indicador CC disminuyó con el tiempo.

En relación con el indicador IP (**Fig. 4.2.a.**), los valores medios de los tratamientos, considerando todos los períodos de tiempo, evidenciaron que el tratamiento con valores más bajos de IP fue NPNB (1,50 meqO<sub>2</sub>/kg aceite), seguido por NPNP (2,35 meqO<sub>2</sub>/kg) y NMC (2,46 meqO<sub>2</sub>/kg). El primer día de medición (día 0), los tratamientos presentaron un valor medio de 1,13 (meqO<sub>2</sub>/kg), sin diferencias significativas entre ellos ( $\alpha = 0,05$ ). A partir de ese período los valores comenzaron a incrementarse para todos los tratamientos. En el día 42, el tratamiento con el valor más alto fue NC (2,91 meqO<sub>2</sub>/kg), seguido por los tratamientos NPNP, NMC y NPN con valores intermedios (1,95; 2,06 y 2,32 meqO<sub>2</sub>/kg, respectivamente), y, finalmente NPNB con el valor más bajo (1,16 meqO<sub>2</sub>/kg). Esta tendencia se vio interrumpida en el último día de medición. En el día 98, NPN (5,81 meqO<sub>2</sub>/kg) presentó el valor más alto de IP, seguido por NC (4,96 meqO<sub>2</sub>/kg), luego NPNP (4,27 meqO<sub>2</sub>/kg) y NMC (4,23 meqO<sub>2</sub>/kg) sin diferencias, y finalmente NPNB (2,57 meqO<sub>2</sub>/kg). Estos resultados coinciden con lo presentado por diversos trabajos que han

encontrado una mejor protección por parte de cubiertas comestibles elaboradas a partir de algún derivado de celulosa comparado con aquellas elaboradas a partir de proteínas. Esto mismo fue comprobado en el capítulo II donde, se demostró un menor incremento en el IP en el tratamiento recubierto con MC (1,20 meqO<sub>2</sub>/kg en el día 210) comparado con el tratamiento recubierto con la proteína del suero de la leche (PS) (2,53 meqO<sub>2</sub>/kg en el día 210) (Grosso *et al.*, 2018b). En este mismo sentido, (Riveros *et al.*, 2013) reportó que, en un estudio de almacenamiento de granos de maní a 40 °C almacenados por 56 días, la cubierta elaborada en base a celulosa: carboximetil-celulosa (CMC), actuó retardando de manera más eficiente el incremento del IP en relación con la cubierta de PS, ya que, en el último día de almacenamiento, el tratamiento con CMC presentó un valor inferior de IP. Las diferencias en el comportamiento de las cubiertas sobre los diversos alimentos pueden deberse a diferencias en sus propiedades. Las cubiertas elaboradas a partir de derivados de la celulosa como MC y CMC, han sido estudiadas por proveer barreras contra el traspaso del oxígeno, aceite y/o humedad (Huber y Embuscado, 2009). Particularmente la metil-celulosa presenta una fuerza moderada, resistencia a la migración de aceite y grasas, y actúa como una barrera moderada a la humedad y oxígeno (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005). En cambio, las cubiertas elaboradas a partir de proteínas han demostrado tener buen efecto protector contra el daño mecánico, y una buena barrera contra los gases. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica estas cubiertas tienen algunas limitantes en relación con la incorporación de la humedad, lo cual reduce su eficiencia (Hassan *et al.*, 2018). Por lo tanto, el mayor incremento en el IP en el tratamiento NPN, comparado con NMC, puede deberse a la pobre barrera frente a la humedad que ejerce (Perez-Gago *et al.*, 2005), lo cual es un factor que puede fomentar la oxidación lipídica en alimentos. El tratamiento recubierto con PN con la adición del extracto PAE de nuez (NPNP) presentó un IP similar a NMC, que fue inferior al tratamiento con la cubierta sola (NPN). Este efecto probablemente se deba a la incorporación del extracto polifenólico de nuez cuya actividad antioxidante fue demostrada en el capítulo III. Además, una alta actividad antioxidante proveniente de extractos de nuez fue también reportada por otros autores (Fukuda *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009), por lo tanto, el extracto polifenólico de nuez podría haber actuado secuestrando los radicales libres liberados durante los procesos de oxidación, retardando el desencadenamiento de estas reacciones.

Con respecto a los DC (**Fig. 4.2.b.**), los tratamientos presentaron el siguiente orden creciente, considerando la media obtenida de la medición realizada en todos los períodos de tiempo: NPNB (13,69) < NPNP (15,63) < NMC (16,84) < NC (22,00) y NPN (22,13). Inicialmente, los tratamientos presentaron una media de 2,52 sin diferencias significativas entre ellos. En el período de tiempo siguiente (día 21), el único tratamiento que presentó un incremento significativo fue NC, sin embargo, en la última medición (día 98), NC y NPN presentaron los valores más altos y sin diferencias entre ellos (52,78 y 54,05, respectivamente). Los valores obtenidos fueron inferiores en NMC (37,87), seguido por NPNP (34,42) y finalmente, NPNB (31,10).

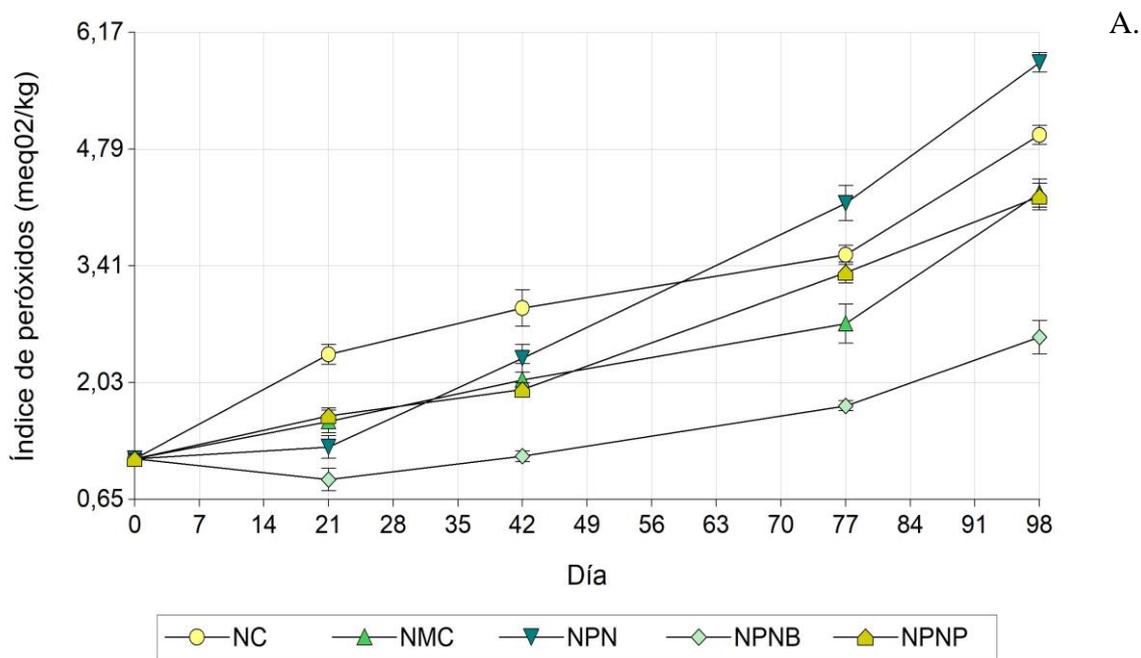
Los TC demostraron una tendencia similar a los DC (**Fig. 4.2.c.**). El día inicial de medición, los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos, con un valor medio de 0,51. Luego, el valor de TC de los tratamientos comenzó a incrementarse, aunque las diferencias comenzaron a hacerse visibles a partir del día 77 de medición. Al final del almacenamiento (día 98), se encontraron diferencias significativas entre algunos de los tratamientos. Mientras que NPN y NC presentaron los valores más altos para el indicador TC, los tratamientos NMC, NPNB y NPNP los más bajos (22,68, 23,38, 24,62, respectivamente).

Los indicadores IP, DC y TC desarrollaron un mayor valor para NC y NPN al final del almacenamiento (98 días a 40 °C). Sin embargo, si analizamos como fueron evolucionando estos indicadores es de destacar que hasta el día 42 de almacenaje los valores fueron menores para NPN con respecto a NC. Esto indica que la cobertura elaborada con HN ofreció protección en contra de los procesos de deterioro oxidativo, pero posteriormente fue perdiendo esta capacidad. Mientras que la cobertura elaborada con DC tuvo un efecto protector durante todo el almacenamiento si la comparamos con la muestra NC. Esto concuerda con lo informado en el capítulo II, donde se pudo demostrar el efecto protector de esta cubierta, ya que en el último día de medición el tratamiento con MC (NMC) presentó un valor inferior de DC y TC (2.26 y 0.17) en comparación con los otros tratamientos (NC, NCMC y PS) (Grosso *et al.*, 2018b). Esto nuevamente puede deberse a las propiedades que posee la metil-celulosa, que tiene un alto potencial de inhibición de la penetración de oxígeno, lo que incrementa la resistencia química y microbiana, comparado con otros derivados de la celulosa (Shahidi *et al.*, 1999). Por otra parte, el tratamiento

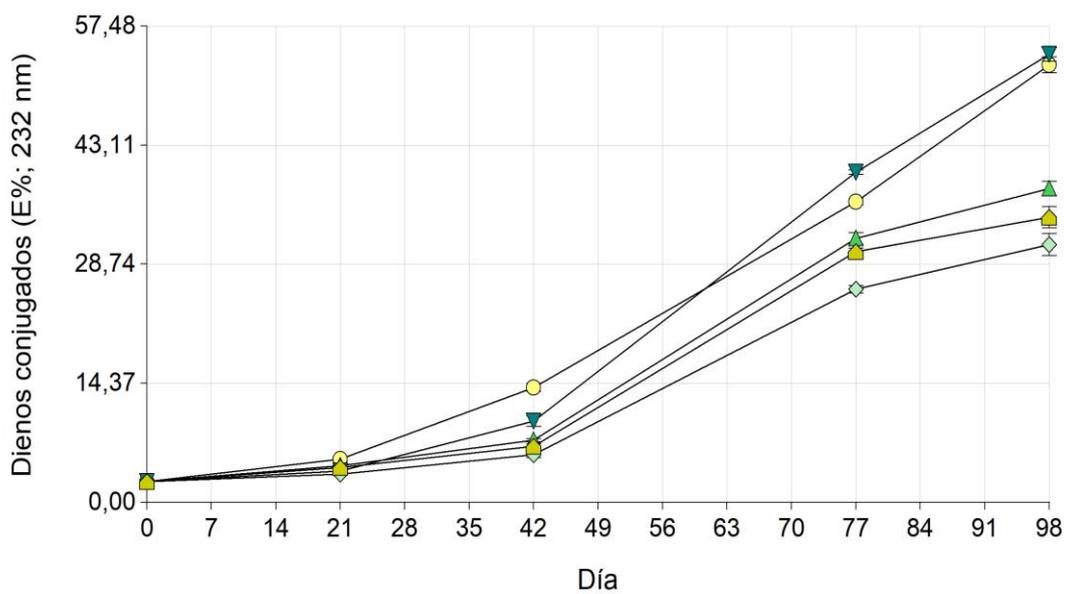
NPNP presentó un mejor comportamiento en la preservación de la nuez que NMC y NPN. Esto puede deberse a la actividad antioxidante del extracto polifenólico de nuez. Algunos trabajos también han demostrado que el uso de cubiertas junto con antioxidantes naturales mejora el efecto protector de la cubierta sola. Riveros *et al.*, (2013) demostró en un estudio de almacenaje con granos de girasol tostado, que el tratamiento recubierto con CMC y con la adición de aceite esencial de tomillo como antioxidante natural, desarrolló un menor contenido de DC, que el tratamiento con la cubierta comestible sin la adición de antioxidante.

Con respecto al indicador de oxidación de lípidos IA, en el día 0 de almacenamiento, no se detectó la presencia de este indicador en los tratamientos, lo que sugiere que los granos de nueces aún no habían formado compuestos de oxidación secundaria (**Fig. 4.2.d.**). A partir del día 42 de almacenamiento, los valores de IA se incrementaron para todos los tratamientos. NMC, NPNP y NBHT fueron los que presentaron los niveles más bajos (0,56, 0,33 y 0,13; respectivamente) seguido por NPN y NC (1,28 y 2,15; respectivamente) ( $\alpha = 0,05$ ). Finalmente, en el último día de almacenamiento, se observó que el único tratamiento que presentó el valor significativamente más alto fue NC (3,64). Este resultado confirma que las cubiertas comestibles elaboradas con HN y MC ejercieron protección contra el deterioro en los tratamientos NPN y NMC dado su efecto de barrera contra la difusión del oxígeno disminuyendo la formación de compuestos de oxidación secundaria. Algunos trabajos también han observado la protección contra la formación de IA por parte de diversas cubiertas comestibles. Por ejemplo, Gayol *et al.* (2009), en un estudio de almacenaje (40°C) con almendras tostadas, detectó un incremento superior en el IA en el último día de almacenaje (día 60) en el tratamiento control (3,23) en relación con el tratamiento recubierto con jarabe de tuna (0,67). Los valores más bajos de IA en los tratamientos NPNP y NBHT pueden atribuirse, además del efecto protector de la cubierta, al efecto protector del antioxidante que puede actuar retardando los procesos de deterioro oxidativo de los lípidos. Ese mismo efecto se pudo visualizar en el estudio realizado por Quiroga *et al.* (2013) donde, semillas de girasol tostado con la adición de aceites esenciales de orégano presentó un valor más bajo de IA que el tratamiento control durante un almacenamiento de 60 días.

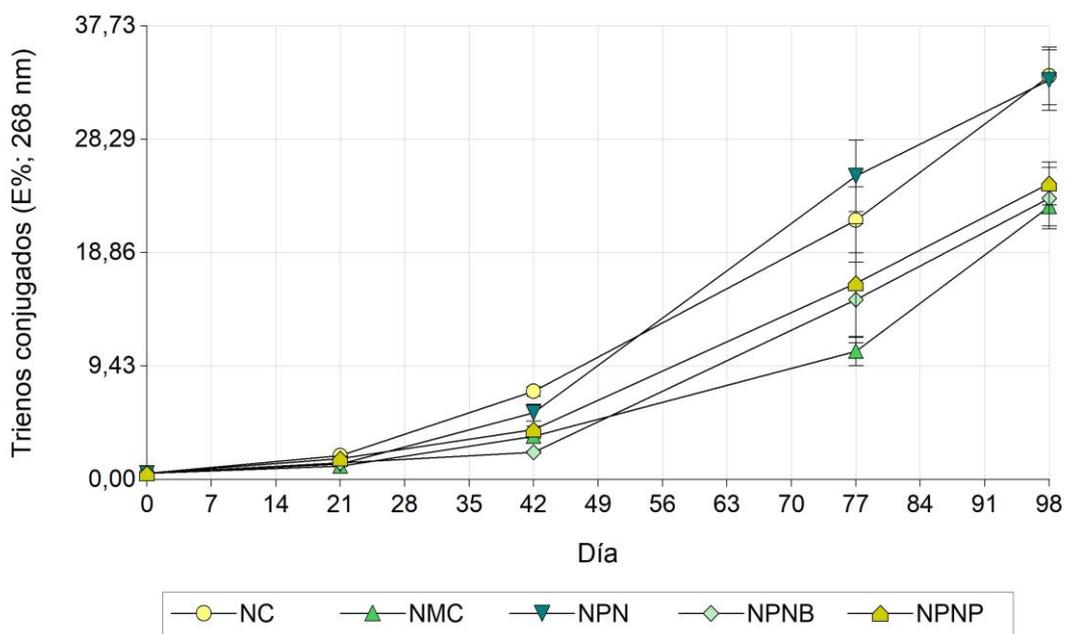
Los carotenoides son compuestos que ejercen un cierto efecto antioxidante y van disminuyendo su contenido durante el tiempo de almacenaje a medida que se van deteriorando por procesos oxidativos (Frankel, 2005). Con respecto al indicador CC, las medias obtenidas en los tratamientos considerando la totalidad de los períodos medidos indican que NC presentó el valor más bajo (1,83), seguido por NMC (2,08), NPN (2,46), NPNB (2,63) y NPNP (3,15). A lo largo del almacenamiento, el CC disminuyó para todos los tratamientos (**Fig. 4.2.e**).



**Fig. 4.2.** Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-celulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT).

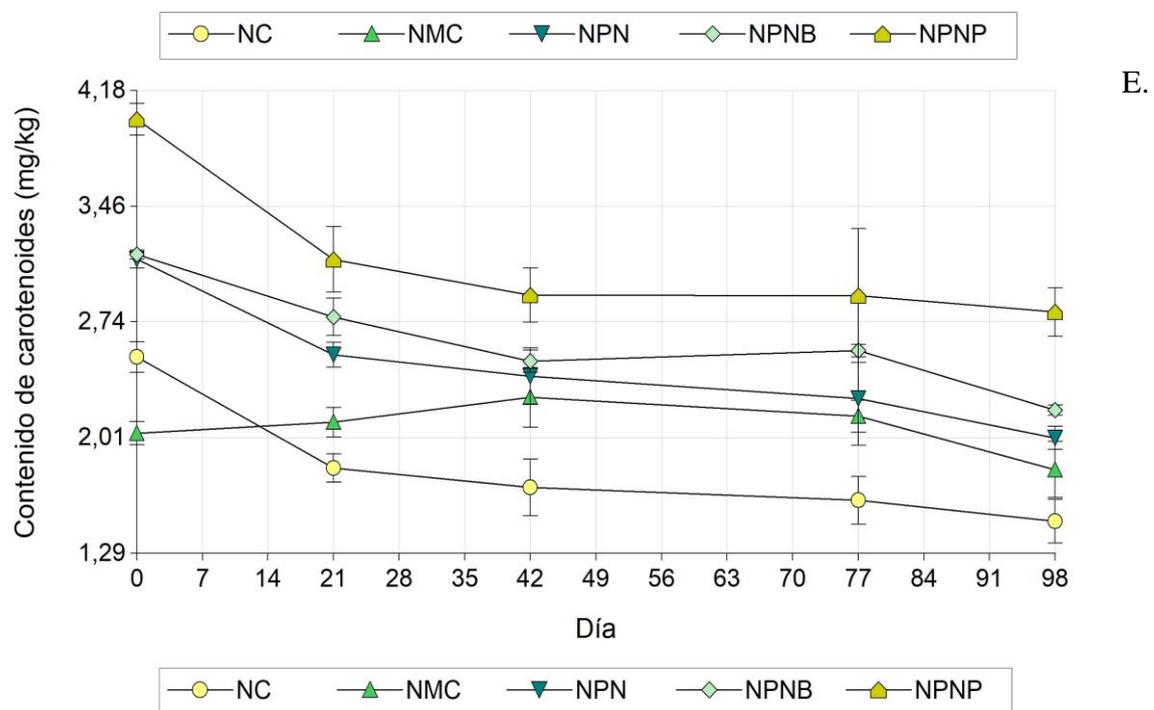
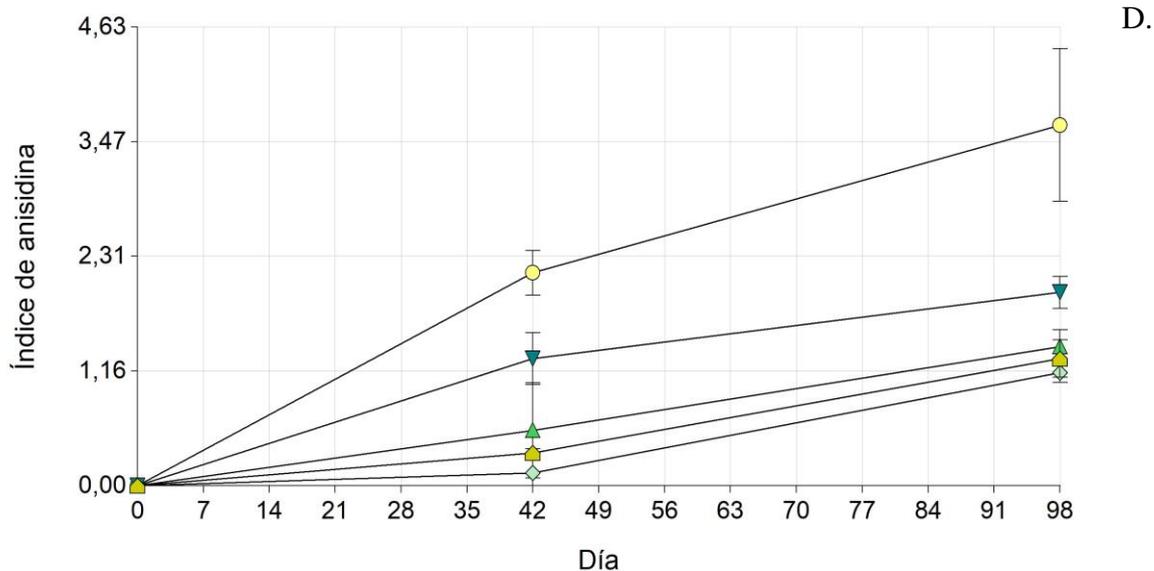


B.



C.

**Fig. 4.2.** Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación.



**Fig. 4.2.** Valores de los indicadores químicos de oxidación lipídica analizados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) índice de peróxidos, (B) dienos conjugados, (C) trienos conjugados, (D) índice de anisidina y (E) contenido de carotenoides. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación.

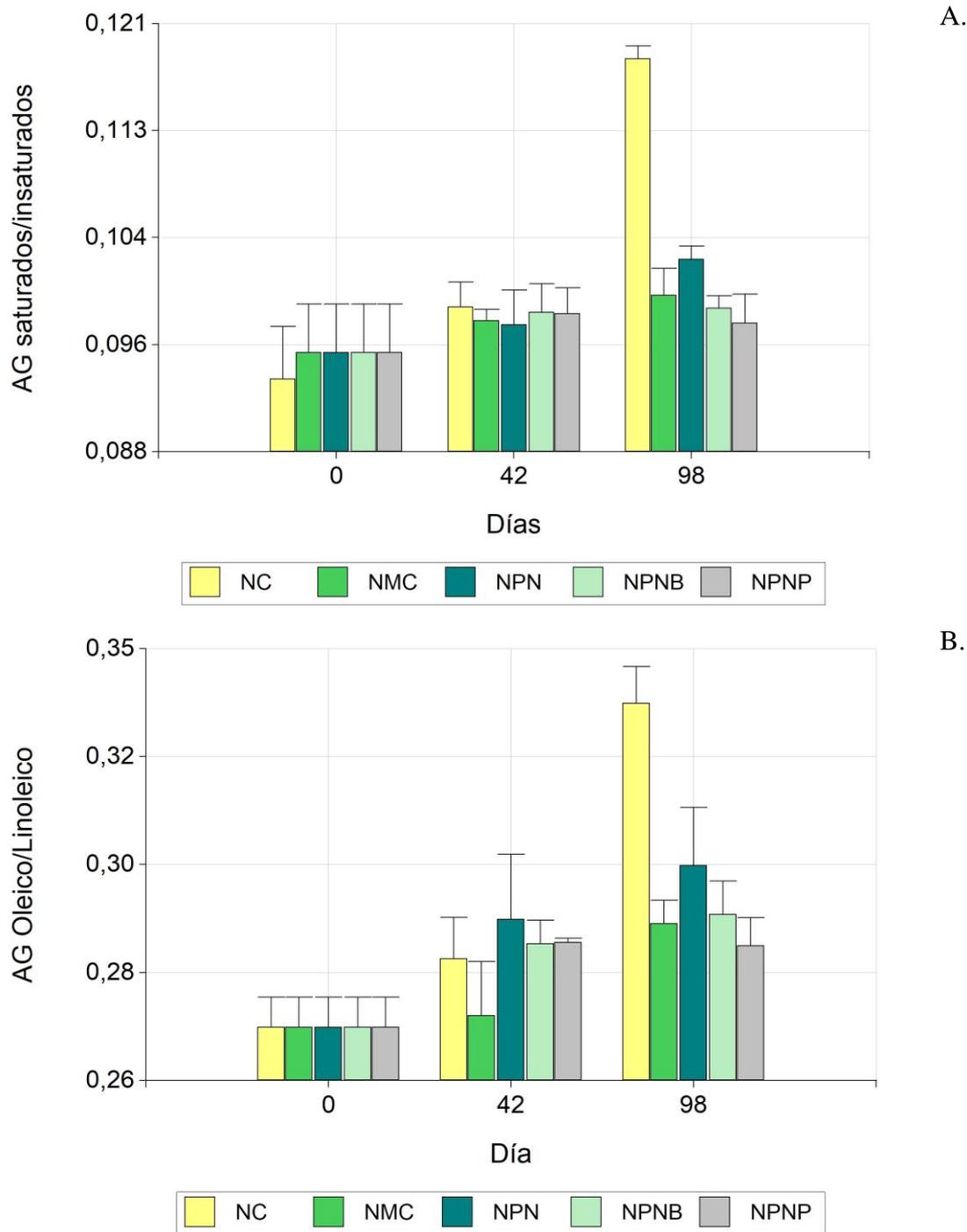
En el día 0 de almacenamiento NPNP presentó los valores más altos para este indicador (4,00), seguido por NPN y NPNB (3,13 y 3,16, respectivamente) y con menor contenido NC y NMC (2,52 y 2,04, respectivamente). En el último día de almacenaje, los

tratamientos con los valores más bajos para este indicador fueron NC (1,49) y NMC (1,81), seguido por NPN (2,01), NPNB (2,19) y NPNP (2,80). Estos resultados concuerdan con lo observado en el capítulo III, donde, el tratamiento con aceite nuez adicionado con extracto PAE presentó un valor inicial y final más alto de carotenoides respecto a la muestra control. Este resultado confirma lo ya observado en el Capítulo III donde se sugiere que la presencia de los extractos de polifenoles de nuez puede contener compuestos como taninos que le aportan coloración que absorben en la misma longitud de onda que los carotenoides (Grosso *et al.*, 2018a).

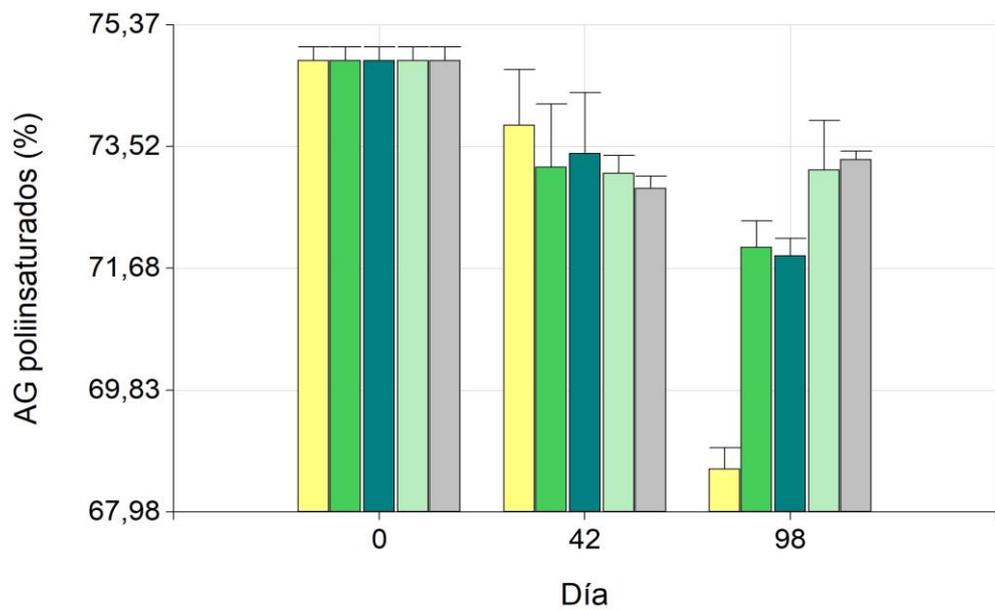
Con respecto a la composición de ácidos grasos, se pudieron detectar cambios en los mismos a lo largo del almacenaje. En relación a la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados (S/I), se pudo detectar un incremento de esta relación, sin embargo, el único tratamiento que presentó un incremento significativo en el último día de almacenamiento fue el tratamiento control (**Fig. 4.3.a.**). La misma tendencia se pudo apreciar en la relación oleico/linoleico (O/L), en la cual, se produjo un aumento en el tratamiento NC (**Fig. 4.3.b.**) (de 0,27 a 0,34), mientras que, no se exhibió cambios significativos en las otras muestras (NMC, NPN, NPNP y NPNB). Considerando los resultados obtenidos en ambas variables, el tratamiento control fue el que presentó un mayor incremento en dichas relaciones (saturados/insaturados y oleico/linoleico), como producto de la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados, integrados en primer lugar por el ácido linoleico y en segundo por el linolénico. Este deterioro por parte en el tratamiento control se debe a que los ácidos grasos insaturados son los primeros en degradarse por la debilidad de sus dobles enlaces. De esta manera, se pudo detectar un efecto protector de ambas cubiertas comestibles (MC y PN) sobre los granos de nuez disminuyendo el deterioro oxidativo de los ácidos grasos, principalmente el de los ácidos grasos esenciales poliinsaturados. Esto concuerda con lo informado por Martín *et al.* (2016) en un estudio de almacenamiento en maní utilizando dos tipos de envases distintos (envase de polipropileno y envase alta barrera), en el que el tratamiento almacenado en envase de polipropileno tuvo una mayor degradación de los ácidos grasos poliinsaturados como consecuencia del deterioro lipídico de la muestra. Según estos autores, este efecto se produjo debido a que las bolsas de polipropileno permitieron una mayor penetración de

gases en relación a las de alta barrera, lo cual facilitó el deterioro oxidativo en esas muestras de maní.

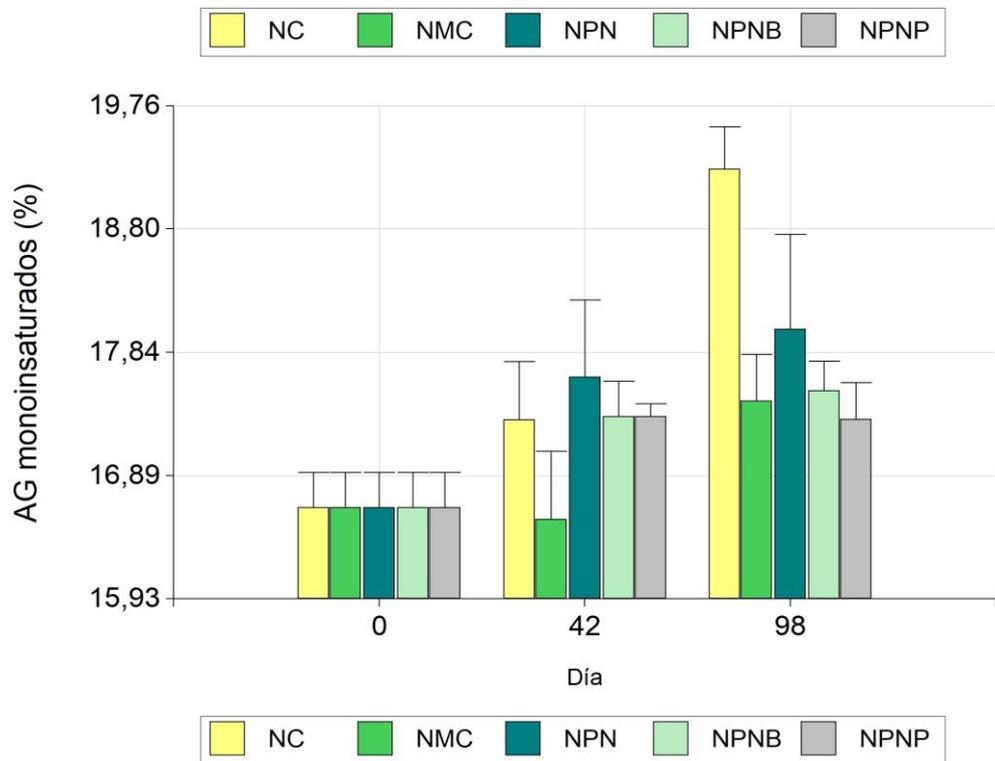
En relación a la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), se produjo un decrecimiento en su porcentaje en todos los tratamientos durante el almacenamiento (**Fig. 4.3.c.**). Sin embargo, en el último día de almacenaje, el tratamiento con la mayor pérdida de estos compuestos fue NC, que decreció de un 74,83% a un 68,63%. En relación al porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) (**Fig. 4.3.d.**), el tratamiento control fue el que presentó un mayor porcentaje relativo de estos al final de almacenaje, el cual incrementó su proporción de 16,64 a 19,27%. Esto concuerda con lo informado por (Asensio *et al.*, 2013) en un estudio donde se evaluó el porcentaje de ácido oleico en las muestras a lo largo del almacenamiento, en muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esenciales de orégano. Mediante este trabajo, se demostró que el tratamiento control (sin agregado de aceites esenciales) presentó un mayor incremento de dicho ácido graso, en relación con los tratamientos con antioxidantes indicando que este aumento de la proporción del ácido oleico se debe a que las muestras sufrieron una mayor pérdida de ácidos grasos poliinsaturados. Al igual que en el presente estudio, se produjo un menor incremento de la proporción del ácido oleico a lo largo del almacenaje en las muestras con películas comestible que ejercieron un efecto antioxidante favoreciendo la protección de los alimentos ricos en lípidos.



**Fig. 4.3.** Porcentajes relativos de ácidos grasos como indicadores químicos de oxidación de lípidos analizados en nueces con y sin coberturas durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) Relación de porcentajes de ácidos grasos (AG) saturados/insaturados, (B) AG Relación de porcentajes de ácidos grasos Oleico/Linoleico, (C) AG poliinsaturados (%) y (D) AG monoinsaturados (%). Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto de polifenoles de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT).



C.

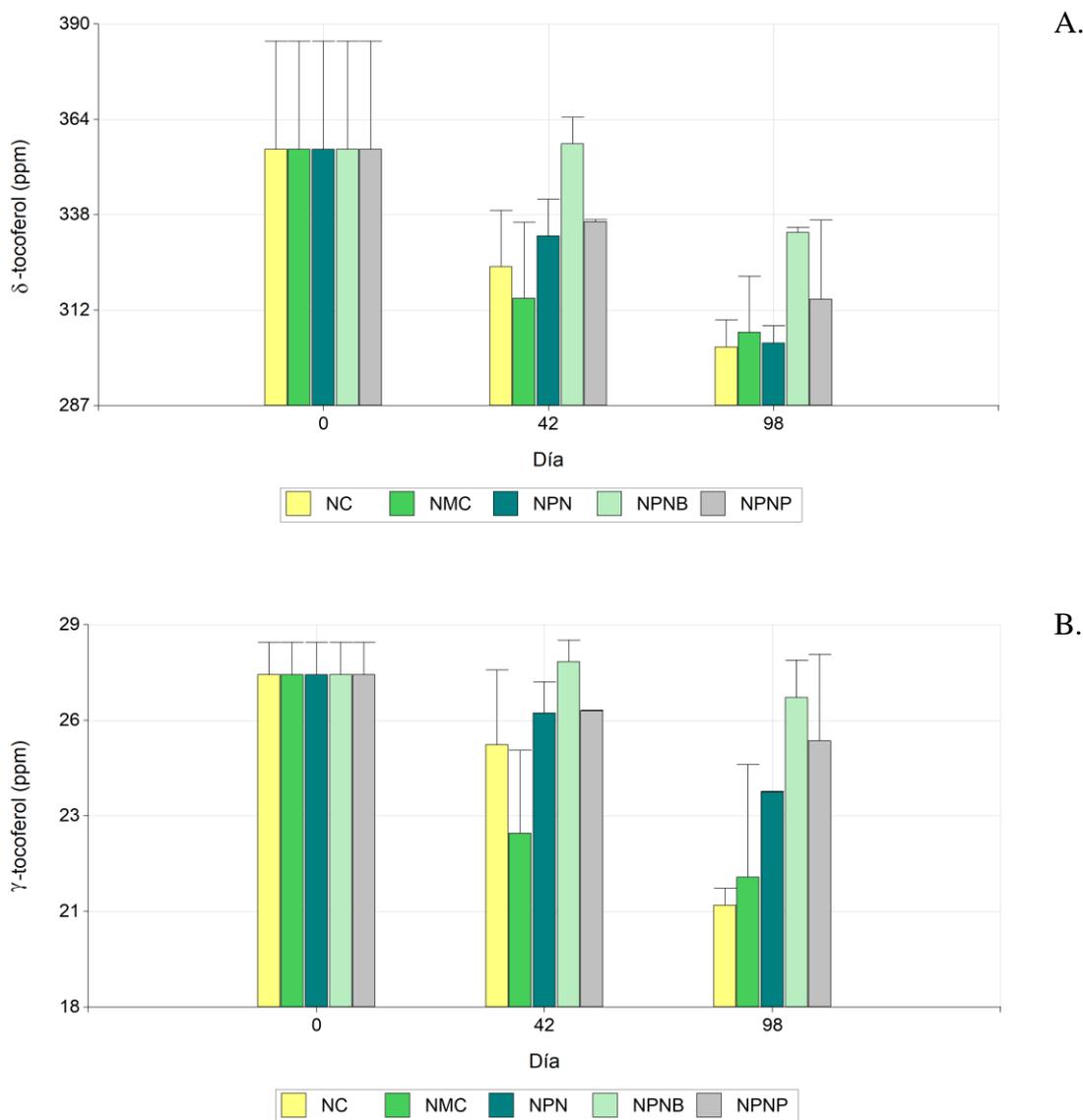


D.

**Fig. 4.3.** Porcentajes relativos de ácidos grasos como indicadores químicos de oxidación de lípidos analizados en nueces con y sin coberturas durante el almacenamiento (98 días; 40 °C). (A) Relación de porcentajes de ácidos grasos (AG) saturados/insaturados, (B) AG Relación de porcentajes de ácidos grasos Oleico/Linoleico, (C) AG poliinsaturados (%) y (D) AG monoinsaturados (%). Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto de polifenoles de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación.

Los tocoferoles son antioxidantes naturales que se obtienen de los vegetales y los mismos se consumen a medida que se van oxidando en el tiempo (Frankel, 2005). Con respecto a los tocoferoles, los tratamientos presentaron los siguientes valores medios de composición en el día 0 de almacenaje:  $\gamma$ -tocoferol (355,93 mg/kg),  $\delta$ -tocoferol (27,27 mg/kg),  $\alpha$ -tocoferol (4,93 mg/kg) y  $\beta$ -tocoferol (0,95 mg/kg), con un valor de 389,08 mg/kg de tocoferoles totales. Estos resultados concuerdan con los resultados presentados por Abdallah *et al.* (2015) para 6 tipos distintos de variedades de nueces. En ese estudio, se describió que el compuesto predominante fue  $\gamma$ -tocoferol cuyos valores oscilaron entre variedades de 358,95 a 238,45 mg/kg, seguido por  $\delta$ -tocoferol de 16,76 a 44,76 mg/kg,  $\alpha$ -tocoferol de 1,93-12,81 mg/kg y  $\beta$ -tocoferol como el compuesto menos predominante que varió de 0,31 a 3,24 mg/kg.

A lo largo del almacenamiento, algunos tocoferoles desaparecieron de la composición de la nuez mientras que otros disminuyeron su contenido (**Fig. 4.4.**). En el día final de almacenaje (día 98) se obtuvo un contenido de tocoferoles totales promedio (considerando todos los tratamientos) de 335,94 mg/kg. Vaidya y Eun (2013), también visualizaron un decrecimiento del contenido total de tocoferoles, en un ensayo de estabilidad de aceite de nuez utilizando nueces tostadas y no tostadas. En ese ensayo se produjo un decrecimiento desde 314,88 mg/kg a 234,58 mg/g luego de 12 días de almacenaje en aceite de nuez no tostadas, mientras que, en nueces tostadas disminuyó de 277,77 a 238,63 mg/g, así, demostrando que la estabilidad de los tocoferoles se incrementó con un tostado del grano previo a la extracción del aceite. En el corriente estudio, en el día 98 de medición,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -tocoferol no se detectaron en la composición de la nuez. Mientras que  $\gamma$ -tocoferol (**Fig. 4.4.a.**) tuvo un contenido inferior al final del almacenamiento en todos los tratamientos siendo aún menor en NC y NMC (302,42 306,40 mg/kg, respectivamente) seguido por NPN y NPNP (303,45 y 315, 30 mg/kg, respectivamente) y encontrando el valor más alto en NPNB (333,37 mg/kg). Con respecto a  $\delta$ -tocoferol, los tratamientos que presentaron contenido mayor fueron NPNP y NPNB (25,45 y 26,64 mg/kg, respectivamente), mientras que NC, NMC y NPN (20,93, 21,70 y 24,04 mg/kg, respectivamente) fueron inferiores. Esto indica que las cubiertas con la inclusión de antioxidante (PAE y BHT) mostraron una mejor estabilidad de tocoferoles de las nueces en el tiempo.



**Fig. 4.4.** Contenido de tocoferoles en nueces recubiertas y sin recubrimiento almacenadas 98 días a 40 °C. (A)  $\delta$ -tocopherol y (B)  $\gamma$ -tocopherol. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT).

Los tocoferoles son moléculas muy propensas a la descomposición, en especial a temperaturas elevadas y en presencia de moléculas de oxígeno, lo que lleva a que se inicie la formación de productos de degradación (Christopoulos y Tsantili, 2011). Por lo tanto, los antioxidantes pueden actuar retardando los procesos de oxidación al secuestrar los radicales libres formados en estos procesos de deterioro. Otros estudios han evaluado la

estabilidad de los tocoferoles durante el almacenaje de productos, como por ejemplo el de Silva *et al.*, (2010) que describió un decrecimiento del contenido de tocoferoles en muestras de maní tostado en 84 días de almacenamiento mostrando los siguientes resultados:  $\gamma$ -tocoferol de 22,94 a 11,4 mg/100 g aceite,  $\alpha$ -tocoferol de 15,62 a 7,08 mg/100 g aceite,  $\delta$ -tocoferol de 1,24 a 0,95 mg/100 g aceite y  $\beta$ -tocoferol de 0,47 a 0,34 mg/100 g aceite. Este autor le adjudicó a los procesos de oxidación lipídica, la pérdida de antioxidantes del maní, incluyendo los tocoferoles, ya que estas moléculas son un tipo de antioxidante soluble en lípidos que son potentes secuestrantes de radicales libres. Martín *et al.*, (2016) también encontró un decrecimiento significativo de los contenidos de  $\alpha$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol durante el almacenaje, en muestras de maní tostado almacenadas en distintos tipos de envases. En el último día de almacenamiento (día 60), detectó que el contenido de ambos compuestos fue inferior en las muestras almacenadas en envases de polipropileno que, aquellas, almacenadas en envases de alta barrera. En ese trabajo se argumentó que la mayor degradación de los tocoferoles se produjo en bolsas de polipropileno debido al mayor grado de deterioro oxidativo dada la mayor presencia de oxígeno en ese tipo de envase y esta molécula a mayor concentración acelera el deterioro de tocoferoles y lípidos (Roman *et al.*, 2013).

## **Cambios sensoriales de las nueces durante el almacenamiento**

Las intensidades de algunos atributos sensoriales se vieron alteradas en el tiempo, mientras que, las de otros se mantuvieron constantes durante almacenamiento. Las intensidades de los atributos sensoriales que cambiaron significativamente durante el almacenamiento ( $p < 0,05$ ) se presentan en la **Fig. 4.5**. Con respecto al atributo color, Los valores medios de los tratamientos obtenidos de todas las mediciones de todos los períodos de almacenaje se agruparon por un lado los tratamientos con cobertura de HN (NPN 64,86; NPNP 65,41 y NPNB 64,32) que presentaron los valores medios más altos, seguidos por NC (59,82) y NMC que tuvo el valor más bajo (51,76). En el día 0 de almacenamiento, NMC presentó el valor más bajo de intensidad de este atributo (44,55), seguido por NC (49,33) y finalmente por NPN, NPNB y NPNP (61,28; 61,33 y 62,06, respectivamente). A lo largo del almacenamiento la intensidad de este atributo se incrementó para todos los tratamientos (**Fig. 4.5.a**). En el último día de almacenamiento NC presentó el valor más

alto (70,40), seguido por NPNP, NPN y NPNB (66,53; 66,47 y 65,67, respectivamente) y finalmente por NMC con el valor más bajo (62,33). La mayor diferencia en incremento de la intensidad del atributo fue en NC, seguido por NMC, en relación con el resto de los tratamientos. Un mayor incremento está asociado a un mayor proceso de oxidación de los componentes que recubren el grano tal como se describe en otro trabajo (Chatrabnous *et al.*, 2018) donde se detectó un mayor oscurecimiento del tegumento de nuez en granos naturales sin agregados en comparación con otros adicionados con aceite esencia de tomillo en un almacenaje de 28 días (25 °C, en oscuridad). Adicionalmente, Koyoncu *et al.* (2003) reportaron que el tiempo de almacenaje es uno de los factores que afecta el color de la nuez, ocurriendo un mayor oscurecimiento a un período de almacenaje más prolongado. Christopoulos y Tsantili (2012) encontraron que los tratamientos de nueces que sufrieron un mayor “amarronamiento” u oscurecimiento, fueron aquellos que estuvieron expuestos a mayores temperaturas (20 °C) y mayor exposición al oxígeno. Estos autores atribuyeron este efecto de amarronamiento a la oxidación química o enzimática de los fenoles presentes en su tegumento (Manzocco *et al.*, 2001). En el presente estudio, los tratamientos NPN, NPNP y NPNB sufrieron un menor amarronamiento en el tiempo, lo cual puede deberse al efecto protector ejercido por la cubierta de proteína de nuez, al disminuir el intercambio de oxígeno que afecta directamente sobre la oxidación de los fenoles.

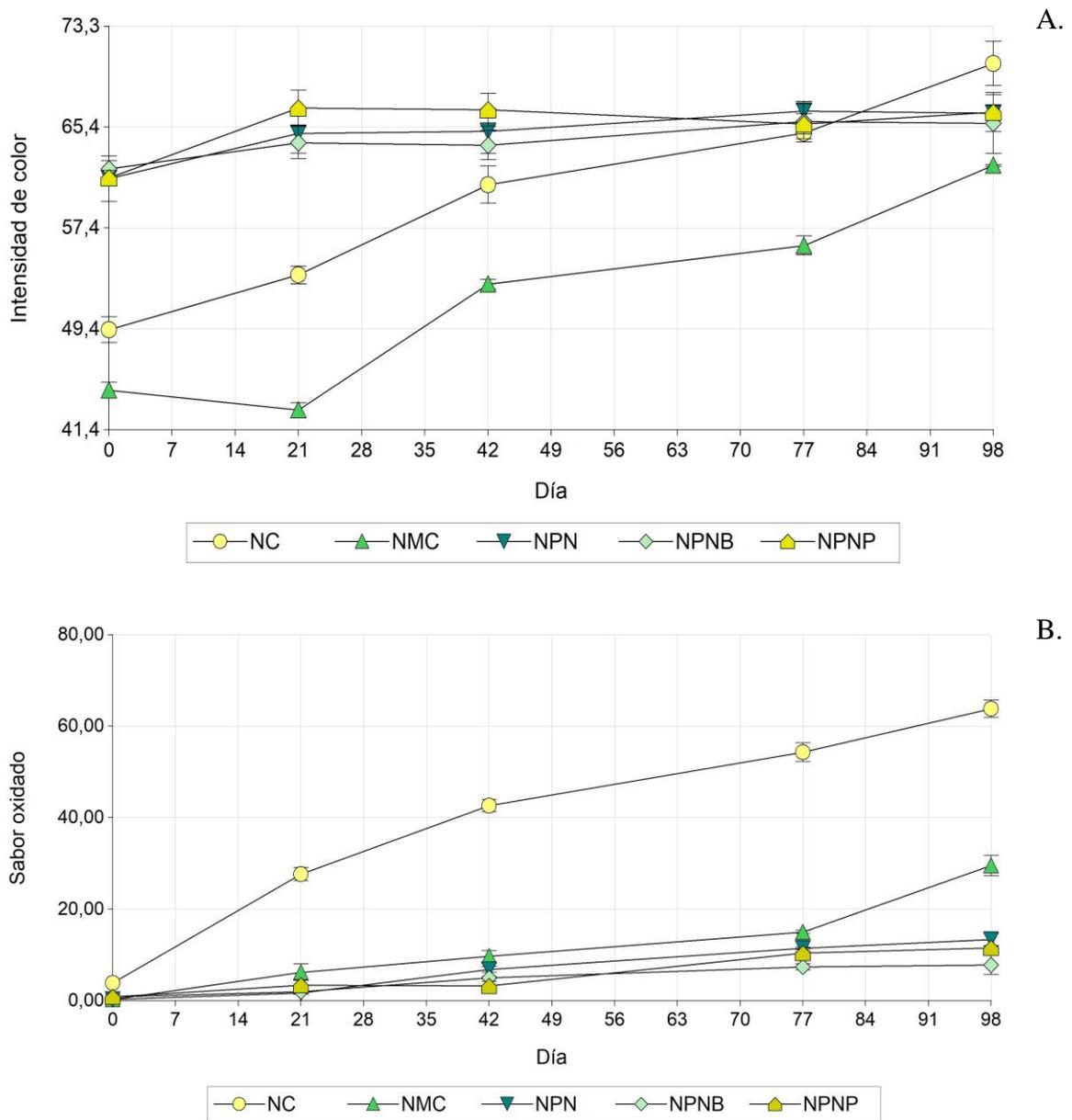
En cuanto al atributo sabor oxidado (**Fig. 4.5.b.**), se observó que la intensidad de este atributo se incrementó para todos los tratamientos durante el almacenaje. En el día 0, los tratamientos comenzaron con una media de 1,22 sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). A partir del día 77 se comenzaron a visualizar diferencias muy marcadas entre los tratamientos donde el valor más bajo para el sabor oxidado lo presentó NPNB (7,40) y el valor más alto NC (54,33). En el último día de almacenamiento, se encontró un incremento muy pronunciado de este atributo por parte del tratamiento control en relación al resto de los tratamientos. NC presentó una intensidad de 63,80 seguida por NMC, NPNP y NPN que presentaron intensidades intermedias (29,53, 11,53, 13,33, respectivamente) y NPNB tuvo la intensidad más baja (7,80). El atributo sabor oxidado está relacionado con el proceso de enranciamiento que ocurre en los lípidos de los distintos alimentos. Estos resultados coinciden con lo detectado en el capítulo II, donde las nueces recubiertas presentaron una menor intensidad de sabor oxidado que la nuez control (Grosso *et al.*,

2017b). Martínez *et al.* (2011) descubrió, en un ensayo de almacenaje de aceite de nuez que, a medida que transcurre el tiempo almacenaje, se incrementa la intensidad de oxidado en el aceite y que este atributo tiene una correlación significativa positiva con IP, DC y TC y negativa con el contenido de tocoferoles. Otros autores también han encontrado una correlación positiva de este atributo con compuestos volátiles indicadores de deterioro oxidativo como el hexanal (Grosso y Resurreccion, 2002). En el presente estudio, además, se pudo comprobar que las muestras que desarrollaron una menor intensidad de este atributo fueron aquellas recubiertas con proteína de nuez (NPN, NPNP y NPNB). Lee y Krochta (2002) encontraron que los tratamientos de maní recubiertos con proteína del suero de la leche desarrollaron una menor intensidad del atributo oxidado a lo largo del almacenamiento en comparación con la muestra control. Esto puede ser atribuido al efecto protector de la cubierta proteica que actúa como barrera contra el intercambio de oxígeno. Adicionalmente, en este estudio el tratamiento que desarrolló una menor intensidad de este atributo fue NPNB, que además del efecto protector de la cubierta comestible de proteína de nuez, mostró el efecto antioxidante ejercido por el BHT.

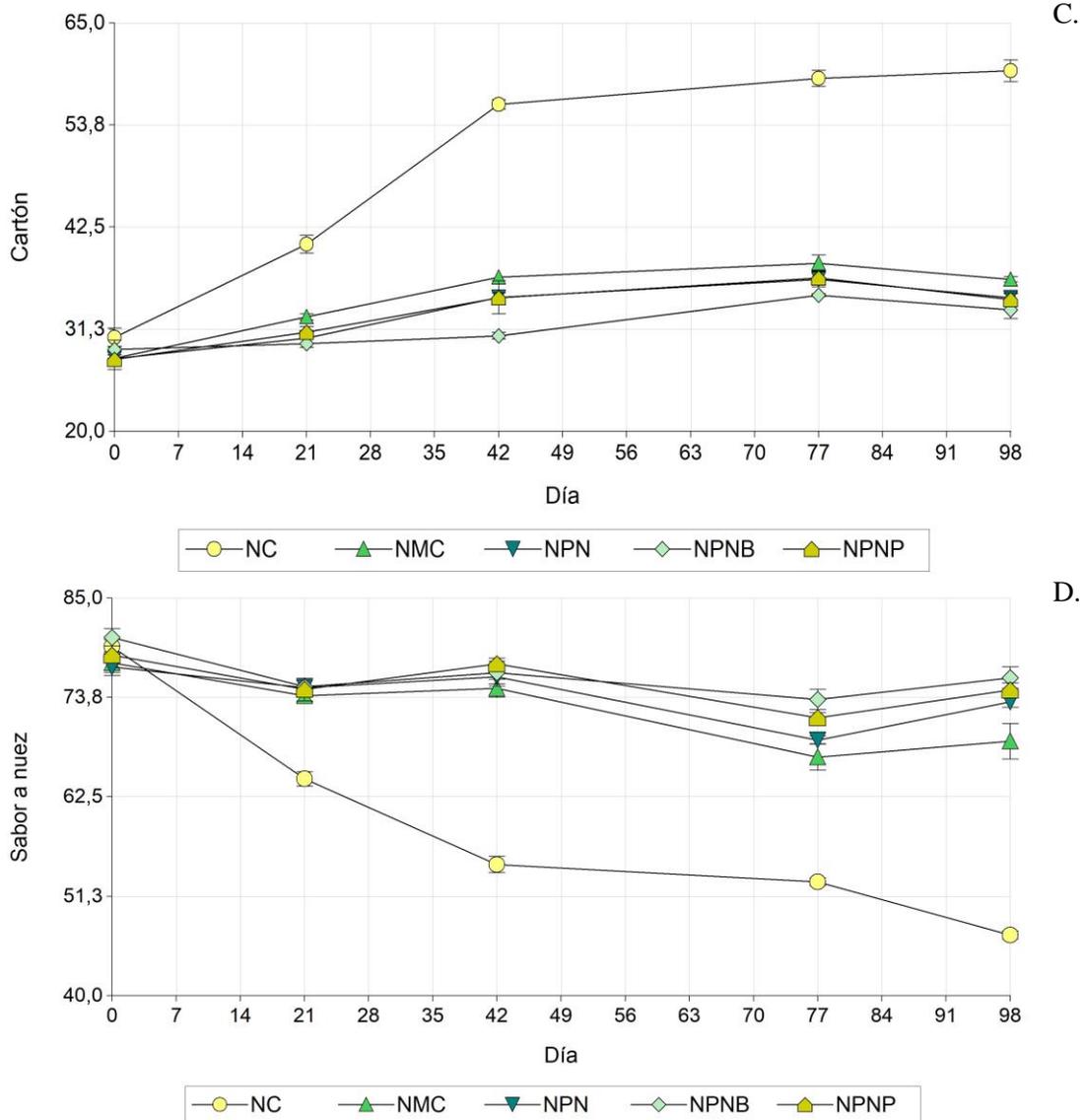
Con respecto al sabor cartón (**Fig. 4.5.c.**), se observó que en el día 0 de almacenamiento, los tratamientos presentaron una intensidad baja para este atributo sin diferencias significativas entre ellos. A lo largo del almacenamiento, se incrementó la intensidad llegando al último día de almacenaje con valores de 59,73 para NC, seguida por NMC (36,73), y finalmente, NPN, NPNP y NPNB (34,73, 34,53 y 33,40, respectivamente), sin diferencias entre estas tres últimas. En trabajos previos se ha encontrado una relación entre los atributos sabor cartón y sabor oxidado con el contenido de compuestos volátiles productos de la oxidación como aldehídos, cetonas, etc. (Nepote *et al.*, 2004; Larrauri *et al.*, 2016). Lee y Krochta, (2002) descubrieron que a mayor temperatura de almacenaje (40 °C, 50 °C y 60 °C) el maní desarrollaba una mayor intensidad en el atributo cartón, en muestras recubiertas con cobertura elaborada a partir de proteína del suero de la vaca. Riveros *et al.*, (2013) encontró que los tratamientos de maní recubiertos con coberturas de CMC, MC y PS tuvieron un menor incremento en la intensidad de este atributo comparada con el tratamiento control con el tiempo de almacenamiento. En este estudio, los tratamientos con la cubierta elaborada a partir de HN fueron los que desarrollaron una

menor intensidad de sabor cartón, demostrando que está cubierta tuvo un mayor efecto que MC en la preservación de las propiedades sensoriales de la nuez.

Para el atributo sabor nuez, los valores medios estimado a partir de la medición de todos los períodos de almacenamiento mostraron que NC presentó la mayor pérdida de intensidad de este atributo (59,73), seguido por NMC (72,44), NPN (74,08) y finalmente por los tratamientos NPNP (75,36) y NPNB (76,33). Estos resultados evidenciaron que durante el almacenamiento se produjo una pérdida de la intensidad del sabor nuez pero que esta pérdida de intensidad de este atributo positivo para la nuez fue más pronunciada en la muestra control (**Fig. 4.5.d.**). En el último día de almacenamiento (día 98), los tratamientos que tuvieron una menor pérdida de intensidad del sabor nuez fueron NPNP (74,60) y NPNB (76,00), seguido por NPN (73,27) y NMC (68,80), y finalmente por NC (46,87). La disminución en la intensidad del atributo sabor nuez se encuentra asociada a la aparición de sabores desagradables, que ocurre debido a la formación de compuestos de la oxidación secundaria de los lípidos, que se expresan en sabores rancios (Jensen y Sørensen, 2001). Diversos trabajos han estudiado el sabor característico de las nueces denominándolo ‘walnut flavour’ (Colarič *et al.*, 2006) o ‘nutty’ (Jensen y Sørensen, 2001; Martínez *et al.*, 2011). En el trabajo conducido por Jensen y Sørensen (2001), se pudo observar una disminución en la intensidad del sabor característico de la nuez a lo largo de 25 semanas de almacenamiento, siendo mayor esta disminución en los tratamientos almacenados a 21 °C (con y sin exposición a la luz) que aquellos a 5 °C (con y sin exposición a la luz). Además, en este estudio se pudo apreciar una asociación muy fuerte entre el incremento del contenido de hexanal (un compuesto volátil indicador de oxidación lipídica), la pérdida del sabor nuez y el incremento en la intensidad de sabor rancio. Esto sugirió que el proceso de oxidación lipídica fue el parámetro que determino el deterioro de la calidad sensorial de la nuez (Jensen y Sørensen, 2001). Los tratamientos NPNP y NPNB fueron los que conservaron de manera más prolongada la intensidad del sabor nuez, lo cual indica que la combinación cobertura de proteína de nuez más la adición de antioxidantes, las que actuaron previniendo el deterioro oxidativo del producto y así, mejorando la conservación de las propiedades de calidad del producto durante el almacenamiento.



**Fig. 4.5.** Valores de intensidad de los atributos sensoriales (A) color, (B) sabor oxidado, (C) sabor cartón y (D) sabor nuez evaluados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C) en nueces recubiertas y sin recubrimiento. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT).



**Fig. 4.5.** Valores de intensidad de los atributos sensoriales (A) color, (B) sabor oxidado, (C) sabor cartón y (D) sabor nuez evaluados durante el almacenamiento (98 días; 40 °C) en nueces recubiertas y sin recubrimiento. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT). Continuación.

### Análisis de regresión

Se realizó un análisis de regresión de los atributos evaluados a lo largo del almacenamiento para conocer el efecto tiempo sobre los mismos. Los resultados obtenidos del análisis se representan en la **Tabla 4.4**. Un valor de  $R^2$  mayor a 0,50 indica que el 50% de la varianza en Y es atribuible a la varianza en X (O'Mahony 1988). Por ese motivo, un

$R^2$  mayor a 0,50 es necesario se consideró que una ecuación pueda ser aceptable para realizar predicciones (Grosso *et al.*, 2008). Los atributos color, sabor nuez, sabor oxidado y sabor cartón presentaron un valor de  $R^2$  superior a 0,50 en todos los tratamientos, con excepción de NPN, NPNP y NPNB para los atributos color y sabor nuez. Esto probablemente se deba a que estos atributos no tuvieron cambios significativos durante el almacenamiento para estas muestras.

El atributo color presentó una pendiente positiva en todos los tratamientos, indicando un incremento con en el tiempo. Las pendientes más pronunciadas se encontraron en NC y NMC indicando que estos tratamientos tuvieron un mayor incremento de intensidad en el tiempo. Estos resultados concuerdan con lo observado en el capítulo II, donde las nueces recubiertas tuvieron menor pendiente con respecto a la muestra control. En ese experimento, NC tuvo un valor de pendiente  $\beta_1$  de 0,0521, mientras que el tratamiento con MC presentó la menor pendiente ( $\beta_1 = 0,0147$ ). Sin embargo, en el presente experimento, se pudo observar que la cubierta elaborada partir de la HN tuvo una mejor conservación de la intensidad de color de la nuez en comparación con la nuez recubierta con MC y que la incorporación de antioxidantes no tuvo un efecto adicional en dicha conservación.

El atributo oxidado también presentó una pendiente positiva para los tratamientos, indicando un incremento a lo largo del almacenaje. Entre los tratamientos, NPNB mostró la pendiente menos pronunciada, seguida por NPN, NPNP y NMC y finalmente NC ( $p < 0,05$ ). Esto indica que el tratamiento NC fue el que presentó el mayor grado de deterioro en el tiempo, mientras que, NPNB el menor. Resultados similares se pueden observar en otros trabajos. Quiroga *et al.* (2013) describieron, en un estudio de almacenamiento de granos de girasol tostados adicionados con aceites esenciales, que los tratamientos que presentaron una pendiente menos pronunciada para este atributo fueron aquellos granos de girasol adicionados con el terpeno sabineno y con BHT ( $\beta_1 = 0,54$  y  $0,62$ , respectivamente). Martínez *et al.*, (2011) también observó una pendiente positiva ( $\beta_1 = 0,002$ ) para el atributo sabor oxidado en un estudio de estabilidad en aceite de nuez (25 °C).

**Tabla 4.4.** Coeficientes de regresión y valores de  $R^2$  ajustados de las intensidades de los atributos para los tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-ceulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante sintético BHT) durante el almacenamiento (98 días; 40 °C).

Muestra	Coef. de regresión <sup>a</sup>	Intensidad de color	Brillo	Oxidado	Cartón	Sabor nuez	Dulce	Salado	Amargo	Acido	Astringente	Crujiente	Dureza
NC	$\beta_0$	49,87	35,64	11,34	34,97	73,77	8,07	4,93	32,33	14,87	46,47	43,17	32,44
	$\beta_1^b$	0,21 a	0,03 a	0,57 d	0,3 b	-0,3 c	-0,03 a	0,002 a	0,08 a	0,07 a	0,04 a	0,01 a	0,02 a
	$R^2$	0,93	0,14	0,93	0,82	0,85	0,58	0,02	0,60	0,79	0,43	0,05	0,27
NMC	$\beta_0$	42,65	27,96	0,00	30,32	77,23	10,29	5,04	28,89	14,13	43,21	44,96	33,88
	$\beta_1^b$	0,19 a	0,01 a	0,26 c	0,09 a	-0,1 b	-0,03 a	0,00 a	0,08 a	0,07 a	0,06 a	0,00 a	0,01 a
	$R^2$	0,89	0,00	0,88	0,66	0,68	0,39	0,07	0,73	0,59	0,64	0,01	0,06
NPN	$\beta_0$	62,61	27,63	0,00	29,20	76,86	10,38	5,00	26,27	15,13	42,30	44,64	34,71
	$\beta_1^b$	0,05 b	-0,02 a	0,14 b	0,08 a	-0,06 a	0,00 a	0,00 a	0,06 a	0,02 a	0,04 a	0,00 a	0,00 a
	$R^2$	0,34	0,02	0,94	0,62	0,44	0,00	0,00	0,53	0,38	0,33	0,02	0,01
NPNP	$\beta_0$	63,85	28,85	0,40	29,45	77,59	9,49	4,91	26,21	15,79	42,89	45,22	33,75
	$\beta_1^b$	0,03 b	-0,08 a	0,12 b	0,07 a	-0,05 a	0,02 a	0,00 a	0,1 a	0,03 a	0,05 a	-0,01 a	0,01 a
	$R^2$	0,22	0,20	0,89	0,67	0,37	0,23	0,00	0,75	0,26	0,33	0,07	0,01
NPNB	$\beta_0$	62,64	35,83	0,97	28,75	78,31	10,43	4,93	26,54	14,06	42,66	45,04	33,68
	$\beta_1^b$	0,04 b	-0,08 a	0,08 a	0,06 a	-0,04 a	0,00 a	0,00 a	0,05 a	0,04 a	0,04 a	-0,01 a	0,01 a
	$R^2$	0,25	0,18	0,75	0,69	0,28	0,01	0,02	0,39	0,33	0,31	0,05	0,02

<sup>a</sup> Ecuación de regresión lineal:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ , donde Y = variable dependiente (atributo) y X = variable independiente (tiempo).

<sup>b</sup> Las mismas letras en cada columna, para cada atributo sensorial, significan que las pendientes de la ecuación de regresión ( $\beta_1$ ) no son significativamente distintas ( $\alpha = 0.05$ ).

En cuanto al atributo sabor a nuez, su intensidad decreció con el tiempo para todos los tratamientos. Esta disminución fue superior en NC, mientras que fue menor en los tratamientos NPN, NPNP y NPNB. Diversos estudios han demostrado la pérdida del sabor característico de algunos frutos secos a medida que avanzaba el almacenaje y simultáneamente se incrementaba el sabor oxidado: maní con coberturas comestibles (Riveros *et al.*, 2013), girasol con aceites esenciales (Quiroga *et al.*, 2013). Esto concuerda con lo descubierto en el capítulo II, donde, la intensidad del sabor nuez disminuyó para todos los tratamientos de nueces recubiertas, pero principalmente para el tratamiento control ( $\beta_1 = -0,1007$ ). Sin embargo, en el capítulo II se observó que la cubierta elaborada a base de metil-celulosa fue la que logró una mejor conservación de este atributo característico, mientras que, en este capítulo la cobertura elaborada a base de proteínas de nuez utilizando la harina HN logró un mejor efecto preservante que la cobertura MC.

Con respecto al atributo sabor cartón, se produjo un incremento en la intensidad de este atributo a lo largo del almacenaje. Sin embargo, el único tratamiento que presentó una pendiente más pronunciada fue el control (NC), mientras que el resto de las muestras no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) dado que no tuvieron un gran incremento. Estos resultados concuerdan con los encontrados en un estudio de almacenaje de semillas de girasol adicionados con aceites esenciales de órgano y poleo y con BHT (Quiroga *et al.*, 2013). En este trabajo se pudo observar que el tratamiento control exhibió una pendiente más pronunciada para este atributo (0,4938), mientras que los tratamientos con poleo, orégano y BHT presentaron una pendiente menos pronunciada sin diferencias significativas entre ellas (0,3255, 0,3360 y 0,3430, respectivamente).

## **Análisis de componentes principales**

El biplot obtenido del análisis de componentes principales es presentado en la **Fig. 4.6**. Las dos primeras componentes explicaron el 85,2% de la variabilidad, siendo la componente principal 1 (CP 1) la que tuvo el mayor porcentaje (64,7%). En este análisis se evaluaron todos los indicadores químicos (IP, CD, CT, CC, IA, S/I, O/L, PUFAs, MUFAs,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol) y atributos sensoriales (intensidades de color, dureza, brillo, sabor nuez, oxidado, cartón, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza)

medidos durante el almacenamiento, para así, poder visualizar la interacción entre las variables y los tratamientos.

En relación al CP 1, en el lado izquierdo del biplot se encontraron aquellas variables (sensoriales y químicas) cuyos valores se incrementaron con el tiempo de almacenamiento y se relacionaron con el deterioro lipídico, como el IP, DC, TC, IA, oxidado, cartón, O/L, S/I, etc. El único tratamiento que se presentó del lado izquierdo del biplot fue NC, lo cual indica que esta muestra fue la que tuvo asociada positivamente con estos indicadores de deterioro. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Martínez *et al.* (2013), donde en un ensayo estabilidad de aceite de nuez con la utilización de antioxidantes naturales (extracto de romero y ácido ascórbico) y sintéticos (TBHQ), almacenados con y sin exposición a la luz, pudo comprobar que el tratamiento control (con y sin exposición a la luz), se posicionó del lado derecho del biplot, junto con los indicadores IP y DC, indicando un mayor grado de oxidación de esta muestra.

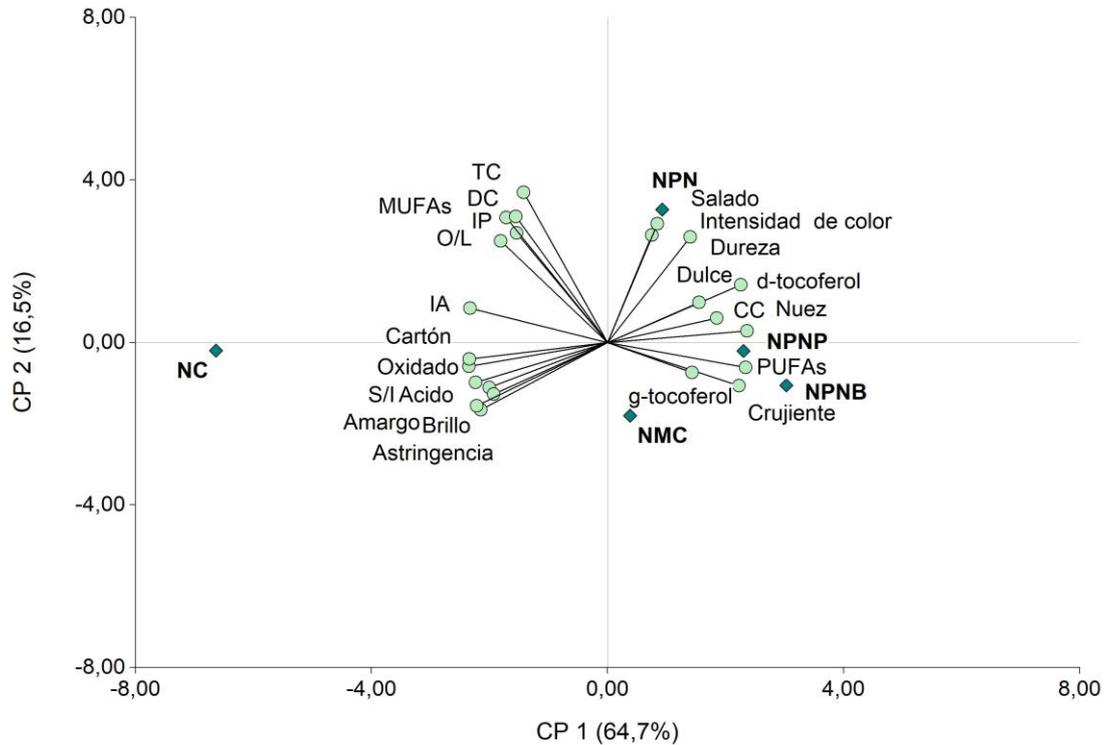
Del lado derecho del biplot se pudieron observar aquellas variables que decrecieron durante el almacenaje a medida que aumentaba el deterioro lipídico como  $\delta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, CC, MUFAs y sabor nuez. Los tratamientos que se encontraron del lado derecho fueron NPNP y NPNB con mayores vectores, y seguidos por NPN y NMC, con menores vectores. Por lo que, NPNP y NPNB mostraron una mayor asociación con estas variables. Una tendencia similar encontró Martín *et al.* (2016) donde observó que el maní envaso en bolsas de alta barrera se posicionó del lado derecho relacionado con variables como  $\delta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, sabor maní tostado y correspondió a la muestra con mayor grado de conservación. Además, indicó que el maní almacenado en bolsas de polipropileno se posicionó del lado izquierdo y se encontró asociado a IP, cartón, DC, TC y S/I variables asociados a un mayor grado de deterioro. En el presente estudio, el atributo color presentó un incremento en su intensidad en el tiempo y se posicionó del lado derecho y en la parte superior del biplot. Esto pudo deberse a que los tratamientos NPN, NPNP y NPNB presentaron una intensidad superior de este atributo en el día 0 de medición debido a la coloración transferida por la cubierta. El sabor dulce fue otro de los atributos que se posicionó del lado derecho del biplot. Esto sucedió debido a que los tratamientos NPNP,

NPNB y NPN tuvieron una intensidad superior de este atributo en comparación con el resto de los tratamientos.

Con respecto a la CP 2, los atributos más significativos para este componente y que, además, sufrieron mayores incrementos en el tiempo de almacenaje fueron IP, DC, TC, MUFAs y O/L. Estos indicadores se encontraron del lado izquierdo y superior del biplot, por lo que estuvieron relacionados además con NC y NPN. La muestra NPN no mostró un gran efecto protector contra estos indicadores de deterioro. Lee *et al.* (2011) observó un efecto similar en muestras de maní recubiertas con películas comestibles preparadas con PS con y sin el agregado de vitamina E almacenadas a 40 °C, 50 °C y 60 °C. En ese estudio, en las muestras se observó que el atributo rancio fue significativo tanto para el CP 1 como para el CP 2. Este atributo presentó asociación con el tratamiento control almacenado a 60 °C al posicionarse del lado izquierdo del biplot (CP 1) y con el tratamiento recubierto con PS con vitamina E al posicionarse en la porción inferior del biplot (CP 2).

Se calcularon los coeficientes de correlación (Pearson) para comprobar las correlaciones entre las variables y se obtuvieron correlaciones altas y significativas ( $p < 0,0001$ ) entre algunas de las mismas. Los coeficientes más altos se encontraron entre las variables O/L y MUFAs (0,97), seguida por sabor oxidado con sabor cartón (0,95), sabor oxidado y con sabor a nuez (-0,95) e IP con DC (0,92). Otros coeficientes altos se encontraron entre atributos sensoriales como sabor oxidado y gusto dulce (0,75) y sabor a nuez con gusto dulce (0,76). Moneta *et al.* (2001) también encontró una correlación entre el atributo gusto dulce y sabor a nuez, en un estudio sensorial conducido para poder caracterizar mediante estos atributos las distintas variedades de nueces. Algunos atributos sensoriales presentaron valores alto de correlación con indicadores químicos, como sabor oxidado con IA (0,86), sabor oxidado con S/I (0,72), sabor cartón con PUFAs (0,63), sabor oxidado con IP (0,61) y sabor a nuez con PUFAs (0,65), entre otros. Martínez *et al.* (2011) también encontró una correlación alta entre el indicador químico IP y sabor oxidado (0,78) en un estudio de almacenamiento ( $25 \pm 1$  °C y 1100 Lux) para conocer la estabilidad oxidativa química y sensorial de aceite de nuez. Otros indicadores químicos correspondientes al presente

estudio que presentaron una alta correlación fueron CC con IA (-0,61), IP con  $\gamma$ -tocoferol (0,72) e IP con  $\delta$ -tocoferol y (0,67).



**Fig. 4.6.** Biplot del análisis de componentes principales que muestra la componente principal 1 (CP 1) y la componente principal 2 (CP 2). Variables: intensidad de color, brillo, oxidado, cartón, sabor nuez, dulce, salado, amargo, ácido, astringencia, crujiente y dureza, IP, DC, TC, CC, IA, MUFAs, PUFAs, O/L, S/I,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. Tratamientos: NC (nuez control), NMC (nuez recubierta con metil-celulosa), NPN (nuez recubierta con cobertura elaborada a partir de concentrado proteico de nuez, PN), NPNP (nuez recubierta con NP con la adición de extracto polifenólico de nuez soluble en acetato de etilo) y NPNB (nuez recubierta con NP con la adición de antioxidante BHT).

## CONCLUSIONES

Mediante la deslipidización y extracción de la fracción de azúcares solubles de la nuez se obtiene una harina con alto contenido proteico, que sirve como material base para la elaboración de una cubierta comestible.

Las cubiertas comestibles elaboradas a partir de harina proteica de nuez aplicadas sobre granos de nuez ejercen una protección contra el deterioro lipídico y mejoran la conservación del producto, con respecto al producto sin cobertura. La cubierta tiene un efecto más marcado sobre la conservación de propiedades sensoriales ya que disminuye la pérdida de intensidad de los atributos característicos y también disminuye el incremento de intensidades de atributos sensoriales negativos. Además, las nueces con cobertura de harina de nuez tienen mejor aceptabilidad por parte de los consumidores que las nueces recubiertas con metil-celulosa. Sin embargo, la cubierta de metil-celulosa demuestra un mayor efecto conservante de los indicadores químicos relacionados con oxidación de lípidos, con respecto a la elaborada con harina de nuez.

Las nueces recubiertas con harina de nuez con el agregado de antioxidantes como BHT (PNB) y naturales como los polifenoles de nuez (PNP) tienen un mejor comportamiento que aquellas sin el agregado de antioxidantes (NPN y NMC) considerando todos los indicadores evaluados durante el almacenamiento de las muestras. Mientras que, el tratamiento con BHT (PNB) demuestra un mejor comportamiento en la preservación de algunos de los indicadores de químicos y sensoriales, el tratamiento con extracto polifenólico se muestra más eficiente para mejorar la protección de los carotenoides a lo largo del almacenamiento. Adicionalmente, la cubierta con el agregado de polifenoles de nuez tiene mejor aceptabilidad de los consumidores que aquella con BHT, lo que indica que el extracto no afecta la percepción de estos.

Por lo tanto, se puede concluir que las cubiertas elaboradas a partir de la harina de nuez, con la adición de antioxidantes (BHT y PAE), prolongan de forma eficiente la conservación de la nuez en tiempo. Cuando se utilizan los polifenoles de nuez como antioxidante, por un lado se evita la contaminación cruzada de alérgenos y la inclusión de

productos sintéticos en el alimento como antioxidante. Logrando así, un alimento con una mayor vida útil elaborado con ingredientes naturales derivados de la misma materia prima.

Considerando las hipótesis planteadas al inicio del trabajo de tesis, se puede concluir que estas se cumplieron en su totalidad:

- ✓ Las cubiertas comestibles comerciales (MC, CMC y PS) prolongan la vida útil de las nueces.
- ✓ Los polifenoles extraídos a partir de la harina de nuez tienen y presentan efecto conservante cuando se aplican sobre productos derivados de nueces.
- ✓ La harina de nuez concentrada en proteínas constituye un ingrediente que sirve para preparar cubiertas comestibles y cuando se aplican sobre granos de nuez las protegen del deterioro oxidativo durante el almacenamiento.
- ✓ La calidad química y sensorial de la nuez se preserva por más tiempo cuando es recubierta con coberturas comestibles con la incorporación de los polifenoles de la nuez (antioxidantes naturales).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah I.B., Tlili N., Martinez-Force E., Rubio A.G.P., Perez-Camino M.C., Albouchi A. and Boukhchina S. 2015. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry* 173: 972-978.
- Aguirre A., Borne, R. and León A.E. 2011. Properties of triticale flour protein based films. *LWT - Food Science and Technology* 44: 1853-1858.
- Amaral J.S., Casal S., Pereira J.A., Seabra R.M. and Oliveira B.P.P. 2003. Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7698-7702.
- Anderson K.J., Teuber S.S., Gobeille A., Cremin P., Waterhouse A.L., Steinberg F.M. and Al A.E.T. 2001. Biochemical and molecular action of nutrients walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and ldl oxidation 1, 2. *The Journal of Nutrition* 131: 2837-2842.
- AOAC. 2010. Official methods of analysis of the AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Aruoma O. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 199-212.
- Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2013. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science & Technology* 48: 2417-2428.
- Chatrabnous N., Yazdani N., Tavallali V. and Vahdati K. 2018. Preserving quality of fresh walnuts using plant extracts. *LWT - Food Science and Technology* 91: 1-7.
- Christopoulos M.V. and Tsantili E. 2012. Storage of fresh walnuts (*Juglans regia* L.) - Low temperature and phenolic compounds. *Postharvest Biology and Technology* 73: 80-88.
- Christopoulos M.V., Tsantili E., Papageorgiou V., Komaitis M. and Rouskas D. 2010. Effects of package atmosphere and temperature on phenolics, total antioxidant capacity and colour in kernels of «Franquette» walnuts during 8-month storage. *Acta Horticulturae* 858: 75-82.
- Christopoulos M.V. and Tsantili E. 2011. Effects of temperature and packaging atmosphere on total antioxidants and colour of walnut (*Juglans regia* L.) kernels during storage. *Scientia Horticulturae* 131: 49-57.
- Colarič M., Štampar F., Hudina M. and Solar A. 2006. Sensory evaluation of different walnut cultivars (*Juglans regia* L.). *Acta Agriculturae Slovenica* 87: 403-413.

- InfoStat. 2016. Infostat/Profesional, versión 2016p. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Frankel E.N. 2005. Lipid oxidation. Ed. Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido, 470 pp.
- Franssen L.R. and Krochta, J.M. 2003. Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. En: Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Roller, S., (ed.). Boca Raton, Florida, Estados Unidos, pp. 250-262.
- Fukuda T., Ito H. and Yoshida T. 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63: 795-801.
- Gayol M.F., Pramparo M.C., Nepote V., Fernandez H. y Grosso N.R. 2013. Optimization of the protein concentration process from residual peanut oil-cake. *Grasas y Aceites* 64: 489-496.
- Gayol M.F., Soliani S., Quiroga P.R., Nepote V. and Grosso N.R. 2009. Effect of prickly pear and algarrobo pod syrup coatings on consumer acceptance and stability of roasted almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2415-2420.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2017. Sensory Quality Preservation of Coated Walnuts. *Journal of Food Science* 82: 185-193.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2018a. Antioxidant activity displayed by phenolic compounds obtained from walnut oil-cake used for walnut oil preservation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95: 1409-1419.
- Grosso A.L., Asensio C.M., Nepote V. and Grosso N.R. 2018b. Quality preservation of walnut kernels using edible coatings. *Grasas y Aceites* 69: 1-9.
- Grosso N.R. and Resurreccion A.V.A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science* 67: 1530-1537.
- Grosso N.R., Resurreccion A.V.A., Walker G.M. and Chinnan M.S. 2008. Sensory profiles and hexanal content of cracker-coated and roasted peanuts stored under different temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation* 32: 1-23.
- Hassan B., Chatha S.A.S., Hussain A.I., Zia K.M. and Akhtar N. 2018. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 109: 1095-1107.
- Huber K.C. and Embuscado M. 2009. Edible films and coatings for food applications. Ed. Springer Media, New York, Estados Unidos, 416 pp.
- IUPAC. 1987. Determination of the p-anisidine value, method number 2.504. En: Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Paquot, C. and Hautfenne, A., (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 210-212.

- Jensen P. and Sørensen G. 2001. Evaluation of quality changes in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5790-5796.
- Kester J.J. and Fennema O. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 40: 47-59.
- Koyuncu M.A., Koyuncu F. and Bakir N. 2003. Selected drying conditions and storage period and quality. *Journal of Food Processing Preservation* 27: 87-99.
- Labuckas D., Maestri D. and Lamarque A. 2014. Effect of different oil extraction methods on proximate composition and protein characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) flour. *LWT - Food Science and Technology* 59: 794-799.
- Larrauri M., Demaría M.G., Ryan L.C., Asensio C.M., Grosso N.R. and Nepote V. 2016. Chemical and sensory quality preservation in coated almonds with the addition of antioxidants. *Journal of Food Science* 81: 208-215.
- Lee J., Vázquez-Araújo L., Adhikari K., Warmund M. and Elmore J. 2011. Volatile compounds in light, medium, and dark black walnut and their influence on the sensory aromatic profile. *Journal of Food Science* 76: 199-204.
- Lee S.Y. and Krochta J.M. 2002. Accelerated shelf life testing of whey-protein-coated peanuts analyzed by static headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2022-2028.
- López-Calleja I.M., de la Cruz S., González I., García T. and Martín R. 2015. Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry* 177: 111-9.
- Maftoonazad N. and Ramaswamy H.S. 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Science and Technology* 38: 617-624.
- Manzocco L., Mastrocola D., Nicoli M.C. and Marangoni V. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science Technology* 11: 340-346.
- Mao X. and Hua Y. 2012. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences* 13: 1561-1581.
- Martín M.P., Nepote V. and Grosso N.R. 2016. Chemical, sensory, and microbiological stability of stored raw peanuts packaged in polypropylene ventilated bags and high barrier plastic bags. *LWT - Food Science and Technology* 68: 174-182.
- Martínez M., Barrionuevo G., Nepote V., Grosso N.R. and Maestri D. 2011. Sensory characterisation and oxidative stability of walnut oil. *International Journal of Food Science & Technology* 46: 1276-1281.

- Martínez M.L., Penci C.P., Ixtaina V., Ribotta P.D. and Maestri D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology* 51: 44-50.
- Mehyar G.F., Al-Ismail K., Han J.H. and Chee G.W. 2012. Characterization of edible coatings consisting of pea starch, whey protein isolate, and carnauba wax and their effects on oil rancidity and sensory properties of walnuts and pine nuts. *Journal of Food Science* 77: 52-59.
- Moneta E., Sinesio F., Guerrero L., Romero A., Lombard J.C. 2001. Sensory evaluation of walnut: an interlaboratory study. *Food Science & Technology International* 7: 37-47.
- Nepote V., Mestrallet M.G. and Grosso N.R. 2004. Natural antioxidant effect from peanut skins in honey-roasted peanuts. *Journal of Food Science* 69: 295-300.
- Noshirvani N., Ghanbarzadeh B., Gardrat C., Rezaei M.R., Hashemi M., Le Coz C., Coma V. 2017. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids* 70: 36-45.
- O'Mahony M., Thieme U. and Goldstein L.R. 1988. The warm-up effect as a means of increasing the discriminability of sensory difference tests. *Journal of Food Science* 53: 1848-1850.
- Perez-Gago M.B., Serra M., Alonso M., Mateos M., del Rio M.A. 2005. Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology* 36: 77-85.
- Quiroga P.R., Asensio C.M. and Nepote V. 2015. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 471-479.
- Quiroga P.R., Grosso N.R. and Nepote V. 2013. Antioxidant effect of poleo and oregano essential oil on roasted sunflower seeds. *Journal of Food Science* 78: 1904-1912.
- Rabadán A., Pardo J.E., Gómez R. and Álvarez-Ortí M. 2018. Evaluation of physical parameters of walnut and walnut products obtained by cold pressing. *LWT - Food Science and Technology* 91: 308-314.
- Riveros C.G., Martín M.P., Aguirre A. and Grosso N.R. 2017. Film preparation with high protein defatted peanut flour: characterisation and potential use as food packaging. *International Journal of Food Science & Technology* 53: 969-975.
- Riveros C.G., Mestrallet M.G., Quiroga P.R., Nepote V. and Grosso N.R. 2013. Preserving sensory attributes of roasted peanuts using edible coatings. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 850-859.
- Roman O., Heyd B., Broyart B., Castillo R. and Maillard M.N. 2013. Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT - Food Science and*

Technology 52: 49–59.

- Shahidi F., Arachchi J.K.V. and Jeon Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10: 37-51.
- Silva M.P., Martinez M.J., Casini C. and Grosso N.R. 2010. Tocopherol content, peroxide value and sensory attributes in roasted peanuts during storage. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 1499-1504.
- Sze-Tao K.W.C. and Sathe S.K. 2000. Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1393-1401.
- Torres M.M., Martínez M.L. and Maestri D.M. 2005. A multivariate study of the relationship between fatty acids and volatile flavor components in olive and walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82: 105-110.
- Vaidya B. and Eun J.B. 2013. Effect of roasting on oxidative and tocopherol stability of walnut oil during storage in the dark. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115: 348-355.
- Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T. and Wang Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry* 113: 160-165.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de la investigación realizada en el presente trabajo de tesis brindan aportes significativos sobre el comportamiento de las nueces bajo diversas condiciones de almacenamiento y el efecto protector ejercido por cubiertas comestibles y antioxidantes sobre los parámetros de calidad físico, químicos, sensoriales y nutricionales de las nueces. Además, este estudio aporta información sobre las combinaciones de cubiertas y antioxidantes, las cuales, se pueden utilizar para preservar, de manera más eficiente, las propiedades de la nuez y prolongan su vida útil. A continuación, se listan las principales conclusiones generales alcanzadas en este estudio:

- ✓ La aplicación de las cubiertas comestibles elaboradas a partir de compuestos comerciales como carboximetil-celulosa, metil-celulosa y proteína de suero de leche, en general, disminuye la aceptabilidad del atributo color por parte de los consumidores, siendo este efecto más marcado cuando se aplica la cubierta de metil-celulosa. Sin embargo, esta cubierta no afecta la aceptabilidad del sabor en las nueces.
- ✓ La aplicación de dichas cubiertas, mejora la preservación de las propiedades físicas, químicas y sensoriales de las nueces durante el almacenamiento y por lo tanto prolonga la vida útil de este producto.
- ✓ La cubierta elaborada con metil-celulosa retarda de forma más eficiente los procesos de deterioro en las nueces, preservando por más tiempo la intensidad del sabor a nuez y disminuyendo el incremento en la intensidad de los atributos oxidado y cartón. Esta cubierta, además, disminuye el incremento de los valores de indicadores químicos de oxidación como IP, DC y TC y de los contenidos de compuestos volátiles como hexanal, nonanal, pentanal, entre otros.

- ✓ La harina de nuez posee compuestos fenólicos que muestran propiedades antioxidantes y que por lo tanto pueden ser utilizados para la conservación de distintos alimentos. De los dos extractos polifenólicos estudiados, el extracto soluble en acetato de etilo (PAE) presenta mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, mayor actividad quelante de hierro, mientras que, el extracto soluble en agua (PH) posee mayor actividad antioxidante en cuanto a los *tests* DPPH y ABTS.
- ✓ Ambos extractos de polifenoles (PH y PAE) son muy efectivos para preservar la calidad química del aceite de nuez, e incluso, para algunos de los indicadores químicos de oxidación de lípidos, es más efectivo que el antioxidante comercial sintético BHT.
- ✓ Mediante los procesos de desengrasado y de eliminación de azúcares solubles se obtiene una harina con alto contenido proteico que tiene buenas propiedades para la elaboración de una cubierta comestible.
- ✓ La cubierta comestible elaborada con la harina de nuez aplicada sobre granos de nueces ejerce una mejor conservación de la calidad sensorial del producto en comparación con la de metil-celulosa preservando de manera más eficiente el sabor a nuez y disminuyendo en mayor proporción el desarrollo de los atributos sensoriales negativos como sabor oxidado y sabor cartón. Además, los granos de nuez recubiertos con la cubierta elaborada con harina proteica de nuez tienen mayor aceptabilidad por parte de los consumidores.
- ✓ El agregado de sustancias antioxidantes como los polifenoles de la nuez y BHT a la cubierta elaborada con harina de nuez aumenta aún más el efecto conservante de las propiedades de calidad de los granos de nuez.
- ✓ La cubierta elaborada con harina de nuez con el agregado de los polifenoles de la nuez tiene una mayor aceptabilidad general y de sabor por parte de los consumidores, lo cual indica que esta opción es una alternativa concreta para

mejorar la conservación de nueces, sin la necesidad de utilizar antioxidantes sintéticos.

En la actualidad, los frutos secos están adquiriendo una importancia creciente a nivel nacional e internacional, es por ello que resulta de suma importancia estudiar su comportamiento. A nivel país, el fruto seco de mayor importancia es la nuez, cuya producción se ha incrementado en la última década y ha posicionado al país dentro de los 10 principales exportadores de este alimento. Sin embargo, el sector nogalero argentino presenta diversas problemáticas: la nuez se comercializa en forma atomizada, en mercados informales y con muy escaso trabajo en empaque y fraccionamiento, donde, únicamente los emprendimientos de mediana y gran escala cuentan con estructura apropiada para almacenar nueces. Como consecuencia de su composición química, la nuez es altamente susceptible a procesos oxidativos que generan rancidez. Estos procesos ocasionan el deterioro de su calidad nutricional y la aparición de sabores indeseables y productos dañinos para la salud humana. Por lo tanto, es de suma importancia mejorar la conservación de la nuez durante su almacenamiento, para lograr mantener un producto de calidad que llegue a los consumidores. Los resultados de este trabajo de tesis hacen un aporte al conocimiento significativo para esta problemática y ofrece una alternativa simple de fácil implementación que permite conservar mejor a este fruto seco utilizando productos naturales obtenidos de la misma nuez: cobertura comestible y polifenoles antioxidantes de nuez.

Las cubiertas comestibles ya sean las comerciales o las elaboradas con harina proteica de nuez constituyen una alternativa concreta que puede utilizar la industria de los agroalimentos como un método suplementario para prolongar la vida útil de las nueces. Además, hay que resaltar que estos compuestos naturales son biodegradables y amigables con el medio ambiente, lo cual va en consonancia con la tendencia mundial de disminuir el uso de materiales envases sintéticos que son materiales altamente contaminantes.

Por otra parte, trabajar con materiales de un mismo origen, como la cobertura comestible de harina proteica de nuez y polifenoles de nueces, para incluirlos como ingredientes/aditivos en un mismo producto, en este caso el grano de nuez, es visto con muy buenos ojos por la industria de los alimentos, ya que de esta manera disminuye el

riesgo de introducir materiales que pueden ser alérgenos y generar serios problemas de contaminación cruzada entre líneas de producción y productos fabricados, considerando que la seguridad alimentarias es un ítem de suma importancia en la manufactura de alimentos.

Con respecto a las futuras líneas de investigación, se plantea profundizar la exploración de potenciales usos de los desechos producidos en el prensado de la nuez durante la manufactura del aceite. La torta de nuez/almendra, biomaterial de bajo o escaso valor comercial, es rica en proteínas, carbohidratos y fibras y tiene escasos usos y se destina principalmente para la nutrición animal. Por lo tanto, la elaboración de coberturas comestibles y obtención de antioxidantes a partir de las tortas le agrega valor al producto y puede promover el desarrollo de la industria de alimentos.

Queda pendiente estudiar con mayor profundidad la composición química de los polifenoles, separar fracciones con mayor poder antioxidante y evaluar sus propiedades en diferentes matrices alimenticias. En este mismo sentido, también está pendiente probar las coberturas comestibles de nueces en distintas matrices alimenticias.

Con respecto a las cubiertas comestibles elaboradas con harina proteica de nuez, se pretende continuar con experimentos para probar distintas concentraciones de sus componentes para lograr las combinaciones que otorguen mejores propiedades conservantes. Además, se deberán estudiar las propiedades mecánicas (fuerza de tensión y elasticidad) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno) de cubiertas de proteínas de nuez elaboradas con y sin la adición de polifenoles y, además, evaluar distintas metodologías para la aplicación de dichas cubiertas a base de proteína de nuez, a fin de que se logre un recubrimiento uniforme sobre la matriz alimenticia a conservar.

Por otro lado, se plantea estudiar la elaboración de cubiertas comestibles a partir de otros frutos secos. Por ejemplo, las almendras también poseen un alto contenido lipídico con alta proporción de ácidos grasos insaturados y, como consecuencia, poseen problemas en su conservación debido a su deterioro lipídico. Para solucionar esta problemática, se plantea estudiar procesos para la elaboración de cubiertas comestibles a partir de la harina de almendra y el estudio de sus propiedades. Además, se plantea desarrollar un

procedimiento para la extracción de polifenoles de la torta de almendra para su utilización como antioxidantes con la finalidad de ser incluidos en dichas cubiertas comestibles. En pocas palabras, se pretende realizar un estudio similar al realizado en las nueces sobre un material, como las almendras, con composición, propiedades y problemáticas similares a las nueces, y que a su vez tienen un volumen significativo de producción y son considerados como un agroalimento de importancia a nivel nacional.