

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES



**OBTENCIÓN DE HARINA DE NUEZ:
ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES Y
FUNCIONALES**

Mg. Diana O. Labuckas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

**OBTENCIÓN DE HARINA DE NUEZ:
ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES Y
FUNCIONALES**

Mg. Diana O. Labuckas

Directora: Dra. Alicia L. Lamarque

Asesores: Dr. Damián M. Maestri

Dr. Pablo D. Ribotta

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales

ACTA DE EXAMENES

Libro: 00001 Acta: 02028 Hoja 01/01
LLAMADO: 1 23/08/2013

CATEDRA - MESA:

DI002 TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NUMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGRESO	COND.	NOTA	FIRMA
16993093	LABUCKAS, Diana Ondina	DNI: 16993093	2007	T	<u>APROBADO</u>	

PRAMPARO, María del Carmen - CRIVELLO, Mónica - NEPOTE, Valeria - CISMONTI DUARTE, Martín - PENCI, María C

Observaciones:

Córdoba, 23/08/2013.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: _____

1
Inscriptos Ausentes Examinados Reprobados Aprobados
02/08/2013 17:36:46 (0-3) (4-10)

Libro/Acta: 0000102028 Hoja: 01/01

A Uds.: Hijas, Hijo, Padres y Directora:

Tati

An

Emi

Mami

Papi

Alicia

les dedico mi trabajo.

A mi FAMILIA

La de Sangre

La del Corazón

La de Amistad

La de Docencia

La de Investigación

De la Vida

**Gracias por su
Invaluable,
Inconmensurable
e
Incondicional
Apoyo.**

!!!Síí, lo logré por Uds!!!

RESUMEN

En el presente trabajo se informa respecto a la obtención de harina a partir de semillas de nuez (*Juglans regia* L. var. Franquette), mediante la extracción del aceite. A tal fin se utilizaron diversos procesos, que involucraron disolvente, prensado (hidráulico o a tornillo) o una combinación de ellos. Se encontró que el tipo de procesado ejerció efecto en el producto. La harina de nuez seleccionada, de acuerdo al mejor proceso de obtención de la misma, resultó un alimento proteico, con bajo contenido en sodio, con ácidos grasos esenciales, reducido en calorías, y con propiedades antioxidantes. Sus proteínas presentaron buena digestibilidad y con un valor biológico comparable al de fuentes vegetales y animales. Las propiedades funcionales más destacadas correspondieron a la capacidad de absorción de agua y aceite, que resultaron comparables a las harinas de soja y trigo analizadas como referencia. Almacenada bajo condiciones de góndola, pero protegida de la luz, la harina de nuez parcialmente deslipidizada fue estable por ocho meses. El producto obtenido en el presente trabajo es apto para ser incorporado en la formulación de alimentos.

ABSTRACT

In the present work walnut flour was obtained by extracting the oil from seeds of *Juglans regia* var. Franquette. For this purpose various processes, involving solvent and press (hydraulic or screw) or a combination of them, were used. It was found that the type of processing have effect on the product obtained. The selected walnut flour, according to the better processing, resulted in a protein product with low sodium content, with essential fatty acids, reduced calorie, and antioxidant properties. The proteins showed good digestibility and biological value comparable to that of some plant and animal sources. Most important functional properties corresponded to water and oil absorption capacity, which were comparable to those of soybean and wheat flours analyzed as reference. Stored under shelf conditions, but protected from light, partially defatted walnut flour was stable for eight months. The product obtained in the present work is suitable to be incorporated in the formulation of food.

RESUMO

No presente trabalho obteve-se farinha a partir de sementes de noqueira (*Juglans regia* L. var. Franquette), mediante a extração do óleo. Para tal fim foram utilizados diversos processos envolvendo solvente, prensado (hidráulico ou a parafuso) ou uma combinação entre eles. Observou-se que o tipo de processo exerceu efeito sobre o produto. A farinha de noqueira selecionada, de acordo com o melhor processo de obtenção da mesma, resultou em um alimento proteico, com uma baixa concentração de sódio, com ácidos graxos essenciais, reduzido em calorias e com propriedades antioxidantes. Suas proteínas apresentaram boa digestibilidade e um valor biológico comparável ao de fontes vegetais e animais. As propriedades funcionais mais destacadas corresponderam à capacidade de absorção de água e óleo, que foram semelhantes às farinhas de soja e trigo analisadas como referência. Armazenada em um armário, mas protegida de luz, a farinha de noqueira parcialmente deslipidizada foi estável por oito meses. O produto obtido no presente trabalho é apto para ser incorporado em uma formulação alimentícia.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE IMÁGENES	XV
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XVI
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Aspecto nutricional</i>	3
<i>Aspecto funcional</i>	4
<i>Estabilida oxidativa</i>	5
<i>Utilización de derivados vegetales</i>	5
CAPÍTULO I: OBTENCIÓN DE HARINA DE NUEZ. ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES	7
<i>I.1. INTRODUCCIÓN</i>	7
I.1.1. Objetivos específicos.....	8
SECCIÓN A: OBTENCIÓN DE HARINAS DE NUEZ (Objetivos 1-3).....	9
<i>I.A.1. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	9
I.A.1.1. Materiales	9
I.A.1.2. Métodos	9
I.A.1.2.1. Obtención de harinas de nuez.....	9
I.A.1.2.2. Composición proximal de las harinas.....	12
I.A.1.2.3. Color.....	12
I.A.1.2.4. Fracción proteica	12
I.A.1.2.5. Análisis estadístico.....	14
<i>I.A.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	15
I.A.2.1. Efecto del método de obtención en la composición proximal y color de las harinas.....	15
I.A.2.2. Efecto del método de obtención de las harinas en la fracción proteica.....	18
I.A.2.3. Selección de una harina de nuez	23
SECCIÓN B: ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES DE LA HARINA DE NUEZ SELECCIONADA (Objetivo 4)	25
<i>I.B.1. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	25
I.B.1.1 Materiales	25
I.B.1.2. Métodos	25
I.B.1.2.1. Composición proximal y valor nutritivo.....	25
I.B.1.2.2. Fracción proteica	26
I.B.1.2.3. Fracción lipídica	28

I.B.1.2.4. Fracción de cenizas.....	29
I.B.1.2.5. Análisis estadístico	29
I.B.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
I.B.2.1. Composición proximal y valor nutritivo	30
I.B.2.2. Fracción proteica	31
I.B.2.3. Fracción lipídica	37
I.B.2.4. Fracción de cenizas	38
I.2. CONCLUSIÓN	40

CAPÍTULO II: PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS HARINAS DE NUEZ PARCIAL Y TOTALMENTE DESLIPIDIZADAS..... 41

II.1. INTRODUCCIÓN	41
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS	43
II.2.1.- Materiales	43
II.2.2.- Métodos	43
II.2.2.1.- Solubilidad (<i>S</i>).....	43
II.2.2.2.- Capacidad de absorción de agua (CAAg).....	44
II.2.2.3.- Capacidad de absorción de aceite (CAA).....	44
II.2.2.4.- Capacidad Emulsionante (CE): Actividad y Estabilidad Emulsionante (AE y EE)	45
II.2.2.5.- Capacidad de Gelificación (CG).....	46
II.2.2.6.- Análisis estadístico	46
II.3.-RESULTADOS	47
II.3.1.- Solubilidad.....	47
II.3.2.- Capacidad de absorción de agua (CAAg)	51
II.3.3.- Capacidad de absorción de aceite (CAA)	56
II.3.4.- Capacidad emulsionante (CE): Actividad y estabilidad emulsionante (AE y EE).....	58
II.3.5.-Capacidad de Gelificación (CG).....	64
II.4. CONCLUSIÓN	70

CAPÍTULO III: EFECTO DE LA PRESENCIA DE TEGUMENTO EN LA FRACCIÓN PROTEICA DE HARINA DE NUEZ. COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD INHIBITORIA DE RADICALES LIBRES DE EXTRACTOS FENÓLICOS..... 71

III.1. INTRODUCCIÓN	71
III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS (Objetivos específicos 1 y 2)	73
III.2.1. Obtención de las muestras	73
III.2.2. Proteínas solubles en función del disolvente	73
III.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	73
III.2.4. Extractos fenólicos.....	74
III.2.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales	74
III.2.6. Capacidad inhibitoria de radicales libres	75
III.2.7 Análisis estadístico	75
III.3.- MATERIALES Y MÉTODOS (Objetivo específico 3)	76
III.3.1. Extracto fenólico a partir de harina.....	76
III.3.2. Fraccionamiento secuencial de compuestos fenólicos	76
III.3.3. Cuantificación de FT y CI ₅₀	76
III.3.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS	76
III.3.5. Parámetros moleculares	77

III.3.6. Análisis estadístico	78
<i>III.4. RESULTADOS</i>	79
III.4.1. Efecto del tegumento en la fracción proteica	79
III.4.2. Proteínas solubles en función del disolvente	79
III.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	80
III.4.4. Contenido en fenoles totales (FT) y capacidad inhibitoria 50 (CI ₅₀) de radicales libres.....	82
III.4.5. Extracto fenólico de harina procedente de la prensa a tornillo. FT y CI ₅₀	83
III.4.6. Eluatos fenólicos: FT y CI ₅₀	84
III.4.7. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS	85
<i>III.5. CONCLUSIÓN</i>	91
CAPÍTULO IV: ESTABILIDAD DE LA HARINA DE NUEZ EN DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	92
<i>IV.1. INTRODUCCIÓN</i>	92
<i>IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	93
IV.2.1. Preparación de la harina	93
IV.2.2. Condiciones de almacenamiento y muestreos	93
IV.2.3. Fracción proteica	93
IV.2.4. Fracción lipídica	95
IV.2.5. Análisis estadístico	96
<i>IV.3. RESULTADOS</i>	97
IV.3.1. Fracción proteica	97
IV.3.2. Fracción lipídica	104
<i>IV.4. CONCLUSIÓN</i>	109
CONCLUSIONES GENERALES	110
BIBLIOGRAFÍA	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Composición proximal de la semilla de nuez y de las harinas obtenidas por distintos tratamientos de extracción del aceite, expresada como g/100 g sólido seco.	16
Tabla I.2: Parámetros de color de las harinas obtenidas por distintos tratamientos de extracción del aceite y diferencia total de color entre cada muestra y la harina Control (ΔE).	18
Tabla I.3: Solubilidad proteica de las harinas en <i>buffer</i> fosfato pH 8,0; expresada como mg proteína soluble/g sólido seco.	19
Tabla I.4: Composición proximal de las harinas de nuez (HN y HNDeslip), trigo (HT) y soja (HSoy), expresada en g/100 g de sólido seco.	30
Tabla I.5.: Aporte nutricional de las harinas con respecto al valor diario recomendado.	31
Tabla I.6: Fracciones proteicas de las harinas de nuez deslipidizadas.	32
Tabla I.7: Composición de aminoácidos en la harina de nuez deslipidizada (g/100g de proteína total)	33
Tabla I.8: Aminoácidos esenciales (AAE) en las harinas de nuez, HT y HSoy, expresados como g/100g proteína total.	34
Tabla I.9.: Digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de nuez (HN y HNDeslip), de trigo (HT) y de soja (HSoy), expresada como porcentaje de digestibilidad (% D)	35
Tabla I.10: Composición y tipos de ácidos grasos del aceite en las harinas de nuez y en HSoy.	38
Tabla I.11: Minerales en harinas de nuez, expresados en mg/100g de sólido seco, y su aporte a las necesidades diarias.	39
Tabla II.1: Coeficientes de correlación entre solubilidad proteica y actividad emulsionante (SP-AE); solubilidad y estabilidad emulsionante (SP-EE) y actividad y estabilidad emulsionante (AE-EE)	61
Tabla II.2: Capacidad de gelificación en función del pH	66
Tabla II.3: Capacidad de gelificación a pH “natural”	67
Tabla II.4: Capacidad de gelificación en función de la fuerza iónica.	69
Tabla III.1: Solubilidad proteica (mg PS/g PT) en diferentes sistemas disolventes de las harinas de nuez con (HNCT) y sin tegumento (HNST).	80
Tabla III.2: Contenido de fenoles totales (FT) y concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) de extractos obtenidos de harina y de tegumento.	83
Tabla III.3: Sistema disolvente utilizado, volumen eluido (ml), rendimiento (% p/p) de los eluatos obtenidos a partir del EEpt y contenido de fenoles totales (FT) y concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) del EEpt, eluatos, BHT y ácido ascórbico.	84
Tabla III.4: Compuestos identificados y cuantificados por HPLC-ESI-MS/MS del extracto EtOH:Agua (EEpt) y del eluato 8:2.	87
Tabla III.5: Parámetros moleculares de los compuestos fenólicos identificados por HPLC-ESI-MS/MS	88
Tabla IV.1: Efectos del tiempo de almacenamiento y el tipo de envase sobre la actividad proteolítica endógena de la harina de nuez, expresada como mg/g proteína.	97
Tabla IV.2: Composición en ácidos grasos (%) del aceite extraído de la harina de nuez analizada en función del tiempo de almacenamiento.	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Electroferograma de proteínas solubles en <i>buffer</i> fosfato pH 8,0 de las harinas de nuez procedentes de los diferentes tratamientos.....	20
Figura I.2: Electroferograma de la fracción de albúminas.....	21
Figura I.3: Electroferograma de la fracción de globulinas.....	22
Figura I.4: Electroferograma de la fracción de glutelinas.....	23
Figura II.1: Proteínas solubles (PS) en función del pH, expresadas como a) g de PS/100 g de harina y b) g de PS/100 g de proteína total.....	48
Figura II.2: Proteínas solubles (PS) a pH “natural”, expresadas como g de PS/100 g de proteína total.....	49
Figura II.3: Proteínas solubles (PS) en función de la fuerza iónica (M), expresadas como: a) g de PS/100 g de harina y b) g de PS/100 g de proteína total.....	51
Figura II.4: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función del pH.....	53
Figura II.5: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función del pH, expresada como ml/g de proteína total.....	53
Figura II.6: Capacidad de absorción de agua (CAAg) a pH “natural”, expresada como: a) ml de agua/g de harina y b) ml de agua/g de proteína total.....	54
Figura II.7: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función de la fuerza iónica del medio (M) expresado como a) ml de agua/g harina y b) ml de agua/g de proteína total.....	56
Figura II.8: Capacidad de absorción de aceite (CAA) de las harinas de nuez, trigo y soja expresada en: a) g de aceite/g de harina y b) g de aceite/g de proteína total.....	57
Figura II.9: Capacidad emulsionante de las harinas en función del pH, a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE).....	61
Figura II.10: Capacidad emulsionante de las harinas a pH “natural” en función de la concentración a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE).....	62
Figura II.11: Capacidad emulsionante de las harinas en función de la fuerza iónica, a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE).....	64
Figura III.1: Electroferograma de las proteínas de harina de nuez con y sin tegumento (HNCT y HNST, respectivamente), extraídas con diferentes disolventes.....	81
Figura III.2: Estructuras moleculares tentativas, en 2D, de los compuestos identificados por HPLC-ESI-MS/MS.....	89
Figura III.3: Porcentaje de cada microespecie de los ácidos gálico y elágico a pH 3; 7; 10; 13.....	90
Figura IV.1: Efecto del envase y tiempo (t) de almacenamiento sobre el espectro UV de la proteína soluble. a) HNA y b) HNP.....	99

Figura IV.2: Electroferogramas (PAGE-Nativa) de la harina de nuez almacenada 8 meses en dos tipos de envase.	101
Figura IV.3: Electroferogramas (SDS-PAGE) de la harina de nuez almacenada (8 meses) en dos tipos de envase.	101
Figura IV.4: Electroferogramas (SDS-PAGE con 2-ME) de la harina de nuez almacenada (8 meses) en dos tipos de envase.	102
Figura IV.5: Efecto del envase y el tiempo de almacenamiento sobre la solubilidad de la harina de nuez (% de la proteína total) envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA). Valores medios de tres determinaciones independientes.	103
Figura IV.6: Efecto del tiempo de almacenamiento y envase sobre la capacidad de absorción de agua de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).	104
Figura IV.7: Cambios en el Índice de Doble Enlace del aceite extraído de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).	106
Figura IV.8: Acumulación de peróxidos (a), (b) Dienos conjugados K232 y (c) Trienos conjugados K270, del aceite extraído de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).	108

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen I.1: Aspecto de las harinas obtenidas por los diferentes tratamientos.....	17
Imagen II.1: Microimágenes (40x) correspondientes a suspensiones (1% p/v, pH 8) de HN sin (a) y con (b) colorante liposoluble (Sudan III).....	49

LISTADO DE ABREVIATURAS

- a***: Cromaticidad
- A**: Absorbancia
- AA**: Aminoácidos
- AAE**: Aminoácido esencial
- AAEL**: Aminoácido esencial limitante
- AAT**: Aminoácidos Totales
- AE**: Actividad Emulsionante
- b***: Cromaticidad
- BHT**: Butilhidroxitolueno
- °C**: Grado centígrado
- CAA**: Capacidad de absorción de aceite
- CAA**: Código Alimentario Argentino
- CAAg**: Capacidad de absorción de agua
- CAAg_N**: Capacidad de absorción de agua en función del pH “natural”
- CE**: Capacidad Emulsionante
- CG**: Capacidad de Gelificación
- CI₅₀**: Concentración inhibitoria 50
- cm**: Centímetro
- cm²**: Centímetro cuadrado
- col.**: Colaboradores
- % D**: Porcentaje de digestibilidad
- DAA**: Distribución de Aminoácidos
- DAD**: Detector de arreglo de diodo
- DBI**: Índice de doble enlace
- DC**: Dienos conjugados
- DE**: Diferencia total del color
- EDTA**: Etilendiaminotetraacetato de sodio
- EE**: Estabilidad Emulsionante
- EEpt**: Extracto etanólico de la harina procedente de la prensa a tornillo
- FAO**: Organización de las Naciones Unidas por la Agricultura y la Alimentación
- FT**: Fenoles totales

g: Gravedad, fuerza centrífuga

g: Gramo

GC: Cromatografía gaseosa

HN: Harina de nuez seleccionada, obtenida a partir de la prensa a tornillo a 50°C (Pt 50°C)

HNA: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico con cubierta de aluminio

HNCT: Harina de nuez obtenida a partir de la semilla con tegumento

HNDeslip: Harina de nuez deslipidizada obtenida a partir de la prensa a tornillo a 50°C (Pt 50°) sometida a extracción con *n*-hexano en equipo Soxhlet (12 horas)

HNP: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico

HNST: Harina de nuez obtenida a partir de la semilla sin tegumento

h: Hora

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

HSoy: Harina comercial de soja entera

HT: Harina comercial de trigo

IAAE: Índice de Aminoácido esencial: cociente entre la suma de los AAE de la proteína en la muestra analizada y el total de AAE en la de referencia

Insat: Ácidos grasos insaturados

IP: Índice de peróxido

IY: Índice de Yodo

kDa: Kilodalton

kg: Kilogramo

L*: Luminosidad

L: Ácido Linoleico

Ln: Ácido Linolénico

M: Molaridad

2-ME : 2-mercaptoetanol

mg: Miligramo

MI: Ácidos grasos monoinsaturados

ml: Mililitro

mm: Milímetro

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

mV: Milivoltio

Na₂B₄O₇: Borato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

ND: Necesidades diarias

nm: Nanometro

OMS: Organización Mundial de la Salud

p/v: Peso/volumen

P: Pasiva

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

pH: Potencial de hidrógeno

Ph: Prensa hidráulica

Ph+P: Harina obtenida por prensa hidráulica y post extracción pasiva con disolvente a 25°C

Ph+S: Harina obtenida por prensa hidráulica y post extracción con disolvente a ebullición mediante Soxhlet.

pI: punto isoeléctrico

PM: Patrones de masas moleculares

prot : Proteína

PS: Proteínas solubles

PSh: Proteína soluble hidrolizada

Pt: Prensa a tornillo

Pt 25°: Harina obtenida por prensa a tornillo a 25°C

Pt 50°: Harina obtenida por prensa a tornillo a 50°C

Pt 70°: Harina obtenida por prensa a tornillo a 70°C

PT: Proteína total

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

rpm: Revoluciones por minuto

S: Solubilidad

S: Soxhlet

Sat: Ácidos grasos saturados

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio

SFA: Ácidos grasos saturados

SP: Solubilidad proteica

TC: Trienos conjugados

tR: Tiempo de retención

v: Volumen

var.: Variedad

VDR: Valores diarios de referencia (para una dieta basada en 2000 kcal)

VE_n: Valor energético

INTRODUCCIÓN GENERAL

El nogal, es un árbol de importancia económica; en la actualidad, se lo cultiva para la comercialización de sus frutos, hojas y madera. Su origen milenario se sitúa en el Asia Central, en la región geográfica comprendida entre los Cárpatos y Afganistán, sur de Rusia y norte de India (Fernández-López y col., 2000; Haldimann y col., 2000). Desde el punto de vista botánico, el nogal, pertenece a la familia *Juglandaceae* y al género *Juglans*. Las especies de este género se hallan distribuidas en el mundo, principalmente en China, EEUU, Turquía, Francia y España. Entre las especies cultivadas, la más difundida es *Juglans regia*, y en el mercado, se pueden encontrar las variedades francesas (Fernor, Franquette, Fernette, Ronde, etc), americanas o californianas (Chandler, Hartley, Serr, Vin, etc) y españolas (Baldo II, Carcagente, Cerda, Escriva y Villena).

El fruto de nogal es una drupa, cuyo interior contiene a la semilla, la que presenta dos gruesos cotiledones oleaginosos comestibles. El Código Alimentario Argentino (CAA), en el Cap. XI, define a la nuez como fruto seco (Art. 879) y especifica (Art. 899) que “con el nombre de Nueces, se entienden los endocarpios lignificados de los frutos maduros, sanos, secos de los nogales (*Juglans regia* L, etc)” y las clasifica comercialmente en nueces con y sin cáscara, es decir con y sin el endocarpio lignificado, respectivamente.

Los principales países productores de nueces de esta especie son China, EEUU e Irán, que en conjunto aportan más del 50 % del total (Doreste, www.alimentosargentinos.com; Errecart, NL 15). En tanto que entre los principales exportadores de nueces con cáscara se encuentran EEUU y Francia y de nueces sin cáscara EEUU (37 % del mercado), China, México y República de Moldova, con el 10 % de participación cada uno.

En el hemisferio sur, Chile y Argentina poseen pequeñas plantaciones y son los únicos productores de la región. La producción argentina de nuez con cáscara alcanza aproximadamente las 10.000 toneladas, siendo las principales provincias productoras Catamarca (47%), La Rioja (24%), Mendoza (14%), San Juan (8%) y Río Negro (7%). El sector se ha desarrollado bajo diversas metodologías, generando un producto de calidad variable, que abastece parcialmente la demanda del mercado interno (Doreste, www.alimentosargentinos.com; Errecart, NL 15). Las provincias beneficiadas por la implementación de leyes de diferimiento impositivo han ampliado las áreas de plantación, y se encuentran en proceso de mejorar la tecnología del cultivo y reemplazar las variedades

tradicionales por otras de alto rendimiento y mayor calidad (entre las californianas: Chandler, Howard, Cisco y Tulare; y entre las francesas: Fernor y Fernette). Se estima que la producción nacional alcanzará, en los próximos años, las 48.000 toneladas.

Aunque Argentina contribuya solo con el 0,6% de la producción mundial y su participación en el mercado externo sea ínfima, en la economía interna, la nogalicultura representa una actividad de importancia, debido principalmente al desarrollo de economías regionales. Según informes del Gobierno de la provincia de La Rioja, se trata de un sector que en el año 2010 tuvo un valor de producción de \$ 25,4 millones (Errecart, NL 15).

Mediante la difusión de los beneficios para la salud a partir de su consumo, y su posicionamiento como *snack* natural, sano y sin colesterol, la demanda mundial se encuentra en crecimiento.

Una de las acciones tendientes a agregar valor a la producción de semillas, dentro de la cadena alimentaria, es la extracción del aceite (Vázquez y Polenta, 2012), para lo cual existen diferentes modalidades. Las tradicionales implican tanto la utilización de disolvente como el prensado. La extracción con disolvente exige instalaciones costosas y una ingeniería depurada, sin embargo, el gran desarrollo que ha alcanzado esta tecnología se debe a la importancia alcanzada por la soja. En cuanto al prensado, y a fin de obtener buenos rendimientos, se deben aplicar grandes presiones (que pueden llegar hasta los 2500 kg por cm²), lo que puede generar calor, y provocar efectos indeseables y/o favorables tanto en el aceite como en el residuo de extracción, como por ejemplo, desnaturalización proteica, alteración de algunos componentes, oscurecimiento del aceite, inactivación de enzimas, generación de compuestos tóxicos, aumento o disminución de la digestibilidad proteica, etc. (Primo Yúfera, 1979; Buera y col., 1983; Badui Dergal y col., 2003; Mendez y col., 2010).

Al momento no se encuentran antecedentes en relación a la obtención de harina proteica de nuez a partir de procesos de extracción del aceite. El Código Alimentario Argentino (Cap XIX) contempla la preparación de harinas proteicas de origen vegetal pero solo se establecen valores para harinas de soja y chíá. En la obtención de harina de soja, por ejemplo, los procesos de extrusión y prensa, bien controlados (temperaturas elevadas por un periodo corto de tiempo), son los que pueden generar los materiales de mejor calidad (más digestibilidad), con menor daño de la proteína y mayor contenido de aminoácidos esenciales, fundamentalmente lisina (Gallardo, 2005). El proceso de obtención de las harinas juega un

papel importante en la calidad química y organoléptica, como así también en las propiedades funcionales y nutricionales (Buera y col., 1983; Badui Dergal y col., 2003).

Aspecto nutricional

La nuez tiene un alto contenido de lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Thomas y Schumann, 1992). Es un producto apreciado a nivel mundial por su composición química, presentando altas concentraciones de ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales (Fukuda y col., 2003; Parra, 2008; Gallo, 2008; Pereira y col., 2008); y se compara favorablemente con la carne en cantidad de vitaminas A y B, y riboflavina (Thomas y Schumann, 1992).

La nuez es fuente de ácidos grasos esenciales; el aceite de nuez, que representa el 63-71% p/p de la semilla, contiene un 60% de ácido linoleico y un 11% de ácido linolénico (Grave y col., 1992; Zlatanov y col., 1999; Tsamouris y col., 2002; Martínez y col., 2005; Martínez y col., 2010). El aceite también contiene, en menor proporción, fosfolípidos, ácidos grasos libres, material insaponificable y vitaminas liposolubles, entre ellas, los carotenos y los tocoferoles (Demir y Cetil, 1999; Tsamouris y col. 2002; Martínez y col., 2005, Martínez y col., 2010).

También se la considera fuente de proteínas, la que representa entre el 13 y el 18% p/p de la semilla (Thomas y Schumann, 1992; Sze-Tao y Sathe, 2000; Venkatachalam y Sathe, 2006). Las mismas son altamente digeribles y poseen un buen balance de aminoácidos esenciales; con una relación entre aminoácidos esenciales y totales (AAE/AA_t) que se encuentra alrededor del 30% (Payne, 1985; Sze-Tao y Sathe, 2000; Venkatachalam y Sathe, 2006). Entre las proteínas de la nuez, clasificadas en base a la solubilidad, predominan las glutelinas, seguidas por las globulinas, ambas representan el 70 y el 25%, respectivamente, del total de las proteínas, y en menor porcentaje se encuentran las albúminas (6,8%) y las prolaminas (5,5%) (Sze-Tao y Sathe, 2000).

En la nuez, además, se encuentran hidratos de carbono (12 - 16%, p/p); fibras (1,5 - 2%, p/p); minerales (1,7 - 2%, p/p), entre los que se destacan hierro, magnesio, potasio y fósforo; vitaminas (ácido fólico, tiamina y riboflavina) y otros compuestos lipo e hidrosolubles (ácido fítico, polifenoles, pigmentos, etc.) (Wardlaw, 1999; Fukuda y col., 2003; Maguire y col., 2004; Colaric y col., 2005).

La nuez es uno de los frutos secos que presenta un alto contenido en compuestos fenólicos (Anderson y col., 2001), los que se encuentran principalmente en el tegumento y se les atribuyen efectos beneficiosos en la salud humana (Prasad 1993; Ravai, 1992; Sze-Tao y Sathe, 2000). En su mayor parte son ácidos fenólicos (gálico, elágico) y compuestos altamente polimerizados (galo o elagitaninos). La actividad antioxidante y antimicrobiana de los mismos ha sido estudiada tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Anderson y col., 2001; Fukuda y col., 2003; Colaric y col., 2005; Kornsteiner y col., 2006; Maestri y col. 2006;; Oliveira y col., 2008; Arcan y Yemenicioglu, 2009; Zang y col., 2009; Bulló y col., 2010). Debido a su baja solubilidad en el aceite, estos compuestos fenólicos permanecen en el residuo luego que los lípidos son extraídos.

Sin embargo, algunos polifenoles son considerados antinutricionales ya que se pueden acomplejar con las proteínas, almidón y enzimas digestivas, causando una reducción en el valor nutritivo de los alimentos. Así mismo, algunos poseen la capacidad de quelar cationes divalentes, principalmente hierro y zinc, reduciendo la biodisponibilidad de los mismos.

Aspecto funcional

Las propiedades que inciden en las características fisicoquímicas y organolépticas de los alimentos son las denominadas propiedades funcionales (Colombo y col., 2011).

Las condiciones del proceso de obtención de las harinas (temperatura, presión, disolventes orgánicos, etc.) pueden afectar estas propiedades, debido por ejemplo, a cambios en la estructura proteica, hidrólisis de enlaces peptídicos, condensación con otras moléculas. Estas modificaciones, a su vez, pueden influir no solo en las propiedades funcionales de las proteínas (Buera y col., 1983; Badui Dergal y col., 2003), sino también en la de los otros componentes del alimento.

Existen pocos antecedentes que den cuenta de las propiedades funcionales de harinas de nuez. Sólo recientemente Mao y Hua (2012) han estudiado estas propiedades en harina deslipidizada y concentrados y aislados obtenidos a partir de la misma. Por otra parte, no se conocen productos industriales preparados con harina de nuez, aunque existen estudios relacionados con su capacidad para ser incorporadas en pastas frescas (Allín, 2010 a y b) y reemplazando proteína animal en la formulación de productos cárnicos (Cofrades y col., 2008; Ayo y col., 2008).

Estabilida oxidativa

Los residuos obtenidos de procesos de extracción de aceite, pueden retener porcentajes importantes del mismo y, si bien las semillas poseen sustancias antioxidantes que lo protegen, las harinas con alto contenido de lípidos son susceptibles a sufrir procesos oxidativos que pueden alterar su calidad y disminuir su valor biológico.

Una forma de evaluar la estabilidad oxidativa de productos alimenticios consiste en envasarlos y colocarlos bajo condiciones de góndola (iluminación y temperatura controladas), durante un tiempo prolongado, para luego analizar diversos parámetros de calidad, tanto del aceite como de los otros componentes de la harina, que dan cuenta del estado de las muestras durante el tiempo de almacenamiento (Vanhanen y Savage, 2006; Avanza y Añon, 2007; Abugoch y col. 2009).

En relación específicamente a la estabilidad de nueces sin cáscara, Jensen y col. (2001) indican que pueden ser almacenadas en oscuridad para prolongar la vida útil de las mismas. Por otra parte, Martínez (2010) encontró que el aceite obtenido de la nuez, es estable por 105 días cuando se almacena a 25 °C y protegido de la luz y, que cuando es sometido a termo-oxidación (110 °C y aire a 20 litros/h), la estabilidad del aceite es independiente de la condición lumínica. Amaral y col. (2003) evaluaron la estabilidad oxidativa del aceite presente en seis variedades de nueces, mediante ensayo con equipo Rancimat, y determinación del índice de peróxido, e informaron que el aceite de nuez es relativamente inestable comparado al de otras oleaginosas.

El único antecedente en relación a la estabilidad oxidativa de harina de nuez, corresponde al trabajo de Vanhanen y Savage (2006), quienes evaluaron la estabilidad por medio de la determinación del índice de peróxido del aceite retenido, y concluyen que podría ser preservada de la oxidación lipídica hasta 26 semanas, teniendo especial cuidado en el contenido de humedad de la muestra almacenada y en el tipo de envase. Estudios sobre estabilidad de harina de nuez que contemple el deterioro que pueden sufrir otros componentes de la muestra no se han encontrado.

Utilización de derivados vegetales

En la formulación de alimentos, las proteínas de origen vegetal constituyen una alternativa cada vez más importante que pueden reemplazar parcial o totalmente a las

proteínas animales (Nunes y col., 2003). Con la harina de nuez, y otros derivados proteicos, que se pueden obtener a partir de la misma (aislados y/o concentrados), se agregaría valor a un producto primario que ya se encuentra definido por la FAO (Cap. 5) como un producto elaborado (<http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/economic>). Con la utilización de estos productos como ingredientes, en la formulación de alimentos o como suplementos o complementos de otras harinas y de cereales, se podría lograr un incremento de los contenidos de nutrientes (proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales) y antioxidantes naturales, beneficiosos para la salud.

El presente trabajo pretende obtener harina de nuez (*Juglans regia* L, var. Franquette) a partir del residuo de extracción del aceite, profundizar en el conocimiento de las propiedades químico-nutricionales y funcionales e indagar en aspectos que inciden en la estabilidad de dicha harina.

CAPÍTULO I: OBTENCIÓN DE HARINA DE NUEZ. ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES

I.1. INTRODUCCIÓN

El Código Alimentario Argentino (CAA) (<http://www.anmat.gov.ar/alimentos/>) define la nuez sin cáscara, como la semilla comestible sin el endocarpio lignificado, y si bien contempla la obtención de harinas proteicas vegetales a partir de semillas limpias, sanas y enteras, que han sido sometidas o no a procesos de remoción del aceite, aún no se encuentra codificada la harina de nuez.

A la vez, el mismo Código indica que, los aceites alimenticios se pueden obtener a partir de semillas o frutos oleaginosos mediante procesos que se ajusten a condiciones de higiene y que en el caso del uso de disolvente, éste deberá ser hexano. En algunos casos particulares (aceites de girasol virgen, cártamo, oliva virgen, oliva refinado) se establece que los procedimientos de extracción deben ser exclusivamente mecánicos. Por el momento, el proceso de extracción del aceite de nuez, no se ha especificado.

La extracción con disolvente se basa en la distribución sólido-líquido del soluto entre dos fases, según la relación de equilibrio determinada por la naturaleza del soluto y las fases (Bockish, 1998). La extracción del aceite por prensado, en tanto, consiste en la aplicación de una fuerza externa que comprime, deforma y destruye las paredes celulares, así como también las finas membranas que rodean a los esferosomas, provocando la liberación del aceite que contienen (Mattea, 1999).

Entre ambos tipos de extracción, la utilización de disolvente permite mayor rendimiento en aceite, sin embargo, la prensa, hidráulica o a tornillo, provee un método sencillo para obtener aceites de pequeños lotes de semillas o frutos con un contenido lipídico alto (Wiesenborn y col., 2001; Singh y col., 2002; Zheng y col., 2003). Por otra parte requiere instalaciones menos costosas e implica operaciones más seguras y de menor riesgo para el ambiente (Mattea, 1999; Martínez, 2010). En relación a la utilización de diferentes tipos de prensas para la obtención de aceite de palma Oseni y col. (2002), encuentran que la prensa a tornillo resulta más eficiente y económica que la prensa hidráulica.

Uno de los principales objetivos en la obtención de productos proteicos a partir de semillas oleaginosas, radica en encontrar el método más adecuado para la extracción del

aceite que permita por un lado, un alto rendimiento y la obtención de un aceite con características químicas y organolépticas de calidad comercial, y por otro un residuo proteico con características nutricionales y funcionales adecuadas.

En estudios referidos al aceite de nuez, se ha informado que, tanto con el proceso de extracción mediante disolvente como con prensas, se obtienen aceites de buena calidad (Crowe y col., 2002; Martínez y col. 2010). Al momento existen pocos antecedentes que den cuenta de las características químicas del residuo deslipidizado y en general la obtención de los mismos se ha realizado a escala laboratorio y con disolvente (acetona o hexano) (Sze-Tao y Sathe 2000; Sathe y col., 2009; Mao y Hua, 2012). No se han encontrado estudios relacionados al efecto de diferentes métodos de extracción del aceite en la composición químico-nutricional y funcional de las harinas de nuez resultantes.

Aunque no existen referencias de utilización del “residuo” de nuez en productos alimenticios, las propiedades nutricionales lo hacen potencialmente apto para su empleo en nutrición humana. El estudio de Sze-Tao y Sathe (2000) revela que las proteínas de la nuez son altamente digeribles y poseen un buen balance de aminoácidos esenciales que, sumados a otros componentes que se encuentran en cantidad apreciable, tales como vitaminas, minerales, melatonina y compuestos fenólicos (Lavedrine y col., 2000, Reiter y col., 2005, Pereira y col., 2008, García-Parrilla y col., 2009, Arcan y Yemenicioglu, 2009), conforman un producto que podría proporcionar beneficios saludables.

Frente a estos antecedentes y considerando que los tratamientos necesarios para optimizar la extracción del aceite pueden tener efectos indeseados sobre la calidad de las harinas y particularmente sobre las proteínas, componentes con mayor valor nutricional, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

I.1.1. Objetivos específicos

- Obtener harinas, mediante diferentes procesos de extracción del aceite, a partir de semillas de nuez (*Juglans regia* L.) de la var. Franquette.
- Evaluar el efecto del método de obtención de harinas de nuez en la composición proximal y en la fracción proteica.
- Seleccionar un método para la obtención de harina de nuez.
- Determinar las características químico-nutricionales de la harina de nuez seleccionada

SECCIÓN A: OBTENCIÓN DE HARINAS DE NUEZ (Objetivos 1-3)

I.A.1. MATERIALES Y MÉTODOS

I.A.1.1. Materiales

Se utilizaron como materia prima semillas de nuez (*Juglans regia* L. var. Franquette) (cosecha 2008) procedentes de cultivos ubicados en la localidad de Belén, provincia de Catamarca.

I.A.1.2. Métodos

I.A.1.2.1. Obtención de harinas de nuez

Las semillas fueron seleccionadas y acondicionadas para disminuir su contenido lipídico mediante disolvente y/o prensado de acuerdo a las metodologías que se detallan a continuación:

I.A.1.2.1.a. Extracción con disolvente

Lixiviado

Tamaño de partícula: entre 0,5 mm y 1 mm, obtenido por molino a cuchillas y posterior tamizado mediante tamices en serie, sometidos a vibración continua durante 20 minutos.

Temperatura del proceso: 25°C.

Extracción del aceite: se realizó con *n*-hexano como disolvente (grado analítico, valoración: mínimo 96%), mediante lixiviación hasta agotamiento del material colocado en una columna de vidrio (66 cm de altura x 4 cm de diámetro).

Pasiva (P)

Tamaño de partícula: entre 0,5 mm y 1 mm, obtenido por molino a cuchillas.

Temperatura del proceso: 25°C.

Extracción del aceite: se realizó con *n*-hexano como disolvente (grado analítico, valoración: mínimo 96%), mediante extracción pasiva de la muestra colocada en un erlenmeyer (250 ml), relación 1:5 (p/v), durante 24 h.

Soxhlet (S)

Tamaño de partícula: entre 0,5 mm y 1 mm, obtenido por molino a cuchillas.

Temperatura del proceso: la correspondiente al punto de ebullición del disolvente (AOAC, 1995).

Extracción del aceite: se realizó mediante extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet con *n*-hexano como disolvente (grado analítico, valoración: mínimo 96%), durante 12 h.

I.A.1.2.1.b. Extracción por prensado

Prensa hidráulica (Ph)

Tamaño de partícula: entre 1 mm y 3 mm obtenido por molino de rodillos de acero inoxidable, de apertura regulable.

Temperatura del proceso: $18 \pm 2^\circ\text{C}$. La temperatura del barral, durante la extracción, se midió con una termocupla insertada dentro de la pared del barral y próxima a la terminal de descarga.

Extracción del aceite: se llevó a cabo mediante una prensa hidráulica de acero inoxidable, escala piloto, a una presión máxima de 30 kg/cm^2 (Tobares y col., 2003).

Prensa a tornillo (Pt)

Tamaño de partícula: entre 2,4 mm y 4,8 mm, correspondiente al óptimo para la alimentación de la prensa, obtenido en molino a rodillos de acero inoxidable, de apertura variable. Posteriormente se tamizó, mediante tamices en serie, con apertura de malla comprendida entre 1 mm y 5 mm, sometidos a vibración continua durante 20 min. El contenido de humedad de la pulpa se ajustó al rango entre 7% y 8% mediante humidificación del material según metodología propuesta por Singh y Bargale (2000), para lo cual, por aspersion, se agregó agua destilada a la muestra molida contenida en un recipiente; luego se cerró herméticamente, se almacenó, a 4°C y, para la uniforme

distribución de la humedad, se agitó a intervalos regulares, durante 48 h hasta alcanzar el equilibrio.

Temperatura del material: 25°C, 50°C o 70°C. El material molido e hidratado, se llevó a estufa a fin de ajustar la temperatura al valor deseado.

Extracción del aceite: se realizó en una prensa a tornillo helicoidal, a escala piloto, tipo “Expeller” (Komet, modelo CA 59G), las dimensiones del barral fueron de 7 cm de longitud total, 3 cm de longitud efectiva y 3,5 cm de diámetro interno; en tanto que las del tornillo fueron de 15 cm de longitud y 3 cm de diámetro. Se utilizó una restricción de 5 mm de diámetro, con ranura estándar. La velocidad de prensado fue de 20 rpm y la temperatura del proceso (25; 50 o 70°C) se ajustó mediante la utilización de una camisa termostatazada en forma de anillo rodeando al barral o cilindro de la prensa. Las muestras fueron introducidas a la prensa desde la tolva por gravedad en lenta caída, según la demanda (Martínez y col., 2006).

El proceso utilizado para disminuir el contenido de aceite de la semilla originó la codificación de las harinas obtenidas:

- Control (lixiviado a 25°C)
- Ph (prensa hidráulica a 18°C)
- Ph+P (prensa hidráulica y post extracción pasiva, con disolvente a 25°C)
- Ph+S (prensa hidráulica y post extracción con disolvente a ebullición, mediante Soxhlet)
- Pt 25° (prensa a tornillo a 25°C)
- Pt 50° (prensa a tornillo a 50°C)
- Pt 70° (prensa a tornillo a 70°C)

En las harinas Ph+P y Ph+S, el material obtenido de la prensa hidráulica (Ph) fue molido y tamizado nuevamente, para reducir el tamaño de partículas a 0,5 mm y 1 mm y luego fue sometido a extracción con disolvente.

Todas las harinas así obtenidas se mantuvieron congeladas (-18°C), hasta proceder con los análisis correspondientes.

I.A.1.2.2. Composición proximal de las harinas

Los valores de humedad y cenizas fueron determinados gravimétricamente (AOAC, 1995). El contenido de proteínas se determinó por el método de Kjeldahl empleando 5,3 como factor de conversión de Nitrógeno en proteínas (Venkatachalam y Sathe, 2006). El contenido de aceite residual de las harinas se extrajo con *n*-hexano mediante equipo Soxhlet (12 h) y el de hidratos de carbono (HdeC) se calculó por diferencia.

I.A.1.2.3. Color

El color de las harinas obtenidas mediante distintos procesos de deslipidizado fue determinado utilizando un espectrofotómetro de reflectancia (Minolta 508d, USA). Se empleó la escala Hunter-Lab para medir luminosidad (L^* : 0 = negro, 100 = blanco) y cromaticidad (a^* : $+a$ = rojo, $-a$ = verde; b^* : $+b$ = amarillo, $-b$ = azul). En cada muestra se realizaron seis determinaciones y los resultados fueron expresados como las medias \pm desvío estándar. La diferencia total del color (ΔE) se calculó mediante la siguiente ecuación (Veiga-Santos y col., 2005):

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

donde ΔE es la diferencia total de color entre la muestra y la harina Control.

I.A.1.2.4. Fracción proteica

I.A.1.2.4.a. Proteínas solubles

La obtención de proteínas solubles se realizó mediante la dispersión (1:10, p/v) de las harinas obtenidas, en *buffer* fosfato (0,2 M, pH 8) con agitación durante 2 h, a 25°C. La dispersión se centrifugó a 9000 *g*, durante 20 min, a 4°C. En el sobrenadante se realizó la determinación de la solubilidad proteica (*S*) mediante lectura de los valores de Absorbancia (*A*) a 260 y a 280 nm. Los resultados se expresaron como mg de proteína soluble por gramo de muestra seca (mg/g) de acuerdo a la siguiente ecuación (Kalckar, 1947):

$$S \text{ (mg/g)} = [(A \text{ 280} \times 1,45) - (A \text{ 260} \times 0,74)] / \text{g muestra.}$$

I.A.1.2.4.b. Fraccionamiento de la proteína

Se realizó en forma secuencial siguiendo la metodología utilizada por Sze-Tao y Sathe (2000), con modificaciones. Para la obtención de las albúminas, la harina deslipidizada se

solubilizó con agua bidestilada-deionizada (1:10 p/v) y se agitó durante 2 horas, a 25°C. La dispersión fue centrifugada a 9000 g por 20 minutos, a 4°C y filtrada con papel Watman N°4 para remover las partículas insolubles. El precipitado y los residuos del filtrado se juntaron y fueron utilizados para la obtención de las globulinas, mediante solubilización en NaCl 1,0 M. La dispersión se incubó por 2 h, a 25°C, con agitación continua y posterior centrifugación y filtración bajo las mismas condiciones que para la obtención de las albúminas. Los disolventes utilizados para la obtención de las prolaminas y glutelinas fueron: etanol al 70% y borato de sodio (Na₂B₄O₇, 0,1 M, pH 10), respectivamente. Los períodos de extracción para cada fracción fueron de 2 h, con agitación. La centrifugación y filtrado se llevó a cabo de la misma manera que las utilizadas para las otras fracciones.

Una alícuota (5 ml) de cada uno de los sobrenadantes con la proteína soluble, en *buffer* fosfato pH 8,0 y con la de las diferentes fracciones proteicas, fue mezclada con 4 volúmenes de acetona fría, incubadas a -20°C, por 1 h y centrifugada a 9000 g por 15 minutos. El precipitado resultante fue secado y reservado para el análisis electroforético.

I.A.1.2.4.c. Electroforesis desnaturalizante y reductora en geles de poliacrilamida

La composición polipeptídica de las proteínas solubles se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando como agente reductor 2-mercaptoetanol (2-ME), de acuerdo a la metodología propuesta por Laemmli (1970). El gel de separación fue del 12% (p/v) y el de concentración del 3% (p/v). Las electroforesis se realizaron en equipo mini slab (Cole Parmer, Dual vertical Mini-Gel Systems, Modelo 28575-00) y los *buffers* utilizados fueron: *buffer* de separación: 0,375 M Tris-HCl, 0,2% SDS, pH 8,8; *buffer* de corrida: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3; *buffer* de la muestra: 0,2 M Tris-HCl, 15% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 0,2 M EDTA, 5% v/v 2-ME, 0,1% p/v azul de bromofenol, pH 6,8. Las muestras se disolvieron en el *buffer* de la muestra, se calentaron a 100°C por 2 min, y centrifugaron a 5000 g, a temperatura ambiente. Las corridas se realizaron a corriente constante de 20 mV por gel.

Luego de la electroforesis, los geles se fijaron en ácido acético al 25% v/v y colorearon con MeOH/H₂O/ácido acético (5:5:2, v/v/v) conteniendo 0,5% de Coomassie Brilliant Blue G-250. La decoloración se realizó con solución acuosa de etanol (30% v/v) y ácido acético (10% v/v).

Para estimar la masa molecular de las proteínas, se sembraron en los geles, patrones de peso molecular conocido (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); aprotinina (5,7 kDa), lisosima (18,5 kDa), inhibidor de tripsina (28,4 kDa), anhidrasa carbónica (35,9 kDa), ovoalbúmina (52,9 kDa), seroalbúmina bovina (96,3 kDa), β -galactosidasa (113,5 kDa) y miosina (198 kDa).

I.A.1.2.5. Análisis estadístico

Las determinaciones analíticas fueron promedios de mediciones realizadas por duplicado de muestras independientes para cada tratamiento. Las diferencias estadísticas se estimaron mediante el test ANOVA y el nivel de confianza fue del 95% ($p \leq 0,05$) para todos los parámetros evaluados. Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas se realizó la comparación de las medias entre pares mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) y, en las Tablas, se expresan con letras distintas. Todos los análisis se realizaron con el programa InfoStat (versión 1.1) desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba (Di Rienzo y col., 2008).

I.A.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.A.2.1. Efecto del método de obtención en la composición proximal y color de las harinas

Los resultados referidos a la composición proximal de las semillas de nuez y de las harinas obtenidas mediante los diversos tratamientos se presentan en la Tabla I.1. En la semilla de nuez el componente mayoritario fue el aceite (72%), seguido por los carbohidratos y las proteínas, que en conjunto representaron el 26%. Los valores obtenidos, tanto para las proteínas como para los lípidos, son similares a los informados para nueces de esta misma variedad cultivada en Portugal (Pereira y col., 2008), y se encuentran próximos a los rangos publicados para nueces enteras de diversos orígenes y variedades; entre 13 - 18% para proteínas (Wardlaw, 1999; Fukuda y col., 2003; Maguire y col., 2004; Colaric y col., 2005) y entre 63 - 71% para aceite (Demir y Cetil, 1999; Tsamouris y col., 2002; Prasad, 2003; Martínez y col., 2005, 2006, 2008 y 2010). Los valores de cenizas y de carbohidratos son cercanos a los rangos encontrados en bibliografía (Wardlaw, 1999; Fukuda y col., 2003; Maguire y col., 2004; Colaric y col., 2005).

Los resultados obtenidos, al determinar la composición proximal de las harinas, indican que el tratamiento menos eficiente en extraer el aceite de la muestra, correspondió a la prensa hidráulica, con un valor de aceite retenido en la harina Ph de 41,0%. El bajo rendimiento de extracción se debió a las condiciones de temperatura y presión utilizadas para el prensado, 18°C y 30 kg/cm², respectivamente.

Como resultado de la doble extracción (prensado hidráulico y luego disolvente) se encontró que la mayor fracción correspondió a la de carbohidratos y que el contenido proteico aumentó en detrimento del lipídico, respecto a los de Ph y a los de la semilla. Estas harinas obtenidas con doble extracción (Ph+P y Ph+S) no fueron diferentes una con respecto a la otra ($p \leq 0,05$), por lo que la temperatura, a 25°C o a ebullición, en la post-extracción con disolvente, no ejerció efecto en la composición de las muestras.

En relación a la composición proximal de las harinas procedentes de la prensa a tornillo, se observó que el componente mayoritario correspondió a los carbohidratos (40% aproximadamente). Del análisis estadístico surge que la temperatura, bajo las condiciones de

prensado, no ejerció efecto en el contenido proteico de la torta residual y tampoco en el del aceite retenido.

En las harinas obtenidas de los diversos tratamientos para reducir el contenido de aceite se encontró que el contenido de cenizas presentó un rango entre 3,7% y 6,1%, correspondiendo los mayores valores ($p < 0,05$) a las muestras con menor contenido lipídico.

Tabla I.1: Composición proximal de la semilla de nuez y de las harinas obtenidas por distintos tratamientos de extracción del aceite, expresada como g/100 g sólido seco.

Muestra	Proteínas	Aceite	Cenizas	H de C
Semilla	10,7 ± 0,91	72,1 ± 2,26	1,4 ± 0,02	15,8
Control	38,1 ^d ± 0,08	7,2 ^a ± 0,08	5,2 ^c ± 0,03	49,5
Ph	24,2 ^{a,A} ± 0,69	41,0 ^{c,C} ± 2,12	3,7 ^{ab,A} ± 0,14	31,2
Ph+P	38,7 ^{d,C} ± 0,06	6,0 ^{a,A} ± 0,16	5,9 ^{d,B} ± 0,02	49,4
Ph+S	38,8 ^{d,C} ± 0,06	4,6 ^{a,A} ± 0,17	6,1 ^{d,B} ± 0,01	50,5
Pt 25°	28,7 ^{c,B} ± 0,52	30,5 ^{b,B} ± 2,52	3,7 ^{a,A} ± 0,11	38,0
Pt 50°	26,9 ^{b,B} ± 1,44	31,1 ^{b,B} ± 3,86	3,7 ^{ab,A} ± 0,14	39,3
Pt 70°	28,9 ^{c,B} ± 1,20	27,7 ^{b,B} ± 2,42	3,8 ^{b,A} ± 0,14	39,6

Harinas obtenidas: Control: por Lixiviado; Ph: por Prensaado hidráulico; P: pasivo; S: Soxhlet; Pt: Prensa tornillo a distintas temperaturas (25; 50 y 75°C). Valores medios ± desvíos estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Letras mayúsculas distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre tratamientos que involucraron prensaado.

En la Imagen I.1 se presentan fotografías de las harinas. En general la coloración fue heterogénea debido a la presencia de tegumento. Las muestras procedentes de la prensa hidráulica y post extracción con disolvente (Ph+P y Ph+S) fueron de aspecto similar a la obtenida por lixiviado (Control). En tanto que, el mayor contenido de aceite en las muestras sometidas únicamente a prensaado (hidráulico o a tornillo), dio lugar a harinas menos porosas, particularmente la Pt 70°, que resultó compacta y de color oscuro.

Los parámetros de color confirman la percepción visual de las muestras (Tabla I.2). Las harinas más claras (menores valores de ΔE) correspondieron a Ph+P y Ph+S, las cuales resultaron similares ($p \leq 0,05$) a la harina Control, tanto en luminosidad (L^*), como cromaticidad (a^* y b^*). Las obtenidas sólo por prensaado (Ph y las Pt 25°, 50° y 70°)

presentaron valores inferiores en el parámetro L^* , resultando la Pt 70° ($L^* = 52,4$), significativamente más oscura que las restantes. El color de estas muestras varió, de tonalidades amarillenta a marrón-amarillo, con valores superiores en los parámetros a^* y b^* , respecto a la harina Control.

Las diferencias en el color total (ΔE) de las muestras obtenidas por prensa a tornillo a 25°C y a 50°C, con respecto a la Pt 70°, indican que, el color desarrollado durante la extracción a 70°C, se debe a la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra y a reacciones entre los azúcares reductores y los grupos amino de las proteínas, estas últimas conocidas como reacción de Maillard, dando lugar, en ambos tipos de reacciones, a compuestos coloreados.

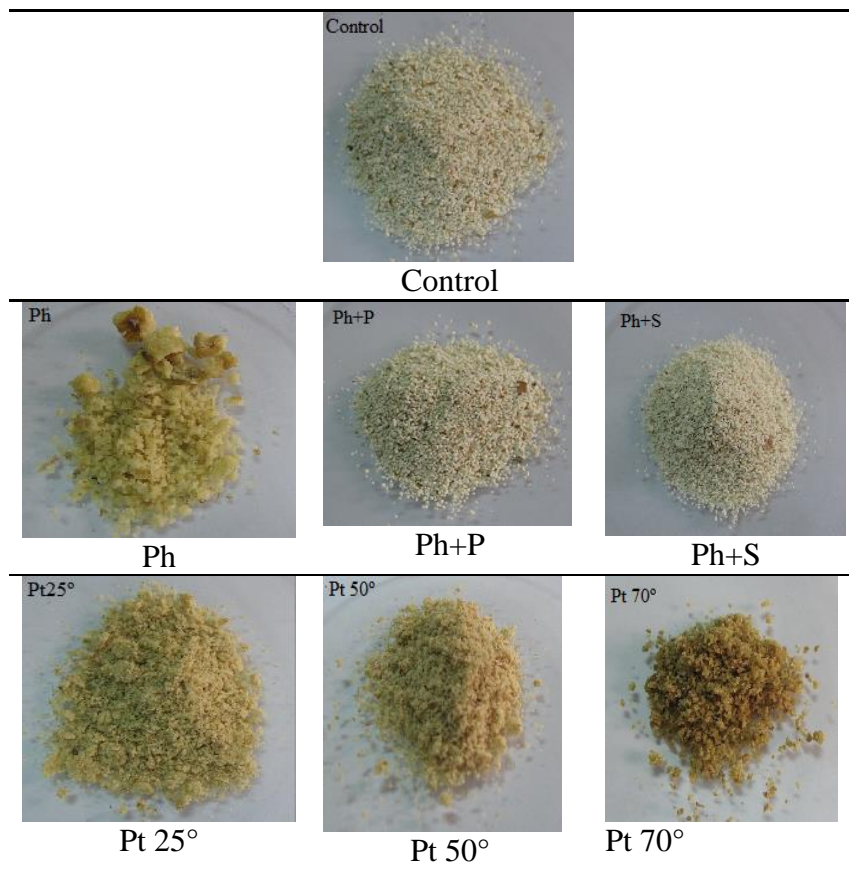


Imagen I.1: Aspecto de las harinas obtenidas por los diferentes tratamientos

Tabla I.2: Parámetros de color de las harinas obtenidas por distintos tratamientos de extracción del aceite y diferencia total de color entre cada muestra y la harina Control (ΔE).

	Control	Ph	Ph+P	Ph+S	Pt 25°	Pt 50°	Pt 70°
L^*	82,1 ^d ±0,9	64,3 ^c ±1,2	84,2 ^e ±1,0	82,5 ^{d,e} ±0,6	62,9 ^{b,c} ±0,5	61,5 ^b ±0,2	52,5 ^a ±0,2
a^*	0,8 ^a ±0,2	3,7 ^b ±0,5	0,7 ^a ±0,4	1,0 ^a ±0,1	4,1 ^b ±0,04	4,9 ^c ±0,2	5,6 ^d ±0,2
b^*	14,3 ^a ±0,6	22,4 ^b ±1,1	14,5 ^a ±0,1	13,6 ^a ±0,4	23,2 ^b ±1,1	21,8 ^b ±0,1	21,9 ^b ±0,2
ΔE	---	19,7 ^b ±1,8	2,2 ^a ±0,1	1,0 ^a ±0,8	21,4 ^{b,c} ±1,1	22,2 ^c ±0,9	30,9 ^d ±0,8

Valores medios \pm desvíos estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

I.A.2.2. Efecto del método de obtención de las harinas en la fracción proteica

A fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en la fracción proteica de las muestras obtenidas, se procedió a determinar la solubilidad en *buffer* fosfato pH 8,0 y el perfil electroforético de las proteínas solubles.

Respecto a la solubilidad proteica se observa (Tabla I.3) que la menor solubilidad se encontró en las proteínas de la muestra proveniente de la prensa hidráulica, independientemente de la temperatura utilizada en la post-extracción con disolvente (P o S) y en las de la muestra Pt 70°. En tanto que la harina que presentó el mayor valor de solubilidad fue la obtenida por la prensa a tornillo a 50°C (Pt 50°).

Las diferencias encontradas se pueden atribuir a los distintos grados de desnaturalización proteica ocasionada, ya sea por efecto de la temperatura como por el esfuerzo mecánico y/o la intensidad del tratamiento utilizado para la remoción del aceite. Acorde a lo expresado por Badui-Dergal (1999), desde un sentido termodinámico, la desnaturalización proteica se refiere al cambio de un estado ordenado de las moléculas a otro desordenado; en este proceso se pierden las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, sin que haya una hidrólisis del enlace peptídico; es decir que los principales tipos de uniones afectados son los de hidrógeno, los hidrófobos y los iónicos. Una vez desnaturalizada, la proteína se desdobra, expone sus grupos hidrófobos internos, y adquiere una conformación “al azar” que depende de la intensidad del tratamiento que se le aplique, así como de las fuerzas

que estabilizan su estructura. En general, la exposición de los residuos hidrófobos lleva aparejado la reducción en la solubilidad proteica.

Al comparar el porcentaje de proteínas totales de las muestras (Tabla I.1) con la solubilidad de las mismas (Tabla I.3) es posible llegar a la conclusión que la prensa hidráulica provoca mayor desnaturalización proteica que la prensa a tornillo, efecto que se traduce en una reducción en la solubilidad proteica observada.

Tabla I.3: Solubilidad proteica de las harinas en *buffer* fosfato pH 8,0; (mg/g sólido seco).

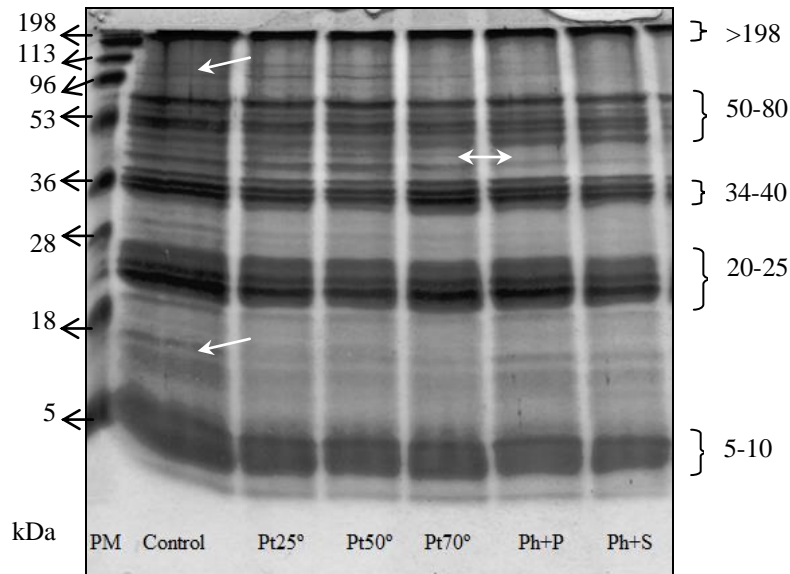
Muestra	Solubilidad proteica (mg/g)
Control	22,26 ^c ± 0,89
Ph+P	13,38 ^a ± 1,06
Ph+S	15,81 ^a ± 1,07
Pt 25°	25,22 ^d ± 1,13
Pt 50°	32,83 ^e ± 1,13
Pt 70°	18,98 ^b ± 1,03

Control: por Lixiviado; Ph+P: Prensado hidráulico+Pasivo; Ph+S: Prensado hidráulico+Soxhlet; Pt: Prensa tornillo a distintas temperaturas (25; 50 y 70°C). Valores medios ± desvío estándar. Valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos.

En cuanto al análisis electroforético, en la Figura I.1 se muestra el electroferograma realizado bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con agente reductor, de las muestras Control (sin tratamiento de prensado) y las procedentes de los tratamientos con diferentes prensados y temperaturas para la extracción del aceite. En todas las muestras se evidencia la presencia de cinco grupos de bandas intensas. Cuatro de ellos correspondientes a complejos polipeptídicos con rangos de pesos moleculares entre 5 – 10 kDa; 20 – 25 kDa; 34 – 40 kDa y 50 – 80 kDa, respectivamente y el restante, a proteínas de mayor masa (> a 198 kDa) retenidas en el límite del gel de separación. Estos grupos polipeptídicos no difieren entre las muestras obtenidas bajo los procesos ensayados. Adicionalmente se observan bandas de menor intensidad entre los 10 – 18 kDa y 28 – 32 kDa y un doblete entre los 96 y 113 kDa, cuantitativamente diferentes del perfil de las proteínas totales solubles de la muestra Control. Por ejemplo, el doblete polipeptídico entre los marcadores moleculares de 96 y 113 kDa (indicado con una flecha) presenta menor intensidad en las muestras provenientes de la prensa

hidráulica, en tanto que los polipéptidos en el rango de 10 – 18 kDa se ven más afectados por la prensa a tornillo.

La homogeneidad en el patrón de bandas de mayor intensidad entre muestras indica que la mayoría de las proteínas no se vieron afectadas como consecuencia del prensado hidráulico o a tornillo, ni como consecuencia de la temperatura aplicada a cada tratamiento.



Control: Lixiviado; Pt: Prensa tornillo a distintas temperaturas (25; 50 y 70°C).

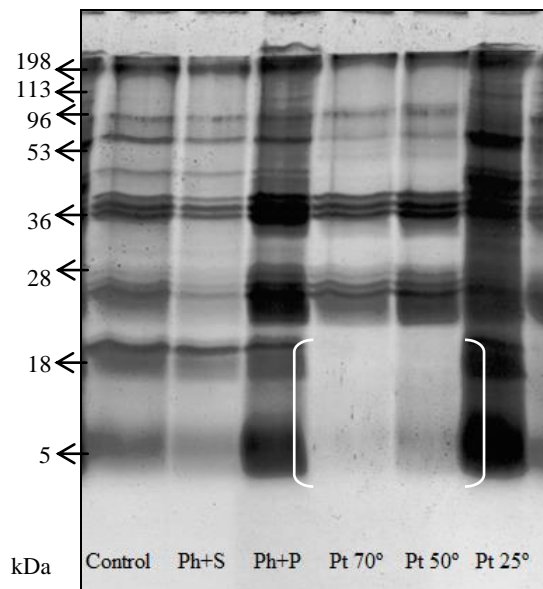
Ph+P: Prensado hidráulico+Pasivo; Ph+S: Prensado hidráulico+Soxhlet.

Figura I.1: Electroferograma de proteínas solubles en *buffer* fosfato pH 8,0 de las harinas de nuez procedentes de los diferentes tratamientos.

En el electroferograma de las fracciones solubles en agua destilada (Figura I.2) se puede observar claramente que los perfiles dependieron del método de obtención de las harinas.

Los polipéptidos de las muestras Control y los correspondientes a la prensa hidráulica (Ph) presentaron perfiles similares, aunque con diferentes intensidades. La temperatura post-prensado, durante la extracción con disolvente en equipo Soxhlet (Ph+S) provocó una disminución en la solubilidad de las albúminas, debido seguramente a la desnaturalización de las mismas por efecto del calor, exposición de residuos hidrófobos y consecuente reducción en la solubilidad. Este efecto se manifiesta en un perfil más tenue que el de Ph+P.

Al comparar los perfiles de las muestras obtenidas con la prensa a tornillo (Pt) se encontró que el patrón polipeptídico fue dependiente de la temperatura aplicada durante el proceso de prensado. El menor número e intensidad de bandas observadas en Pt 50° y en Pt 70°, en comparación con el perfil de la muestra obtenida a 25°C, es un claro indicio del efecto de la temperatura en esta fracción proteica, efecto particularmente notable en los péptidos de bajo PM (< 20 kDa). Al momento no existen estudios termodinámicos de las fracciones proteicas de nuez que permitan entender el grado de desnaturalización que sufren las mismas durante el calentamiento. Sin embargo, en las investigaciones realizadas por Martínez y Añón (1996), Gorinstein y col. (2001) en Amaranto y soja han puesto de manifiesto la termosensibilidad de las albúminas en estas especies.



Control: Lixiviado; Ph+S: Prensado hidráulico+Soxhlet; Ph+P: Prensado hidráulico+Pasivo;
Pt: Prensa tornillo a distintas temperaturas (25; 50 y 70°C).

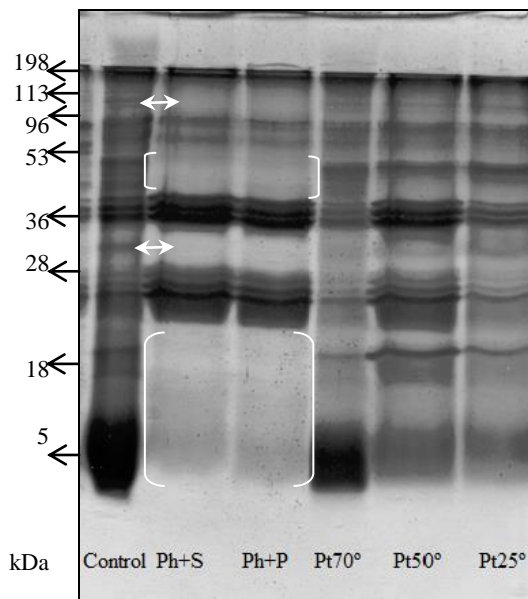
Figura I.2: Electroferograma de la fracción de albúminas.

En el electroferograma correspondiente a las fracciones solubles en cloruro de sodio acuoso (Figura I.3) se observa que, al igual que con la fracción de las albúminas, los perfiles dependieron del tratamiento de obtención de las harinas.

En esta fracción proteica las muestras de Ph+P y Ph+S fueron similares entre sí y diferentes al perfil polipeptídico del Control, con un número significativamente menor de bandas, principalmente en el rango de PM entre <5 – 20 y 40 – 50 kDa. Por otra parte, los polipéptidos a 30 y 100 kDa (indicados con flechas en la figura), presentes en la muestra

Control, no se observaron en los perfiles de las muestras obtenidos con la prensa hidráulica. Estos resultados indican que no es la temperatura del post prensado (25°C o ebullición del disolvente), sino el prensado hidráulico el que afecta a la fracción de globulinas en estas muestras.

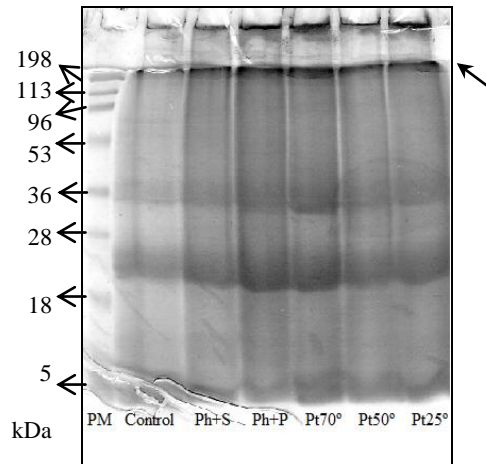
Los perfiles de las muestras obtenidas con la prensa a tornillo a 25°C y 50°C, fueron similares entre sí; en tanto que el tratamiento a mayor temperatura (Pt 70°C) generó una disminución en la intensidad de las bandas localizadas entre los 15 y 40 kDa y un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a los péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa).



Control: Lixiviado; Ph+S: Prensado hidráulico+Soxhlet; Ph+P: prensado hidráulico+Pasivo; Pt: Prensa a tornillo a distintas temperaturas (25; 50 y 70°C).

Figura I.3: Electroferograma de la fracción de globulinas.

En el electroferograma de las glutelinas (Figura I.4), fracción predominante en las proteínas de nuez (Sze-Tao y Sathe, 2000; Sathe y col., 2009), no se observaron diferencias entre las harinas obtenidas bajo diferentes procesos. Las características más marcadas en estos perfiles fueron, por un lado, la presencia de tres grupos polipeptídicos de aproximadamente 5; 20 y 36 kDa, comparables a los visualizados en los perfiles de la proteína total (Figura I.1) y la presencia de proteína de alto peso molecular que no penetra el gel de separación, a pesar de las condiciones desnaturizantes y reductoras aplicadas a las muestras.



Control: Lixiviado; Ph+S: Prensado hidráulico+Soxhlet; Ph+P: Prensado hidráulico+Pasivo; Pt: Prensa a tornillo a distintas temperaturas (25, 50 y 70°C).

Figura I.4: Electroferograma de la fracción de glutelinas.

Es probable que el relativamente bajo contenido de la fracción de prolaminas (5%) (Sze-Tao y Sathe, 2000) de las muestras impidiera su detección electroforética bajo las condiciones utilizadas.

Los tratamientos aplicados para reducir el contenido lipídico de las semillas de nuez modificaron la composición proximal y el color de las harinas obtenidas. El tratamiento con prensa hidráulica y post extracción con disolvente generó harinas con mayor contenido proteico que las obtenidas con la prensa a tornillo, sin embargo, la solubilidad de la proteína fue significativamente menor. Los perfiles electroforéticos confirmaron el efecto de los distintos tratamientos sobre las fracciones correspondientes a las albúminas y globulinas. Las albúminas fueron afectadas por la prensa a tornillo y la temperatura, en tanto que la prensa hidráulica afectó a las globulinas. La fracción mayoritaria, correspondiente a las glutelinas, no mostró variación entre las muestras procedentes de los tratamientos.

I.A.2.3. Selección de una harina de nuez

Teniendo en cuenta que:

- los tratamientos que involucraron prensado permitieron reducir el contenido lipídico; con la ventaja adicional de limitar, o evitar, el uso de disolvente;

- si bien, las muestras obtenidas por prensa hidráulica y post extracción con disolvente (Ph+P y Ph+S) dieron lugar a harinas con mayor contenido en proteínas, la solubilidad proteica de las mismas fue menor que la obtenida por la prensa a tornillo;
- entre las proteínas de nuez, las fracciones mayoritarias son glutelinas y globulinas (\cong 70% y 18%, respectivamente) (Sze-Tao y Sathe, 2000);
- los tratamientos utilizados afectaron la solubilidad de las proteínas, pero no a los polipeptidos mayoritarios de las proteínas solubles totales (en *buffer* fosfato a pH 8,0);
- el tipo de prensado ejerció efecto diferenciado según las fracciones, las albúminas fueron afectadas por la prensa a tornillo; en tanto que las globulinas, por la prensa hidráulica;
- es aconsejable la utilización de temperaturas, bajas o medias, para maximizar la calidad del aceite; y que, desde el punto de vista operativo, el tratamiento Pt 70° produjo una muestra compacta, dura, de baja porosidad, que afectaría al dispositivo de prensado;

se resuelve seleccionar la prensa a tornillo para disminuir el contenido lipídico de la semilla y el tratamiento Pt 50° para, a partir de la torta residual, obtener la harina proteica de nuez.

SECCIÓN B: ASPECTOS QUÍMICO-NUTRICIONALES DE LA HARINA DE NUEZ SELECCIONADA (Objetivo 4)

El objetivo de la presente Sección fue determinar las características químico-nutricionales de la harina de nuez seleccionada (Pt 50°) y compararla con la correspondiente a la harina resultante del post-deslipidizado mediante disolvente y con harinas de referencia.

I.B.1. MATERIALES Y MÉTODOS

I.B.1.1 Materiales

La harina seleccionada, obtenida a partir de la prensa a tornillo a 50°C (Pt 50°), se la dividió en dos lotes, a uno se lo denominó HN y al otro se lo sometió a extracción con n-hexano en equipo Soxhlet (12 horas), lo cual originó la harina de nuez deslipidizada (HNDeslip). A ambas muestras se las mantuvo a -18°C hasta proceder con los análisis correspondientes. Se analizaron comparativamente harinas comerciales de trigo (HT) y de soja entera, con lípidos (HSoy), adquiridas en el año 2008 en Córdoba, Argentina.

I.B.1.2. Métodos

I.B.1.2.1. Composición proximal y valor nutritivo

El contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas e hidratos de carbono se determinaron de acuerdo a los métodos utilizados en la Sección A. Para el cálculo del contenido de proteínas en las harinas de referencia se utilizó como factor de conversión de Nitrógeno en proteína 5,7 en trigo y 6,25 en soja (CAA).

Con los datos obtenidos de la composición proximal se calculó el valor energético (VEn) y el valor nutricional. El VEn se determinó, considerando que cada gramo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono aportan 9; 4 y 4 calorías, respectivamente. El valor nutricional, en tanto, se calculó en base al porcentaje cubierto por cada nutriente respecto a las necesidades diarias (ND), según valores diarios de referencia (VDR), para una dieta basada en 2000 kcal (FAO/OMS, 2001 y Mercosur, 2003).

I.B.1.2.2. Fracción proteica

I.B.1.2.2.a. Fraccionamiento de la proteína

El fraccionamiento de la proteína se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el punto I.A.1.2.4.b. A una alícuota de los sobrenadantes correspondientes a cada fracción proteica se le determinó la proteína soluble, por el método de Bradford (1976).

I.B.1.2.2.b. Composición de aminoácidos (AA)

Se realizó la hidrólisis, derivatización y cuantificación de los aminoácidos, de acuerdo a la metodología propuestos por Alaiz y col. (1992), con modificaciones. La hidrólisis ácida se realizó con ácido clorhídrico 6,0 M (1:50, p:v). La solución se colocó en tubos, se desplazó el aire con corriente de Nitrógeno, se selló e incubó a 110°C durante 24 h y luego se centrifugó a 11160 g, por 10 min, a 25°C.

Los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] del hidrolizado proteico se prepararon a partir de 100 µl del sobrenadante, solubilizado en 1 ml de *buffer* borato de sodio (1,0 M, pH 9,0) conteniendo 0,02% de azida sódica, al cual se le agregaron 0,8 µl de malonato de dietil etoximetileno. La reacción tuvo lugar a 50°C, durante 50 min, con agitación vigorosa. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. Una alícuota (20 µl) de la muestra derivatizada se analizó mediante HPLC (Perkin Elmer, serie 200) equipado con detector UV. La separación se realizó con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 150 mm), a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min, utilizando un sistema de gradiente binario como fase móvil. Los solventes utilizados fueron, A: acetato de sodio 25 mM conteniendo 0,02% azida sódica (pH 6,0) y B: acetonitrilo. El gradiente de composición de A:B (% v:v) fue: desde el inicio hasta los 3 min, en una rampa lineal, 91:9 a 86:14, mantenido durante 10 min, seguido de una segunda rampa, 86:14 a 69:31, en 17 min y mantenido en esta última condición durante 5 min.

La detección se realizó a 280 nm y la cuantificación mediante curvas de calibración realizadas para cada L-aminoácido (Patrones Sigma) corrido bajo idénticas condiciones.

Con los valores obtenidos en la composición aminoacídica se calcularon las siguientes relaciones:

Deficiencia en Aminoácido esencial: se determinó mediante la relación entre cada AA esencial (AAE) de la proteína presente en la muestra analizada y los correspondientes a los AAE recomendados por la FAO/OMS (1990).

Índice de AAE (IAAE): cociente entre la suma de los AAE de la proteína en la muestra analizada y el total de AAE en la de referencia.

Distribución de AA (DAA%): se obtuvo por el agrupamiento de los AA según la clasificación de la cadena lateral en hidrofóbica, hidrofílica, ácida y básica.

I.B.1.2.2.c. Digestibilidad proteica *in vitro*

La digestibilidad se determinó de acuerdo a Hamaker y col. (1987), con las modificaciones propuestas por Colombo y col. (2011). A una cantidad apropiada de muestra se le agregaron 9 ml de solución enzimática (0,1 M de ácido orto-fosfórico, llevado a pH 2 con NaOH 4,0M y 52,5 mg de pepsina), se homogeneizó y llevó a baño termostático (37°C) durante 2 h, con agitación cada 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó NaOH (2 ml, 2,0 M) para detener la reacción enzimática. Del digesto obtenido se retiró 1 ml, se centrifugó (14000 g, 10 min, 25°C) y en el sobrenadante se determinó, por el método Kjeldahl, la proteína soluble hidrolizada (PSh). El porcentaje de digestibilidad (% D) se calculó, en relación a la proteína total (PT), mediante la siguiente ecuación:

$$\% D = \frac{PSh}{PT} \times 100$$

I.B.1.2.2.d. Electroforesis bajo condiciones nativas, desnaturizantes y reductoras.

La harina deslipidizada, procedente de cada tratamiento, se homogeneizó en *buffer* fosfato (0,2 M, pH 8) y se centrifugó a 8500 g por 30 min, a 4°C. Una alícuota de la proteína soluble se precipitó con acetona fría.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones nativas (PAGE-nativa), con el agregado de SDS (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol (2-ME) (SDS-PAGE-2ME). Las electroforesis SDS-PAGE y nativa se realizaron de acuerdo a Laemmli (1970). En las PAGE-nativa el gel de separación fue del 7%, en tanto que en las SDS-PAGE y SDS-PAGE-2ME fue del 12% (p/v). El gel apilador, en todos los casos, fue del 3% (p/v).

A 0,1 mg de muestra se le agregaron 100 μ l de *buffer* de la muestra, preparada para la PAGE-nativa con 0,16 M Tris-HCl, pH 6,8, 15% v/v glicerol y 0,01% de azul de bromofenol, y para las SDS-PAGE, con el agregado de 2% p/v de SDS. Bajo condiciones reductoras se agregó 5% (v/v) de 2-ME (SDS-PAGE-2-ME) y en este caso las muestras fueron calentadas a 100°C durante 2 min. El *buffer* de corrida utilizado para la PAGE-nativa fue Tris-Glicina: 0,025 M Tris, 0,2 M Glicina, pH 8,3. Para SDS-PAGE y SDS-PAGE-2ME además se agregó 0,1% (p/v) de SDS. Los geles se corrieron a corriente continua (20 mA) utilizando un equipo minislab (Modelos 28575-00, Cole Palmer, Vermon Hills, IL). A fin de estimar el PM de los polipéptidos se corrieron, simultáneamente, estándares de PM conocido (Bio-Rad Co., Hercules, CA). Luego de la electroforesis los geles fueron fijados con ácido acético al 25% v/v por 45 min y el teñido se realizó con Brilliant Blue Colloidal G (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA).

I.B.1.2.3. Fracción lipídica

En la fracción lipídica se determinaron la composición de ácidos grasos, índice de yodo teórico, y las relaciones entre ácidos grasos saturados, insaturados, mono y poliinsaturados.

I.B.1.2.3.a. Composición de ácidos grasos del aceite retenido

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos del aceite retenido en la harina se llevó a cabo por cromatografía gaseosa (GC). Para la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, el aceite (50 μ l) fue sometido a saponificación alcalina (0,5 N KOH en MeOH), mediante reflujo durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con *n*-hexano. Los ácidos grasos hidrolizados se esterificaron con 400 μ l de una solución de HCl:MeOH (4:1 v/v) siguiendo la metodología descrita por Scheuermann y col., (2002). Los esterios metílicos de los ácidos grasos se analizaron por cromatografía gaseosa (Perkin Elmer, Clarus 500), equipado con detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna de fase CP-Wax 52 CB (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 μ m de espesor de fase). Se empleó nitrógeno como gas portador (1 ml/min) y la temperatura se programó desde 180°C (por 1 min) a 220°C (2°C/min). Los tiempos de retención relativos se consideraron en relación al del palmitato de metilo y el contenido de cada uno de los ácidos grasos

identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (Maestri y col., 1998).

I.B.1.2.3.b. Índice de Yodo (IY)

El IY teórico se calculó en base a los valores porcentuales de los ácidos grasos insaturados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{IY: } (\% \text{ Oleico} \times 0,899) + (\% \text{ Linoleico} \times 1,814) + (\% \text{ Linolénico} \times 2,737)$$

Además, los valores obtenidos en la composición de ácidos grasos se aplicaron a las siguientes relaciones:

Ácidos Saturados (Sat)/Insaturados (Insat)

Ácidos Saturados (Sat)/Monoinsaturados (MI)/ Poliinsaturados (PI)

Ácidos Linoleico (L)/ Linolénico (Ln)

I.B.1.2.4. Fracción de cenizas

Para la cuantificación de los macro y microelementos minerales, las cenizas (2,0 g) obtenidas por incineración a 600°C, se solubilizaron en 100 ml de una solución acuosa de HCl:HNO₃ (10:1, v/v) y se analizaron por espectrometría de absorción atómica de llama (Perkin Elmer, AAnalyst 200). La determinación de fósforo, se realizó por precipitación como fosfomolibdato y su posterior titulación alcalimétrica, de acuerdo a Norma ASTM E 350 (Standard Test Methods for Chemical Analysis of Carbon Steel, Low-Alloy Steel, Silicon Electric Steel, Ingot Iron and Wrought Iron), con modificaciones según protocolo (PE.QUI.01.06) del INTI.

Con los valores obtenidos en la composición de minerales se determinó el valor nutricional de los mismos, mediante el cálculo del porcentaje cubierto por cada elemento respecto a las necesidades diarias (ND) (FAO/OMS 2001 y Mercosur 2003).

I.B.1.2.5. Análisis estadístico

Según se detalló en I.A.1.2.5.

I.B.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.B.2.1. Composición proximal y valor nutritivo

La composición proximal de las harinas de nuez (HN y HNDeslip) y de las de referencia, se presenta en la Tabla I.4. Se encontraron diferencias entre harinas para los distintos componentes. El contenido de proteínas de HNDeslip (39,1%) fue similar al de soja (37,4%), y significativamente superior a las de HN (26,9%) y HT (10,1%). En las harinas de nuez, el deslipidizado con disolvente luego del prensado, redujo significativamente el contenido de aceite, de 30,1% en HN a 4,7% en HNDeslip, en tanto que el contenido de lípidos de la HSoy (20,1%), fue elevado en comparación a otras harinas de soja comerciales. El porcentaje de cenizas de las harinas de nuez se encontró entre los valores de las harinas de referencia y dentro de los porcentajes reportados para harinas proteicas de otras fuentes (1,03% - 8,2%) (Quiroga y col., 2000; Abugoch y col., 2009; Sharma y col., 2010). Los hidratos de carbono, representaron el componente mayoritario, con valores que variaron de 36,6% en HSoy a 88,4% en HT.

Desde el punto de vista nutricional, el mayor valor energético en HN (535,5 kcal) proviene, principalmente, de su alto contenido lipídico; seguido por HSoy (477 kcal). En tanto que los valores de HNDeslip y de HT (402,1 y 403,1 kcal, respectivamente) corresponden fundamentalmente al aporte de las proteínas y carbohidratos en HNDeslip y de los carbohidratos en HT.

Tabla I.4: Composición proximal de las harinas de nuez (HN y HNDeslip), trigo (HT) y soja (HSoy), expresada en g/100 g de sólido seco.

Muestra	Proteínas	Aceite	Cenizas	HdeC	VEn kcal
HN	26,90 ^b ± 1,44	30,10 ^c ± 3,86	3,74 ^b ± 0,14	39,3	535,5
HNDeslip	39,10 ^c ± 0,14	4,70 ^a ± 0,28	5,35 ^c ± 0,01	50,9	402,1
HT	10,10 ^a ± 0,71	1,01 ^a ± 0,21	0,50 ^a ± 0,01	88,4	403,1
HSoy	37,36 ^c ± 1,7	20,13 ^b ± 0,03	5,89 ^d ± 0,01	36,6	477,0

Valores medios ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

VEn: valor energético, para su cálculo se consideró carbohidratos totales (contempla la fibra total).

En la Tabla I.5 se presenta el aporte de cada nutriente de las harinas con respecto al valor diario recomendado (VDR). Se desprende de la tabla que el consumo de 100 g de HNDeslip aportaría un 52% de las proteínas diarias necesarias, semejante al aporte de HSoy, en tanto que la HN aportaría un 36%, todos valores superiores al de HT. Por otra parte y debido al elevado contenido en lípidos de HN, el consumo de 100 g de esta harina cubriría el 55% de las necesidades diarias de este nutriente. En todas las harinas el aporte energético total fue inferior al 30%.

Teniendo en cuenta que 100g de HNDeslip aporta menos calorías que HN (20 y 27 kcal, respectivamente), que ambas contienen menor valor energético que la semilla (754,9 kcal) y que cubren menos del 30% de las calorías diarias necesarias, se considera a estas harinas como un alimento proteico, reducido en calorías.

Tabla I.5.: Aporte nutricional de las harinas con respecto al valor diario recomendado.

Nutriente	VDR	%VD (100 g de producto)			
		HN	HNDeslip	HT	HSoy
VEn (kcal)	2000	27	20	20	24
Proteínas (g)	75	36	52	13	50
Lípidos (g)	55	55	9	2	37
HdeC (g)	325	12	16	27	11

VEn: valor energético, para su cálculo se consideró carbohidratos totales.

VDR: valor diario de referencia para cada nutriente.

%VD: porcentaje del valor diario cubierto por cada nutriente, en base a una dieta de 2000 kcal.

I.B.2.2. Fracción proteica

La extracción secuencial y cuantificación de las proteínas solubles permitió determinar que la fracción proteica mayoritaria en la harina de nuez de la variedad Franquette, obtenida mediante prensa a tornillo, correspondió a la de glutelinas, seguida por las globulinas, albúminas y prolaminas. Las glutelinas y globulinas representaron el 92,6% del total de las proteínas (Tabla I.6). Valores similares han sido encontrados por Sze-Tao y Sathe (2000) en mezclas comerciales de las variedades Ashley, Payns y Eureka.

Tabla I.6: Fracciones proteicas de las harinas de nuez deslipidizadas.

Fracción Proteica	PS (g/100g PT)
Albúminas	5,17 ± 0,29
Globulinas	22,62 ± 0,01
Prolaminas	2,26 ± 0,08
Glutelinas	69,95 ± 2,72

PS: Proteínas solubles; PT: Proteína total. Valores medios ± desvío estándar.

En relación a la composición aminoacídica (Tabla I.7) se puede observar que los mayoritarios correspondieron a los aminoácidos hidrófobos y ácidos (40,63% y 27,45%, respectivamente). Estos resultados coinciden con los encontrados por Sze-Tao y Sathe (2000) y Venkatachalan y Sathe (2006) quienes estudiaron los aminoácidos de las proteínas totales de nueces de variedades californianas. En relación al porcentaje de cada aminoácido en la muestra analizada, en general, estuvieron dentro de los rangos de los valores obtenidos por estos mismos autores y por Mao y Hua (2012), excepto para la Serina, que resultó significativamente inferior y la Metionina que superó en casi 6 veces los valores reportados.

De acuerdo al estudio de Mao y Hua (2012), diferencias en los métodos de obtención de las harinas, así como en la preparación de aislados y concentrados proteicos a partir de harina de nuez, pueden provocar no solo diferencias en los porcentajes de cada aminoácido en las muestras, sino también modificaciones químicas en algunos de ellos. De la misma manera, diferencias entre variedades pueden dar lugar a variaciones en la composición aminoacídica de las muestras, como ha sido informado en variedades de almendras (Ahrens y col., 2005); avellanas (Kölsal y col., 2006) y maní (Zhang y col., 2013), entre otras.

Tabla I.7: Composición de aminoácidos en la harina de nuez deslipidizada (g/100g de proteína total, PT)

Aminoácidos	g/100g PT
Ácido aspártico	8,67 ± 0,18
Ácido glutámico	18,78 ± 0,38
Serina	2,74 ± 0,06
Glicina	5,16 ± 0,11
Histidina	2,48 ± 0,05
Arginina	13,21 ± 0,27
Treonina	2,54 ± 0,05
Alanina	4,54 ± 0,09
Prolina	3,92 ± 0,08
Tirosina	2,74 ± 0,06
Valina	4,54 ± 0,09
Metionina	12,59 ± 0,26
Cisteína	0,414 ± 0,002
Isoleucina	3,90 ± 0,08
Leucina	7,02 ± 0,14
Fenilalanina	4,13 ± 0,08
Triptofano	Sd
Lisina	2,64 ± 0,05
Total	100
DAA (%)	
Hidrófobos	40,63
Hidrófilos	13,60
Ácidos	27,45
Básicos	18,32

DAA (%): Distribución de AA - AA Hidrófobos: Ala, Ile, Leu, Met, Fen, Pro, Trp, Val.
 AA Hidrófilos: Ser, Gli, Tre, Tir, Cis - AA Ácidos: Asp, Glu - AA Básicos: Arg, His, Lis.

Desde el punto de vista nutricional (Tabla I.8), y comparando los valores encontrados con los recomendados por la FAO/OMS (1990), las proteínas de nuez contienen los aminoácidos esenciales para niños y para adultos, con altos valores en Metionina, Leucina y

Valina, sin embargo son deficientes para cubrir las necesidades de los niños respecto a Lisina, Fenilalanina y Treonina. Aún así, el índice de aminoácidos esenciales (IAAE), que permite determinar el valor biológico de una proteína, fue elevado (IAAE > 0,8), comparable al de las muestras de soja y trigo, y al de alimentos de origen animal. Teniendo en cuenta estos datos, es posible considerar a las proteínas de nuez dentro del grupo de las de elevado valor biológico (Quaglia, 1991).

Tabla I.8: Aminoácidos esenciales (AAE) en las harinas de nuez (HN y HNDeslip), de trigo (HT) y de soja (HSoy), expresados como g/100g proteína total.

AAE	FAO/OMS (n/a)*	HN y HNDeslip	HT**	HSoy**
Histidina	(1,9/1,6)	2,48	4,10	2,65
Treonina	(3,4/0,9)	2,54	3,25	3,85
Valina	(3,5/1,3)	4,54	4,83	5,19
Metionina	(2,5/1,7)	12,59	1,67	1,35
Isoleucina	(2,8/1,3)	3,90	Ile + } Leu }	12,83
Leucina	(6,6/1,9)	7,02		
Fenilalanina	(6,3/1,9)	4,13	6,08	5,00
Triptofano	(1,1/0,5)	Sd	1,25	1,37
Lisina	(5,8/1,6)	2,64	3,00	6,35
Total AAE	(33,9/12,7)	39,83	37,01	38,84
IAAE (n/a)	1/1	1,2/3,1	1,1/2,9	1,1/3,1
Deficiencia en AAE (n/a)		Lisina, Fenilalanina, Treonina	Lisina/ Metionina	Metionina/ Metionina

* FAO/OMS (n/a): números entre paréntesis corresponden a los valores recomendados de los respectivos AAE para niños (n) de entre 2 y 5 años, y para adultos (a), respectivamente, por FAO/OMS (1990). IAAE (n/a): índice de AAE para niños (n) y adultos (a). **HT y **HSoy: valores obtenidos de Labuckas (2005).

La digestibilidad de las harinas, expresada como porcentaje en relación a la proteína total de la muestra, se presenta en la Tabla I.9. A una relación Enzima:Sustrato (E:S_{PT}) de 1:0,3, tanto las harinas de nuez como las de referencia presentaron un 100% de digestibilidad, en tanto que, a una relación 1:1,5, la proteólisis en medio ácido de las harinas de nuez fue

menor que la de HT y de HSoy. Los valores se encuentran dentro del rango informado por Sze-Tao y Sathe (2000) para la fracción de glutelinas de nuez, hidrolizadas con y sin tratamiento térmico, utilizando pepsina como enzima proteolítica y cuantificada mediante lecturas de la absorbancia a 280 nm.

Al comparar las harinas de nuez entre sí, la digestibilidad de HNDeslip fue mayor que la de HN (92,6 y 85,4%, respectivamente). Esta diferencia se podría atribuir a la desnaturalización térmica de la proteína en HNDeslip, provocada por la temperatura del disolvente (69°C), durante la post extracción, en equipo Soxhlet, del aceite residual.

Tabla I.9.: Digestibilidad *in vitro* de las harinas de nuez (HN y HNDeslip), de trigo (HT) y de soja (HSoy), expresada como porcentaje de digestibilidad (% D)

E:S _{PT}	% D			
	HN	HNDeslip	HT	HSoy
1:0,3	100	100	100	100
1:1,5	85,40 ^a ±1,43	92,60 ^b ±1,47	100,0 ^c ±0,0	100,0 ^c ±0,0

E:S_{PT}= Relación Enzima (pepsina):Sustrato (proteína total). Valores medios ± desvíos estándar. Valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p≤0,05) entre muestras.

El resultado de la electroforesis realizada en geles de poliacrilamida, bajo condiciones nativas (PAGE-nativa), desnaturalizante (PAGE-SDS) y desnaturalizante - reductora (PAGE-SDS-2-ME) se muestra en la Figura I.5. Bajo condiciones nativas (Calle A), se observa una única banda en la parte superior del gel de separación (indicada con una flecha), correspondiente a agregados solubles mediados por puentes disulfuro, ya que la intensidad de esta banda disminuye cuando se realiza el tratamiento con SDS y SDS-2-ME (Calles B y C, respectivamente). Estos tratamientos desnaturalizantes y reductores permiten la migración de las cadenas polipeptídicas en el gel.

Bajo condiciones desnaturalizantes en ausencia de agente reductor (SDS-PAGE) (Calle B), se reconoce un patrón con dos zonas de tinción más intensa, correspondientes a rangos de PM entre 5 – 10 kDa y 40 – 80 kDa y una región intermedia con una serie de bandas tenues.

Como resultado de la reducción de los puentes disulfuro (Calle C), se observa que el total de las proteínas de nuez se compone de numerosos polipéptidos, con un rango de PM

comprendido entre 5 y 200 kDa. Las bandas más intensas correspondieron a las masas moleculares de 5, 20, 34 kDa y tres dobletes entre los 50 y 100 kDa. El patrón polipeptídico es similar al informado por Sathe y col., (2009), para las proteínas de nuez solubilizadas en *buffer* borato de sodio salino (pH 8,45) y corridas bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, en tanto que, las solubilizadas en *buffer* fosfato, pH 7,2 y corridas en idénticas condiciones muestran un perfil significativamente diferente al de la Figura I.5. Calle C. Por otra parte, los perfiles obtenidos por Sze-Tao y Sathe (2000), en la fracción correspondiente a las glutelinas, en geles con gradiente entre 8 y 25% de poli(acrilamida), muestra similitud al obtenido en el presente.

Al comparar los perfiles obtenidos con SDS en ausencia y presencia de 2-ME, se aprecia el efecto del agente reductor en la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a 198 kDa, la aparición de los tripletes comprendidos entre los 50 y 100 kDa y el incremento en la cantidad e intensidad de las bandas de masa molecular inferior a 36 kDa. La banda correspondiente a un PM de 34 kDa (marcada con flecha), no parece alterar significativamente su movilidad electroforética, pero sí su intensidad o concentración, cuando se le agrega 2-ME (Calle C), lo que sugiere que los puentes disulfuro, en este polipeptido, pueden no estar fácilmente accesibles para el agente reductor en la proteína solubilizada en *buffer* fosfato pH 8,0.

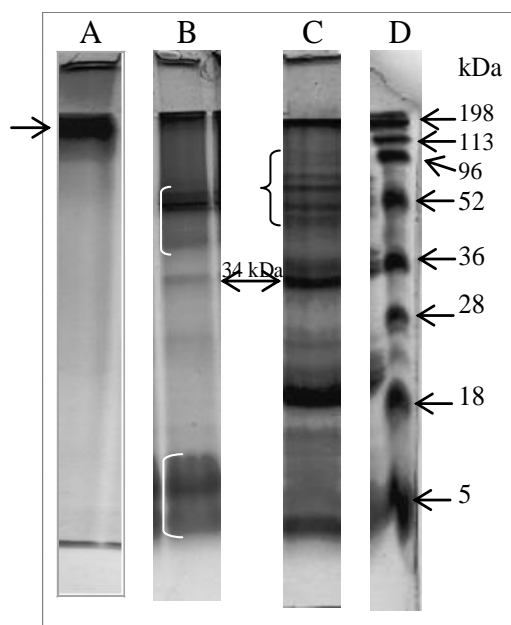


Figura I.5: Perfiles electroforéticos de las proteínas presentes en la harina de nuez. Calle A: PAGE-nativa. Calle B: SDS-PAGE. Calle C: SDS-PAGE-2ME. Calle D: Patrones de peso molecular.

I.B.2.3. Fracción lipídica

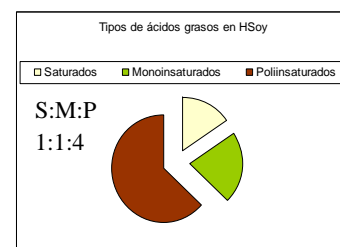
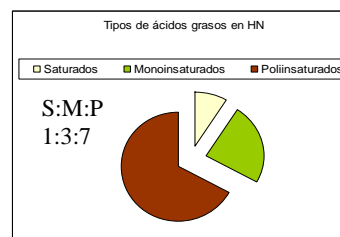
Los ácidos grasos presentes en el aceite residual de la harina de nuez y en el de HSoj se muestran en la Tabla I.10. Los ácidos grasos mayoritarios en la harina de nuez correspondieron a los insaturados (linoleico > oleico > linolénico), seguidos por los saturados (palmítico y esteárico). El perfil fue similar al de la semilla de la cual provinieron (Martínez y col., 2010) y se encuentran dentro del rango informado para la misma variedad de diferentes orígenes, así como de otras variedades de nueces (Amaral y col., 2003, Pereira y col., 2008, Martínez y col., 2010). Al comparar la composición acídica del aceite retenido en HN con el de HSoj, se aprecia que el aceite de nuez posee un contenido significativamente mayor de ácido linolénico y menor porcentaje de los ácidos grasos saturados.

Tanto la relación Insaturados : Saturados, como el índice de yodo del aceite de HN (154,26), superior al del aceite de la HSoj (140,20), pone en evidencia el elevado nivel de insaturación del aceite retenido en la harina de nuez, que lo torna susceptible a la oxidación lipídica.

Desde el punto de vista nutricional, se ha establecido que los lípidos, en una dieta de calidad, deben contener una relación entre ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (S:M:P) de 1:1:1 (Riccardi y col., 2003). Tanto en la HN como en HSoj, la relación encontrada fue superior a la recomendada (Figura inserta). Sin embargo, la relación entre los poliinsaturados linoleico : linolénico (L/Ln), ácidos grasos de la familia “omega-3 y 6”, en la harina de nuez (4:1), es cercana a la relación 5:1, aconsejada en función de los efectos preventivos de las enfermedades cardiovasculares (USDA, 2000; Wheatcroft y col., 2005).

Tabla I.10: Composición y tipos de ácidos grasos del aceite en las harinas de nuez y de HSoy.

Ácido Graso	Harinas de Nuez	HSoy
Palmítico (16:0)	7,08 ^a ± 0,23	11,52 ^b ± 0,95
Estearico (18:0)	2,22 ^a ± 0,04	4,22 ^b ± 0,4
Oleico (18:1)	23,84 ^a ± 1,61	21,19 ^a ± 1,1
Linoleico (18:2)	53,24 ^a ± 1,56	55,77 ^a ± 1,7
Linolénico (18:3)	13,61 ^b ± 0,32	7,3 ^a ± 0,4
<i>Relaciones</i>		
IY	154,26	140,20
Insat/Sat	9,7	5,4
L:Ln	4:1	8:1



Valores medios ± desvío estándar. Valores medios seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras

I.B.2.4. Fracción de cenizas

El contenido de minerales, expresado como mg/100g de sólido seco, se presenta en la Tabla I.11. HN presentó valores inferiores a los de HNDeslip, diferencia atribuida al menor contenido de cenizas y de los elementos minerales en ella.

Entre los macroelementos los mayoritarios fueron el fósforo (P) y el potasio (K) y entre los microelementos el cinc (Zn). Los valores de los minerales encontrados y expresados en relación a la semilla de nuez, en general, son acordes a los hallados en nueces de diversos orígenes y variedades, a excepción del potasio y el calcio, que resultaron inferiores a los informados por Feinberg y col. (1987); Klepping y col. (1989); Ravai (1992); Souci y col. (1994). El valor de Zn, en tanto, fue superior a los valores reportados por Lavedrine y col. (2000) para la var. Franquette.

Desde el punto de vista nutricional, cabe destacar el bajo contenido de sodio (Na) si se lo compara con el nivel de este mineral en las harinas de soja (Singh y col., 2008) y trigo (Pallarés y col., 2007) y los elevados valores de hierro (Fe) y de Zn. Respecto al Na, la FAO/OMS (2004) aconseja limitar su consumo, atento al incremento mundial de las enfermedades cardiovasculares. En cuanto al Fe, los valores indican que se trata de una buena fuente de este elemento, más aún si se considera que en la harina de trigo se debe recurrir a la

fortificación para cubrir el 50% del valor diario (VD) recomendado. El Zn, en tanto se encuentra en auge por los beneficios asociados a la capacidad intelectual. Por otra parte, el consumo de 113 g de HN, o 100 g de HNDeslip, cubrirían las necesidades, a excepción de las de Ca, recomendadas para una dieta basada en 2000 kcal.

Tabla I.11: Minerales en harinas de nuez, expresados en mg/100g de sólido seco, y su aporte a las necesidades diarias.

Mineral	Muestra (100 g)		ND (mg)	% VD	
	HN	HNDeslip		HN	HNDeslip
Na*	0,75 ^a ± 0,04	1,070 ^b ± 0,003	2400 DM	0,03	0,04
K	806,25 ^a ± 42,57	1150,25 ^b ± 3,04	Sd	Sd	Sd
Mg	326,25 ^a ± 17,22	465,45 ^b ± 1,23	260	125,5	179,0
Ca	120,00 ^a ± 6,34	171,20 ^b ± 0,45	1000	12,0	17,1
Cu	2,66 ^a ± 0,14	3,80 ^b ± 0,01	0,9	295,8	422,1
Zn	9,83 ^a ± 0,52	14,02 ^b ± 0,04	7	140,4	200,2
Fe	6,23 ^a ± 0,33	8,88 ^b ± 0,02	14	44,5	63,4
P	809,90 ^a ± 49,09	1154,25 ^b ± 3,43	700	116	165

ND: necesidades diarias (Mercosur 2003 y FAO/OMS 2001). VD: valor diario recomendado para adultos (para una dieta basada en 2000 kcal). * declaración obligatoria en el rotulado de alimentos; DM dosis máxima. Sd: sin datos. Valor medio ± desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras para cada elemento.

*Tanto la HN como la HNDeslip, son fuente de proteínas y de carbohidratos, con bajo contenido en sodio y elevado contenido en hierro, cinc y fósforo, y se las puede considerar como un alimento proteico reducido en calorías. Dentro de la fracción proteica, las glutelinas y globulinas representan el 92,57% de la proteína total; respecto a la composición en aminoácidos, prevalecen los aminoácidos ácidos y los hidrófobos y es deficiente en Lisina, Fenilalanina y Treonina. Las proteínas de la nuez presentan una alta digestibilidad *in vitro* y poseen elevado valor biológico, comparable al de soja, trigo, y alimentos de origen animal (IAAE >0,8). A partir del análisis electroforético de la proteína soluble es posible establecer la diversidad de interacciones entre las cadenas polipeptídicas. En la fracción lipídica, la relación entre los ácidos grasos insaturado/saturados (9:1), pone en evidencia la susceptibilidad a la oxidación, tanto del aceite retenido, como de la muestra que lo contiene o los posibles productos a elaborar con ella, que podría influir en el lapso de aptitud de los mismos.*

I.2. CONCLUSIÓN

Es factible obtener harinas de nuez, parcialmente deslipidizada, a partir de los residuos procedentes de los diversos métodos de extracción (mediante disolvente, por prensado, o mixto) frecuentemente utilizados para reducir el contenido lipídico de numerosas semillas. En la evaluación de las harinas resultantes se encontró que dichos métodos ejercieron efecto en la composición proximal, con el consiguiente incremento del tenor proteico por disminución del contenido lipídico. También se observó que todos los tratamientos ejercieron efecto en la solubilidad proteica, encontrándose que el tratamiento mixto (prensa hidráulica y disolvente) disminuyó la solubilidad de la fracción correspondiente a las globulinas; y que la prensa a tornillo afectó la solubilidad de las albúminas. Tales efectos fueron puestos en evidencia por la modificación de los perfiles electroforéticos de dichas fracciones; en tanto que la fracción correspondiente a las glutelinas, proteínas mayoritarias en la nuez, no fue afectada por los métodos utilizados en la reducción del contenido lipídico.

Estos resultados permitieron seleccionar la prensa a tornillo, y el tratamiento a 50°C, para la obtención de harina de nuez, en la cual se analizaron las propiedades químico-nutricionales, y se compararon con las de dicha harina sometida a una post extracción del aceite remanente con *n*-hexano. Se encontró que, a ambas harinas, se las puede considerar como un alimento proteico reducido en calorías; que, además, aportan ácidos grasos, aminoácidos y minerales esenciales. Además, la digestibilidad fue alta y el valor biológico (IAAE >0,8) de las proteínas presentes en las harinas de nuez fue comparable al de proteínas en alimentos de origen vegetal (soja y trigo). En cuanto a la composición de ácidos grasos del aceite remanente, el análisis mostró el predominio de los insaturados, linoleico y linolénico, lo cual implica que, tanto dicho aceite como las muestras o productos que lo contengan, serán susceptibles a la oxidación.

CAPÍTULO II: PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS HARINAS DE NUEZ PARCIAL Y TOTALMENTE DESLIPIDIZADAS

II.1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades funcionales se pueden definir como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de los componentes de un alimento durante su procesamiento, almacenamiento y consumo” (Kinsella, 1976; Damodaran, 1989). Dado que un sistema alimentario está constituido principalmente por componentes tales como lípidos, proteínas y carbohidratos, en diferentes proporciones, es que puede presentar una amplia gama de propiedades funcionales.

En particular, las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos: a) las dependientes de la interacción proteína-agua; b) las dependientes de las interacciones proteína-proteína y c) las de superficie. Esta clasificación no implica que se establezca un único tipo de interacción, sino que la misma es predominante para ese grupo de propiedades funcionales (Cheftel y col., 1989).

En el grupo dependiente de la interacción proteína-agua, se encuentran las propiedades de adsorción, absorción, solubilidad, viscosidad, entre otras (Pilosof, 2000). Los ingredientes con elevada capacidad de absorción y retención de agua suelen ser empleados para formular embutidos, masas y geles, mientras que productos altamente solubles se utilizan para bebidas y alimentos espumados o emulsionados.

El segundo grupo, en el que predominan las interacciones proteína-proteína, incluye las propiedades de coagulación, gelificación y formación de estructuras (fibras, masas, etc.) (Petruccelli, 1993). En la coagulación, las proteínas desnaturalizadas se agregan al azar, mientras que en la gelificación lo hacen de manera ordenada. Estas propiedades influyen en la elaboración y calidad de productos tales como quesos, yogures, salchichas y masas entre otros.

Dentro del último grupo, en el cual interviene la capacidad de la proteína para difundir hasta la interface (agua-aire o agua-aceite) y formar una película estable, se encuentran las propiedades espumantes y emulsificantes (Wagner, 2000), involucradas en el desarrollo de

diversos alimentos, entre ellos, merengues, mousses, souffles, salsas, cremas, aderezos, helados.

Como se puede apreciar, la funcionalidad de las proteínas es de gran importancia tecnológica y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en ella (Pilosof y Bartholomai, 2000). Por otra parte, también adquiere importancia determinar las propiedades funcionales de sistemas alimentarios conformados por diferentes matrices y, dado que las interacciones intra e intermoleculares que se puedan establecer, en y con el entorno, son las que regirán los valores de tales propiedades, es que resulta de interés evaluar el efecto del medio - pH y fuerza iónica- en dichas propiedades.

En bibliografía existe escasa información sobre las propiedades funcionales de productos de nuez (Mao y Hua, 2012), con lo cual el objetivo del presente capítulo fue caracterizar la funcionalidad de harinas de nuez parcial y totalmente deslipidizada en función del pH y fuerza iónica del medio.

Las propiedades funcionales estudiadas fueron:

Solubilidad

Capacidad de absorción de agua

Capacidad de absorción de aceite

Propiedades emulsionantes

Propiedades gelificantes

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1.- Materiales

El estudio se realizó con harinas de nuez parcial (HN) y totalmente deslipidizada (HNDeslip). A los efectos comparativos, y empleando idénticas condiciones experimentales, se analizaron las propiedades funcionales de harinas comerciales de trigo (HT) y de soja (HSoy) adquiridas en el año 2008 en Córdoba, Argentina. La composición proximal de cada harina se presentó en el Capítulo I, Tabla I.4.

II.2.2.- Métodos

II.2.2.1.- Solubilidad (S)

Según la metodología utilizada por Lawal (2004), con algunas modificaciones: se prepararon suspensiones (1% p/v) en agua destilada (pH “natural”), se agitaron (1h a temperatura ambiente) y centrifugaron (5.500 g, 30 min a 15°C). La proteína soluble (PS) en cada sobrenadante se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995) y la solubilidad (S) se expresó como porcentaje, con respecto a la harina (H) y a la proteína total (PT), según las siguientes ecuaciones:

$$\text{a) } \% S = \frac{100 \times \text{PS}}{\text{H}} \qquad \text{b) } \% S = \frac{100 \times \text{PS}}{\text{PT}}$$

II.2.2.1.a.- Solubilidad en función del pH

Para determinar la S en función del pH se procedió como en II.2.2.1., excepto que a la fase acuosa se le agregó NaOH y/o HCl (0,1 N) para ajustar el pH al valor deseado (rango de pH entre 2 y 10).

II.2.2.1.b.- Solubilidad en función de la fuerza iónica (M)

Para determinar la S en función de la fuerza iónica se procedió como en II.2.2.1., excepto que a la fase acuosa se la reemplazó por solución acuosa de NaCl (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 M).

II.2.2.2.- Capacidad de absorción de agua (CAAg)

La CAAg se determinó según la metodología utilizada por Lawal (2004), con algunas modificaciones: se homogeneizaron 0,1 g de muestra con 1 ml de agua destilada (pH “natural”), con agitación por 30 s, dejados en reposo (30 min) a temperatura ambiente (25°C), luego se centrifugó (3.000 g, 20 min, 25°C), el sobrenadante se retiró y se registró la masa del sedimento. La CAAg (ml/g de sólido seco) se expresó, con respecto a la harina (H) y a la proteína total (PT), según las siguientes ecuaciones:

$$\text{a) CAAg (ml/g H) = (m}_2 - \text{m}_1) / (\text{m}_1 \times \text{D}_a); \quad \text{b) CAAg (ml /g PT) = CAAg / PT}$$

donde m₁ es la masa de harina (g); m₂ es la masa de sedimento (g) y D_a es la densidad del agua (1 g/ml).

II.2.2.2.a.- CAAg en función del pH

Para determinar la CAAg en función del pH se procedió como en II.2.2.2., excepto que a la fase acuosa se le agregó NaOH o HCl (0,1 N) para ajustar el pH al valor deseado (rango de pH entre 2 y 10).

II.2.2.2.b.- CAAg en función de la fuerza iónica (M)

Para determinar la CAAg en función de la fuerza iónica se procedió como en II.2.2.2., excepto que a la fase acuosa se la reemplazó por solución acuosa de NaCl (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 M).

II.2.2.3.- Capacidad de absorción de aceite (CAA)

La CAA se determinó de acuerdo a Lawal (2004), con algunas modificaciones: se homogeneizó 0,1 g de muestra y 1 ml de aceite de girasol, con agitación por 30 s, se dejó en reposo (30 min) a temperatura ambiente (25°C), luego se centrifugó (3.000 g, 20 min, 25°C), el sobrenadante se retiró y se registró la masa de sedimento. La CAA (g/g de sólido seco) se expresó, con respecto a la harina (H) y a la proteína total (PT), según las siguientes ecuaciones:

$$\text{a) CAA (g/g H) = (m}_2 - \text{m}_1) / (\text{m}_1); \quad \text{b) CAA (g/g PT) = CAA / PT}$$

donde m₁ es la masa de harina (g); m₂ es la masa de sedimento (g).

II.2.2.4.- Capacidad Emulsionante (CE): Actividad y Estabilidad Emulsionante (AE y EE)

Según la metodología utilizada por Lawal (2004), con modificaciones: la AE se determinó mediante la homogeneización de la muestra en 5 ml agua destilada (pH “natural”), con agitación por 1 min, y se dejó en reposo (30 min) a temperatura ambiente (25°C), luego se agregaron 5 ml de aceite de girasol (Natura), se homogeneizó (1 min) a temperatura ambiente; se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 25°C) y se midieron las alturas, tanto de la capa emulsionada como la total; los resultados fueron expresados aplicando la siguiente ecuación:

$$AE (\%)= 100 \times [Altura \text{ capa emulsionada} / Altura \text{ total}]$$

Para determinar la EE las emulsiones se prepararon como se indicó anteriormente, luego fueron calentadas en baño termostático (80°C) y centrifugadas (3000 rpm, 10 min, 25°C). Para la expresión de los resultados se aplicó la siguiente ecuación:

$$EE (\%)= 100 \times [Altura \text{ capa emulsionada final} / Altura \text{ capa emulsionada inicial}]$$

II.2.2.4.a.- CE en función del pH

Para determinar la AE y EE en función del pH se procedió como en II.2.2.4, excepto que a la fase acuosa se le agregó NaOH o HCl (0,1 N) para ajustar el pH al valor deseado (rango de pH entre 2 y 10).

II.2.2.4.b.- CE a pH “natural” en función de la concentración

Para determinar la AE y EE en función de la concentración, se trabajó en el rango de concentración entre 2 y 10% p/v y se procedió como en II.2.2.4.

II.2.2.4.c.- CE en función de la fuerza iónica (M)

Para determinar la AE y EE en función de la fuerza iónica se procedió como en II.2.2.4, excepto que a la fase acuosa se la reemplazó por solución acuosa de NaCl (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 M).

II.2.2.5.- Capacidad de Gelificación (CG)

La CG se determinó en un rango de concentraciones (de 2% a 20% p/v), mediante la homogeneización de la muestra en 10 ml agua destilada (pH “natural”), con agitación por 1 min, luego se dejó en reposo (30 min) a temperatura ambiente (25°C); se calentó (1 h) en baño termostático (80°C), se retiró e inmediatamente enfrió en baño (4°C) y se dejó en reposo en cámara (4°C, por 2 h) (Lawal 2004). Para la expresión de los resultados se procedió a inclinar cada tubo hasta invertirlo y observar la falta de deslizamiento o caída del contenido.

LGC = concentración mínima a la cual no se observa deslizamiento o caída del contenido.

La firmeza de los geles se determinó mediante el porcentaje de penetración, por caída libre desde la boca del tubo de ensayo, de un alambre de cobre en el gel. Se consideró gel débil cuando la penetración correspondió a un valor entre 76% y 100%; gel firme entre 46% y 75% y gel muy firme entre 0% y 45%.

II.2.2.5.a.- CG en función del pH

Para determinar la CG en función del pH se procedió como en II.2.2.5, excepto que a la fase acuosa se la reemplazó por solución amortiguadora comercial (*Buffers* de pH 4; pH 7 y pH 10).

II.2.2.5.b.- CG en función de la fuerza iónica (M)

Para determinar la CG en función de la fuerza iónica se procedió como en II.2.2.5, excepto que a la fase acuosa se la reemplazó por solución acuosa de NaCl (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 M).

II.2.2.6.- Análisis estadístico

Según se detalló en I.A.1.2.5. El análisis de correlación se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa InfoStat (versión 1.1).

II.3.-RESULTADOS

La composición proximal de las harinas analizadas en su comportamiento funcional se presentó en la Tabla I.4 del Capítulo I.

II.3.1.- Solubilidad

II.3.1.1.- Solubilidad en función del pH

La importancia de determinar la solubilidad proteica radica en que de ella dependen una serie de propiedades funcionales ya que, según sea la capacidad de las proteínas de permanecer en solución, le conferirán características particulares al producto que las contenga.

La solubilidad proteica (g de proteína soluble/100 g harina) en función del pH se presenta en la Figura II.1a, donde se puede observar que las harinas poseen el típico perfil en “U”, con valores máximos de solubilidad a pHs ácido y alcalino (pH 2 y 10, respectivamente) y mínimos a pH 4 las HN, HNDeslip y HSoj y a pH 6 la HT. Las diferencias encontradas entre las harinas de nuez no resultaron significativas, a excepción de los valores correspondientes a pH 10, donde la solubilidad proteica en HNDeslip fue 1,6 veces superior a la de HN. Por otra parte, la baja solubilidad de la HT en el rango de pH analizado se debe al reducido porcentaje de proteínas presente (10,1%) en relación a las otras harinas.

Al expresar los resultados en función de la proteína total (Figura II.1b), se encontró que a los pHs 2; 6 y 8 los valores de solubilidad de HN fueron superiores ($p \leq 0,05$) a los de HNDeslip. La mayor proporción de proteínas en la muestra deslipidizada (HNDdeslip) presupondría una mayor solubilidad proteica; tendencia que sólo se observó a pH 10. A los pHs 2; 6 y 8, la mayor solubilidad de las proteínas de HN se debería a que parte de los lípidos se asociarían a las proteínas formando complejos lipoproteicos solubles.

A fin de corroborar este supuesto, a una alícuota (1 ml) de las suspensiones (1% p/v, pH 8) de HN y HNDeslip, se le agregaron 50 μ l de Sudán III (colorante rojo liposoluble) preparado al 1% p/v en *n*-hexano. La mezcla se homogeneizó, se retiraron 100 μ l y se observó al microscopio (Leica DM 5000D) bajo iluminación transmitida de campo claro. Se tomaron fotografías (Cámara Leica DFC 490) y la adquisición de imágenes se realizó mediante el programa Leica Application Suite (versión 1.0). Las fotografías correspondientes a las

suspensiones de HN con y sin colorante se presentan en la Imagen II.1. La tinción con Sudan III, permitió visualizar la presencia de lípidos en la fase acuosa, los cuales se presentaron en forma de glóbulos, de diversos tamaños, aislados o agrupados. La presencia de estos glóbulos lipídicos, asociados a la proteína, principalmente glutelinas, de mayor carácter lipofílico, explica la mayor concentración de proteínas observada en la fase acuosa en HN.

En HNDeslip, en tanto, la menor solubilidad se vincula al mayor contenido de compuestos polifenólicos, provenientes del tegumento, que pueden formar complejos insolubles con las proteínas disminuyendo su solubilidad.

Las harinas de referencia (HSoy y HT) presentaron alta solubilidad proteica tanto a pH básico como ácido, característica importante para la formulación de alimentos (Idouraine y col., 1991). El mayor contenido de aminoácidos básicos (Lisina, Arginina e Histidina) en las harinas de soja (Meriles, 2002) y de trigo (Primo Yúfera, 1979) en comparación con las de nuez, explica la mayor solubilidad proteica, a pH ácido, encontrada en estas harinas.

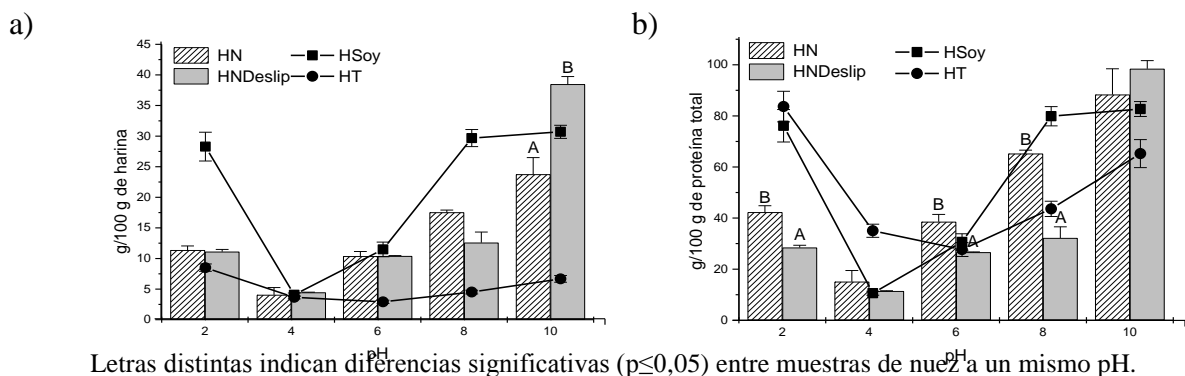


Figura II.1: Proteínas solubles (PS) en función del pH, expresadas como a) g de PS/100 g de harina y b) g de PS/100 g de proteína total.

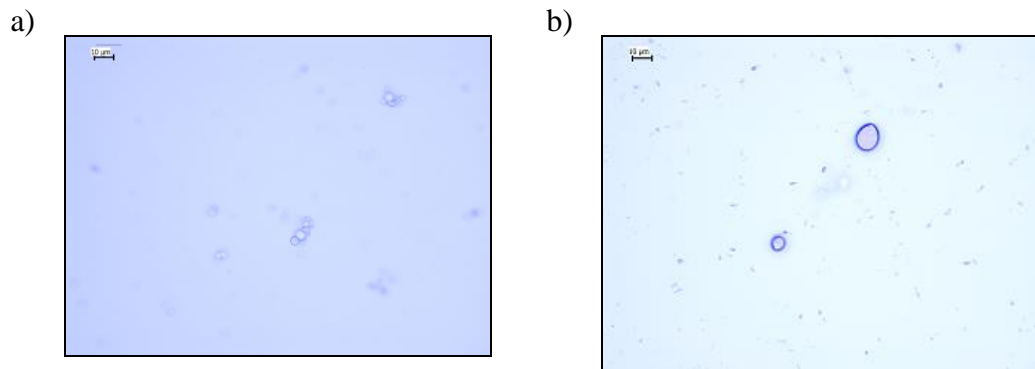


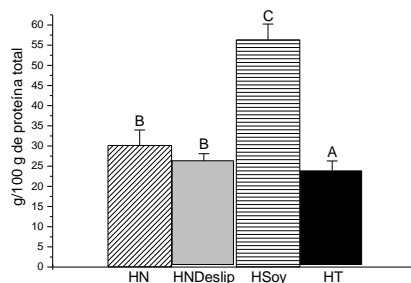
Imagen II.1: Microimágenes (40x) correspondientes a suspensiones (1% p/v, pH 8) de HN sin (a) y con (b) colorante liposoluble (Sudan III).

II.3.1.2.- Solubilidad en función del pH “natural”

El valor de pH “natural” tanto para HN y HNDeslip (6,5) fue intermedio al encontrado en HT y HSoy (5,3 y 6,8, respectivamente) y similar al rango informado para otras harinas (Chau y Cheung, 1998).

A pH “natural” no hubo diferencias en la cantidad de proteína soluble entre HN y HNDeslip (Figura II.2). Estos resultados muestran que la presencia de lípidos, propios de la harina, ejerce un efecto favorable en la solubilidad proteica, y ponen en evidencia la existencia de interacciones entre lípidos y proteínas, así como el carácter lipofílico de las proteínas de nuez.

Debido al tipo de proteínas mayoritarias en las harinas de nuez y HT, constituidas principalmente por glutelinas, la solubilidad proteica fue significativamente menor a la HSoy, cuya fracción proteica mayoritaria corresponde a las globulinas.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

Figura II.2: Proteínas solubles (PS) a pH “natural”, expresadas como g de PS/100 g de proteína total.

II.3.1.3.- Solubilidad en función de la fuerza iónica

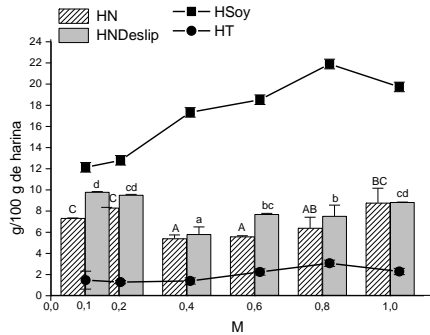
La solubilidad proteica de las harinas en el rango de molaridad ensayada se muestra en la Figura II.3a. Los bajos valores encontrados en las harinas de nuez y trigo (< 10 g/100 g de harina) se debe al bajo porcentaje de proteínas (HT) y al reducido contenido en albúminas y globulinas de estas harinas en comparación con la HSoy.

Los resultados en relación a la proteína total (Figura II.3b), muestran mayor solubilidad de las proteínas en HSoy y HT en comparación con las harinas de nuez. En estas harinas un incremento en la concentración de NaCl de 0,1 a 0,8 M, mejora la solubilidad proteica. A mayor concentración de sal (1,0 M), el agua presente se une a los iones salinos causando deshidratación de la proteína y reducción en la solubilidad. Por el contrario, las harinas de nuez presentan un perfil en U, con los menores valores de solubilidad en el rango de molaridad entre 0,4 y 0,8 M. Este comportamiento puede deberse, por un lado, al efecto de la sal para promover interacciones hidrófobas dentro y entre las proteínas lo que conduce a la agregación proteica, y/o a la presencia de componentes no proteicos (principalmente fenoles) que podrían interactuar con las proteínas, por medio de interacciones hidrofóbicas y alterar la solubilidad proteica.

Nuevamente, y al igual con lo que ocurre con la solubilidad proteica a diferentes pHs (Figura II.1b), hay una tendencia en la HN (con mayor contenido de lípidos), de presentar mayor solubilidad proteica que HNDeslip, en las distintas fuerzas iónicas ensayadas (Figura II.3b). Estos resultados indican la existencia en HN de interacciones de tipo hidrofóbica entre los lípidos de la muestra y las glutelinas, lo que determina una mayor disponibilidad de las globulinas para interactuar con los iones salinos y con el agua.

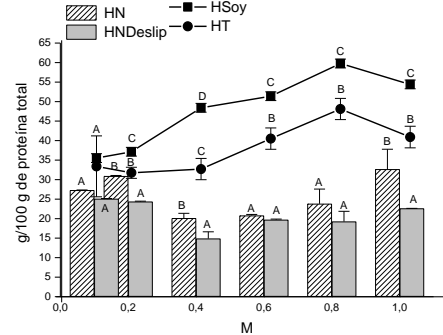
Los valores y perfiles encontrados en HNDeslip difieren de lo reportado por Sathe y col. (2009), quienes estiman la solubilidad proteica de harina deslipidizada de nuez en función de la fuerza iónica del medio (de 0,2 a 4,0 M), mediante técnicas colorimétricas (Lowry y Bradford) y encuentran que ambas técnicas sobrestiman el contenido de proteína soluble, siendo los compuestos fenólicos los principales responsables de dicha sobrestimación.

a)



Letras mayúsculas y minúsculas distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre molaridades para HN y HNDeslip, respectivamente.

b)



Letras distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre harinas.

Figura II.3: Proteínas solubles (PS) en función de la fuerza iónica (M), expresadas como: a) g de PS/100 g de harina y b) g de PS/100 g de proteína total

II.3.2.- Capacidad de absorción de agua (CAAg)

La CAAg es la habilidad de un material alimenticio para retener agua, la propia y la agregada, durante la aplicación de fuerzas y/o calor (Zayas, 1997). Esta propiedad depende principalmente del contenido y el nivel de hidratación de la fracción insoluble de una matriz proteica. Se ha establecido que los aislados con una mejor solubilidad exhiben una reducida capacidad de retención de agua, debido a que contienen una baja proporción de la fracción proteica insoluble (Petruccelli y Añon, 1994; Wagner y col., 2002; Bernardino-Nicanor y col. 2005). Otros factores relacionados a la muestra, que influyen en esta propiedad son, la cantidad y tipo de proteínas presentes (Chau y Cheung, 1998; Fasasi., 2009; Eltayeb, 2010), la composición aminoacídica, la relación de superficie polar/hidrofóbica (Barbut, 1999), la presencia de lípidos (Sathe y col., 1982; Adebowale y col., 2005; Tang, 2007) y de carbohidratos (Granito y col., 2004; Fasasi, 2009).

La fracción proteica del residuo de extracción del aceite de nuez, presenta un alto porcentaje de glutelinas (70%) (Capítulo I.B.2.2. y Sze-Tao y Sathe, 2000). Las mismas son proteínas globulares, hidrófobas y con un mayor porcentaje de residuos apolares, en relación a las otras fracciones proteicas. La mayor proporción de estas proteínas en una matriz condiciona en gran medida su CAAg.

Respecto a los factores relacionados al medio, y que modifican la CAAg, se pueden mencionar el pH, la fuerza iónica y la temperatura, entre otros. Por ejemplo, cambios en el

pH, afectan la ionización proteica y la magnitud de las cargas netas en las moléculas influye en las fuerzas de atracción y de repulsión dentro de las proteínas y su habilidad para asociarse con el agua (Damodaran, 1997). En relación a la presencia de sales neutras en el medio, puede ocurrir un aumento en la solubilidad o precipitación de las proteínas dependiendo de la concentración de la sal.

La CAAg tiene efecto en la apariencia y comportamiento de los alimentos (Ramírez y Delahaye, 2009), así como en la textura y aroma (*flavors*) de los mismos. Es considerada una propiedad funcional fundamental en alimentos viscosos, donde se requiere una buena interacción componente-agua, tales como embutidos, salsas, sopas, masas y productos horneados; así como también en los productos tipo postre, bebidas instantáneas, yogurt y helados (Granito y col., 2004; Ramírez y Delahaye, 2009).

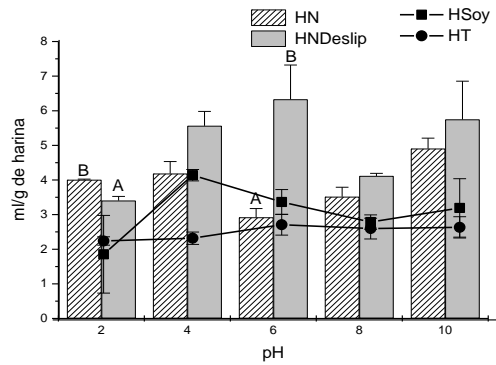
Dada la importancia de esta propiedad funcional se determinó la capacidad de absorción de agua de las harinas, en función del pH y fuerza iónica del medio.

II.3.2.1.- CAAg en función del pH

La CAAg de las harinas en función del pH y expresado en relación a la muestra, se presenta en la Figura II.4. Los valores máximos y mínimos para HN, se encontraron a pHs 10 y 6, respectivamente, en tanto que para HNDeslip, fueron a pHs 6 y 2, respectivamente. Las diferencias fueron significativas únicamente a pH 2 y 6 y se pueden atribuir a la competencia, entre los componentes, por el agua disponible; así como también a las interacciones electrostáticas entre las cargas de los componentes de la muestra a un pH determinado.

A valores de pH entre 4 y 10, se observó una tendencia de la HN a presentar una menor CAAg que la HNDeslip. En la HNDeslip, el mayor contenido de componentes hidrófilos, como proteínas (con mayor proporción de la fracción proteica insoluble) y carbohidratos, aumenta la posibilidad de establecer uniones con el agua. Por el contrario, la presencia de un mayor contenido de aceite (30%) en HN, incrementa la hidrofobicidad del medio, lo que conduce a una mayor interferencia en la relación de componentes, y/o sitios hidrófilos, con el agua.

En las muestras de referencia, HT y HSoy, la máxima CAAg, encontrada a pH 6 y 4, respectivamente, se atribuye a la presencia de proteínas en su *pI*, y a la de carbohidratos hidrófilos, como almidón y pentosanos en HT, y oligosacáridos en HSoy.

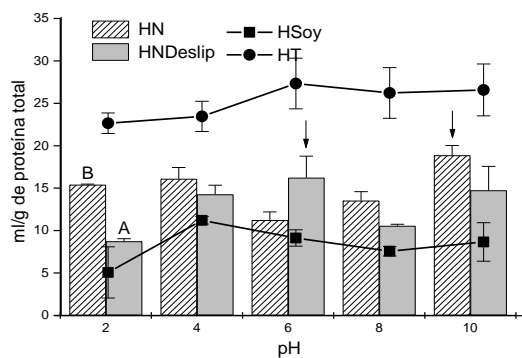


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las harinas de nuez a un mismo pH.

Figura II.4: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función del pH

Al analizar la CAAg vs pH, en relación a la proteína total, los mayores valores ($p \leq 0,05$) se encontraron en HT a lo largo de todo el rango de pH ensayado (Figura II.5). La baja solubilidad debido al carácter hidrofóbico de las proteínas mayoritarias de la HT explica este comportamiento. En la HSoy, el mayor contenido en albúminas y globulinas, en relación a las fracciones hidrófobas, se reflejó en una menor capacidad de esta harina de absorber agua, en comparación con las harinas de nuez, cuyas glutelinas contribuyen en gran medida a la CAAg.

Al comparar las dos harinas de nuez, solo se encontró diferencia a pH 2, donde el valor de HN duplicó a la de HNDeslip (15,4 y 8,7 ml/g PT, respectivamente).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las harinas de nuez a un mismo pH.

Figura II.5: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función del pH, expresada como ml/g de proteína total.

II.3.2.2.- CAAg en función del pH “natural” (CAA_{gN})

La CAA_{gN} de la HNDeslip (4,91 ml/g) y HN (3,3 ml/g) superaron a los valores de las harinas de referencia (HSoy y HT) (Figura II.6a). Los valores en las harinas de nuez, (> a 3 ml/g), son similares a los informados para aislados, concentrados y harinas, parcial y totalmente deslipidizadas, obtenidas de diversas fuentes (Sathe y col., 1982; Granito y col., 2004, Adebowale y col., 2005; Tang, 2007; Abugoch y col., 2009).

La mayor capacidad de absorción de agua de HNDeslip, respecto a HN, se debería a un complejo conjunto de factores, entre ellos:

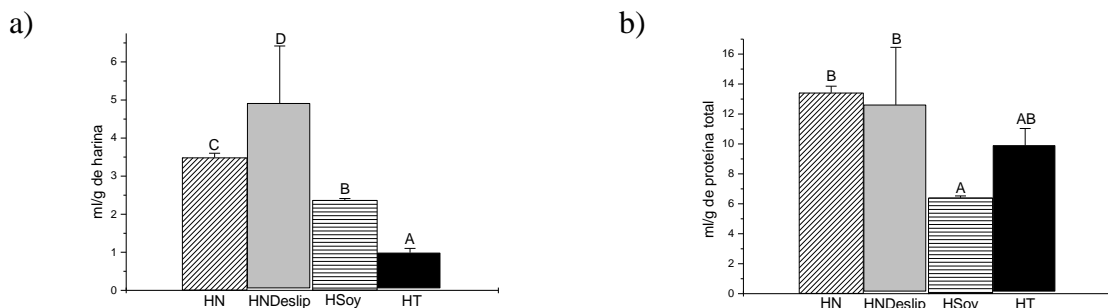
a) mayor contenido de proteínas y mayor proporción de proteínas de naturaleza lipofílica, glutelinas en su mayoría, que expondrían sus aminoácidos polares, con afinidad por el agua, bloqueados en HN por un entorno lipídico;

b) mayor proporción de carbohidratos, de naturaleza hidrófila, con capacidad de gelificación e hinchamiento;

c) y por último, mayor presencia de compuestos fenólicos ionizados a pH “natural”, principalmente, fenoles ácidos y taninos condensados, con capacidad de establecer puentes hidrógeno con el agua (Prasad, 2003; Colaric y col., 2005).

Sin embargo, cuando los resultados son expresados en función del contenido de proteínas presentes (Figura II.6b), no se observan diferencias significativas entre las muestras de nuez (13,43 y 12,62 ml/g de proteína total, para HN y HNDeslip, respectivamente), indicando que la proteína no se ve afectada en su CAA_{gN} luego del deslipidizado.

Al comparar los resultados, expresados en función de la proteína total, de las harinas de nuez con los de las de referencia (Fig II.6b), la mayor CAA_{gN} de HN, HNDeslip y HT se atribuye al tipo de proteínas mayoritarias, con predominio de glutelinas, de mayor carácter hidrófobo que las albúminas y globulinas de la HSoy.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

Figura II.6: Capacidad de absorción de agua (CAA_g) a pH “natural”, expresada como: a) ml de agua/g de harina y b) ml de agua/g de proteína total.

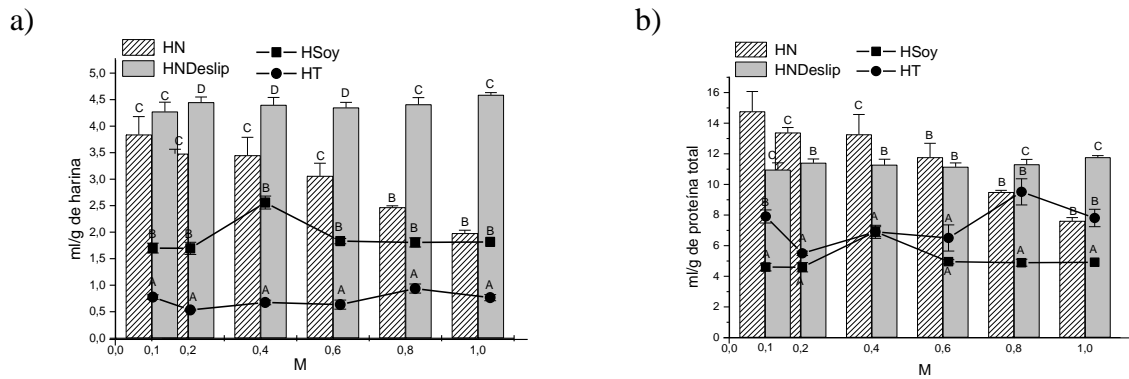
II.3.2.3.- CAAg en función de la fuerza iónica (M)

En la Figura II.7a se muestra la CAAg de las harinas en función de la fuerza iónica del medio. La CAAg en la HT fue significativamente menor a la de las otras harinas y al igual que HNDeslip, no varió a lo largo del rango de molaridad ensayada. Al comparar las harinas de nuez entre sí, se observa que la CAAg de HNDeslip fue mayor que la de HN, y que la diferencia se acentúa conforme aumenta la fuerza iónica del medio.

A pesar que, en general, las proteínas disminuyen su hidratación cuando la fuerza iónica del medio es superior a 1,0 M, en HN (con presencia de lípidos asociados a las proteínas), únicamente a baja concentración (0,1 M), los iones salinos, unidos a los grupos cargados de las proteínas, favorecen la hidratación. A medida que la molaridad aumenta, el agua existente se une a los iones salinos lo que conduce a la deshidratación de la proteína y reducción en su capacidad para absorber agua. Por otra parte, la presencia de mayor porcentaje de lípidos en esta matriz determina un mayor entorno hidrofóbico y, consecuentemente, menor contenido de componentes capaces de establecer interacciones con los iones y con el agua.

En ausencia de lípidos (HNDeslip), la superior CAAg, en comparación con la de HN, se debe, en primer lugar al mayor porcentaje de componentes de naturaleza hidrofílica (proteínas y carbohidratos) y por otro a una mayor estabilidad de las interacciones que se establecen entre los residuos cargados de las proteínas y los iones Cl^- y Na^+ en el rango de molaridad ensayado.

Al expresar la CAAg en función de la proteína total (ml/g PT) (Figura II.7b), se observan perfiles semejantes al encontrado en relación a la harina, lo que indica la participación de las proteínas de las distintas muestras en esta propiedad funcional.



Letras distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre muestras a una misma molaridad

Figura II.7: Capacidad de absorción de agua (CAAg) de las harinas en función de la fuerza iónica del medio (M) expresado como a) ml de agua/g harina y b) ml de agua/g de proteína total.

En general, tanto la HN como HNDeslip, mostraron una buena CAAg, superior en muchos casos a la encontrada en las harinas de referencia y serían aptas para incorporarlas en la formulación de productos de panificación, pastas, salsas y sopas.

II.3.3.- Capacidad de absorción de aceite (CAA)

La CAA es producto del atrapamiento de las grasas por parte de la matriz y está determinada por la estructura de las proteínas presentes, la disposición de los aminoácidos dentro de la estructura proteica, por la presencia de almidones y por el tipo de grasa (Kinsella, 1976). Esta capacidad de las harinas de enlazar lípidos es muy importante para la formulación de productos para freír y para retener sabores (Sathe, 2002) e influye en las características de textura y palatabilidad de los productos alimenticios (Kinsella, 1979; Adebowale y col., 2005).

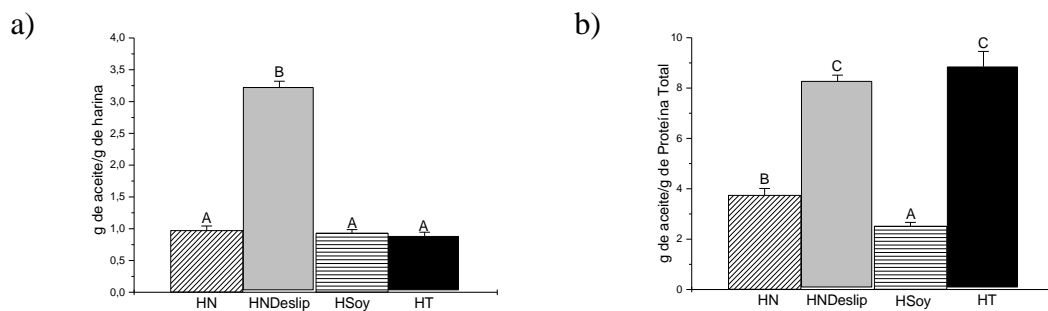
Los datos obtenidos indican que la CAA de HN (0,97 g/g muestra) fue similar ($p \leq 0,05$) a la encontrada en HT (0,89 g/g muestra) y en HSoy (0,93 g/g muestra) e inferior a la de HNDeslip (3,23 g/g muestra) (Figura II.8a).

En la HN (con un contenido lipídico del 30%) las proteínas, asociadas a los lípidos de la muestra, reducen la cantidad de sitios de baja polaridad disponibles para la interacción con el aceite agregado, y con ello la capacidad de absorción. Al extraer un mayor porcentaje de aceite de la harina (HNDeslip) aumenta el porcentaje de proteínas y así, los sitios hidrofóbicos

de las cadenas laterales de las proteínas, previamente bloqueados en un entorno lipídico, quedan expuestos, lo que conduce a un aumento en la CAA mediante uniones asociativas. Tendencias similares han sido informadas para harinas, con y sin lípidos, del género *Mucuna* (Adebowale y col., 2005); concentrados, con y sin lípidos de Lupino (Sathe y col., 1982); harinas, concentrados y aislados, de girasol y de soja (Lin y col., 1974).

La baja CAA de HSoy y HT se debe, en el caso de HSoy al tipo de proteínas mayoritarias en esta matriz y en HT al bajo porcentaje de proteínas de la muestra (10%) (Tabla I.4)

Al expresar los resultados en relación a la proteína total (PT) (Figura II.8b) se encontró que la CAA dependió de la matriz, HT y HNDeslip superó a la de HN y HSoy. Las diferencias se atribuyen al contenido de aceite propio de la muestra y al tipo de proteínas presente. Los valores registrados en las harinas con mayor contenido lipídico (20% en HSoy y 30% en HN) explican la menor incorporación de aceite por parte de las mismas. En tanto que la CAA de las harinas con menor contenido lipídico (HT y HNDeslip) pone de manifiesto, por un lado, la mayor disponibilidad de sitios apolares para establecer interacciones no covalentes con el aceite agregado y por otro el carácter hidrofóbico de las proteínas mayoritarias que las constituyen (Sathe y col., 1982; Lin y col., 1974).



Letras distintas indican diferencias entre muestras ($p \leq 0,05$)

Figura II.8: Capacidad de absorción de aceite (CAA) de las harinas de nuez, trigo y soja expresada en: a) g de aceite/g de harina y b) g de aceite/g de proteína total.

El deslipidizado de la harina de nuez mejora la CAA, aún así, ambas harinas serían aptas para retener/atrapar sabores y podrían ser utilizadas como ingredientes para la formulación de alimentos (salsas, embutidos, sopas, masas, productos de panadería, entre otros) en los que esta propiedad es fundamental.

II.3.4.- Capacidad emulsionante (CE): Actividad y estabilidad emulsionante (AE y EE)

Las emulsiones son mezclas inestables de líquidos inmiscibles (agua y aceite), de los cuales uno se encuentra como gotas dispersas en el otro (fase continua). La formación y estabilidad de una emulsión es importante en algunos sistemas alimenticios y las proteínas y carbohidratos suelen jugar un papel preponderante en las mismas. Las proteínas, al poseer propiedades anfotéricas, pueden orientar los aminoácidos apolares hacia la fase lipídica y los hidrófilos hacia la fase acuosa de las gotas emulsionadas y de esta forma reducir la tensión superficial de la interfase (Cheftel y col., 1989; Yu y col., 2007). En la interfase, las proteínas interactúan entre sí para formar una película que rodea cada gota y el tipo de interacciones entre las moléculas proteicas define las propiedades de la película interfaseal y la estabilidad de la emulsión. Por otra parte, la presencia de carbohidratos favorece la estabilidad de las emulsiones al aumentar la viscosidad de la fase acuosa (Cheftel y col., 1989).

Numerosos son los factores que influyen en las propiedades emulsionantes en los sistemas alimenticios; entre ellos el pH, la fuerza iónica y la concentración de la muestra suelen ser determinantes para la formación y estabilidad de las mismas. En relación al pH del medio, se ha reportado que en general existe una correlación positiva entre la capacidad emulsionante y la solubilidad proteica, mientras que otros autores no encuentran una relación entre estas dos propiedades (Aoki y col., 1980; Voutsinas y col., 1983). La concentración de la muestra también juega un papel importante en esta propiedad, ya que en algunos sistemas son necesarias altas concentraciones de proteína para la formación de una película interfaseal que tenga el espesor y propiedades deseadas. Otro factor que influye en la formación y estabilización de emulsiones es la presencia y concentración de lípidos en la muestra (Sathe y col., 1982; Tang, 2007).

Con el objetivo de evaluar las propiedades emulsionantes de las harinas se prepararon emulsiones aceite/agua (O/W) y se analizó el comportamiento de las mismas en relación al medio (pH y fuerza iónica) y a la concentración de la muestra.

II.3.4.1.- CE en función del pH

Los resultados encontrados en las harinas de nuez (HN y HNDeslip) y soja (HSoy) (Figura II.9a) presentan perfiles de AE dependientes del pH y relacionados con la solubilidad proteica (Figura II.1). En estas harinas la mínima AE correspondió al pI de la proteína (pH 4)

y la máxima a pH 10 en las harinas de nuez y a pHs distintos al pH isoelectrico en HSoj (sin diferencias significativas entre ellas). Estos resultados coinciden con los informados por otros investigadores (Sathe y col., 1982; Lawal, 2004; Sangronis y col., 2004; Adebawale y col., 2005; Tang, 2007; Ogunwolu y col., 2009), quienes encuentran que en el pI, las proteínas de los alimentos son muy poco solubles, se hallan pobremente hidratadas y carecen de fuerzas electrostáticas repulsivas, con lo cual su capacidad emulsionante es pobre. Sin embargo, estas proteínas pueden ser emulsionantes eficaces cuando se alejan de su pH isoelectrico. A valores de pHs por arriba y por debajo del pI, la mejora de la AE se debe a un aumento de las repulsiones electrostáticas entre moléculas proteicas, incremento de la solubilidad y migración del seno de la solución a la interfase, donde se adsorben y reducen la energía interfasial.

La significativamente baja AE en las harinas de nuez en relación a la de soja ($p \leq 0,05$), a valores de pHs distintos al del pI, se atribuye también al tipo de proteína mayoritaria presente en cada matriz. Las harinas de nuez con alto contenido en glutelinas, presentan menor cantidad de proteínas capaces de solubilizarse, migrar hacia la interfase y generar una película interfasial. Los valores encontrados en la HNDeslip fueron inferiores a los reportados por Mao y Hua (2012). Variaciones en el método de deslipidizado y preparación de la emulsión, así como un mayor contenido proteico (52,5%) en la harina de nuez utilizada por estos autores, en relación a la HNDeslip, explicarían estas diferencias.

Resultados opuestos se encontraron con las emulsiones preparadas con la HT. El bajo contenido de proteínas y la baja solubilidad de las mismas (Figura II.1), condiciona en gran medida los valores de AE, menores al 10% en todo el rango de pH (Figura II.9a).

El análisis de correlación entre la solubilidad proteica (SP) y la AE (Tabla II.1) confirman estos resultados, con coeficientes de correlación positivos para HN, HNDeslip y HSoj y negativo para HT.

Al comparar las harinas de nuez entre sí, se encontró que los valores de AE presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a pHs 6 y 8, lo cual sugiere que los lípidos propios de la nuez ejercen algún tipo de efecto en la actividad emulsionante, y que el mismo es dependiente del pH. Además, y dado que las diferencias en la AE a los pHs 2 y 10 no fueron significativas y que, aunque la concentración proteica en HN es 1,5 veces menor que en HNDeslip, esas proteínas estarían en cantidad suficiente y disponibles para formar emulsiones a valores de pHs extremos.

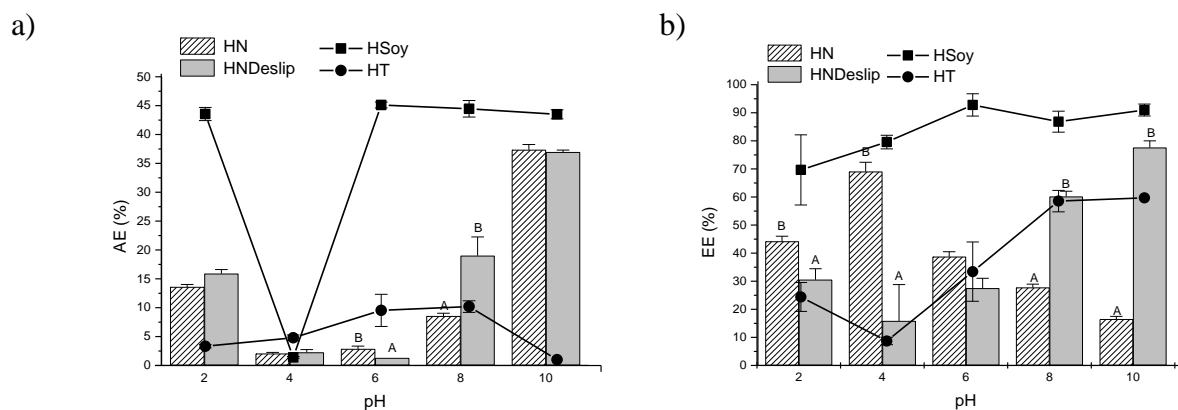
En relación a la estabilidad de las emulsiones (Figura II.9b), la de H_{Soy} mostró la mayor estabilidad ($p \leq 0,05$), tendencia comparable a la informada por otros autores (Chau y Cheung, 1998; Tang, 2007). Las emulsiones formadas con la HT presentaron la mayor estabilidad (60%) a pH alcalino (pH 8 y 10) y no hubo en estas harinas correlación entre la EE y la solubilidad proteica (Tabla II.1).

Al analizar las harinas de nuez, las diferencias en los coeficientes de correlación entre la solubilidad proteica y la EE (- para HN y + para HNDeslip) (Tabla II.1), estarían indicando la existencia de otros factores involucrados en la estabilización, como la presencia de aceite en la muestra, la disponibilidad proteica, el grado de desnaturalización de las proteínas y posiblemente la presencia y concentración de compuestos fenólicos en cada matriz. Por ejemplo, la mayor EE en HNDeslip a pHs alcalinos sugiere que en ausencia de lípidos, y debido al calentamiento (80°C), las proteínas se despliegan, los residuos hidrofóbicos localizados en el interior de las proteínas quedan expuestos, se reordenan y tienden a interactuar mejor con la fase lipídica de la interfase, estabilizándola. Por otra parte, con la temperatura aumenta la viscosidad, debido a la hidratación e hinchamiento de los hidratos de carbono presentes, lo que retarda la coalescencia. La menor estabilidad de la emulsión de HN, a pH 10, sería atribuida a la menor cantidad de proteína disponible, en la interfase, para la interacción proteína-lípido. Además, el contenido de hidratos de carbono en esta matriz no sería suficiente para retardar la coalescencia. La menor estabilidad a pH alcalino sería también atribuida al efecto de los fenoles.

A pH ácido, la menor EE de HNDeslip se vincula a un aumento en las interacciones entre las gotas emulsionadas, debido a una disminución de la carga neta de las proteínas, por la presencia, en el medio, de iones Cl^- .

Por otra parte, las diferencias en los coeficientes de correlación entre AE y EE de HN y HNDeslip (0,90 y - 0,71, respectivamente) (Tabla II.1) es un indicio de que los mecanismos que estabilizan las emulsiones en HN son diferentes a los de la AE.

Respecto a la mejor relación AE:EE, se encontró que para HN fue a pH 2 (AE:EE 13,6:44,2), en tanto que para HNDeslip, fue a pH 10 (AE:EE 36,9:77,6).



Letras distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre harinas de nuez a un mismo pH.

Figura II.9: Capacidad emulsionante de las harinas en función del pH, a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE)

Tabla II.1: Coeficientes de correlación entre solubilidad proteica y actividad emulsionante (SP-AE); solubilidad y estabilidad emulsionante (SP-EE) y actividad y estabilidad emulsionante (AE-EE)

Harinas	SP-AE	SP-EE	AE-EE
HN	0,83 ^a	-0,94 ^a	-0,71 ^a
HNDeslip	0,90 ^a	0,85 ^a	0,90 ^b
HSoy	0,74 ^a	-0,01	0,25
HT	-0,67 ^b	0,14	0,12

Ref: a) 1% de significancia – b) 5% de significancia

II.3.4.2.- CE a pH “natural” en función de la concentración

La AE de las harinas a pH “natural”, en función de la concentración se observa en la Figura II.10a. El comportamiento de las emulsiones preparadas con las harinas de nuez fue similar al registrado con la HT. En las tres muestras, un aumento en la concentración incrementa el contenido de proteínas solubles en la fase acuosa, lo cual favorece la difusión hacia la interfase y la integración de la proteína en ella. Por la misma razón, los valores de HNDeslip superiores a los de HN en todo el rango de concentración analizado ($p \leq 0,05$), es debido a la mayor proporción de proteína en dicha muestra. Tendencias similares fueron encontradas en emulsiones de muestras diversas informadas por otros investigadores (Lawal, 2004; Adebawale y col., 2005; Tang, 2007; Yu y col., 2007).

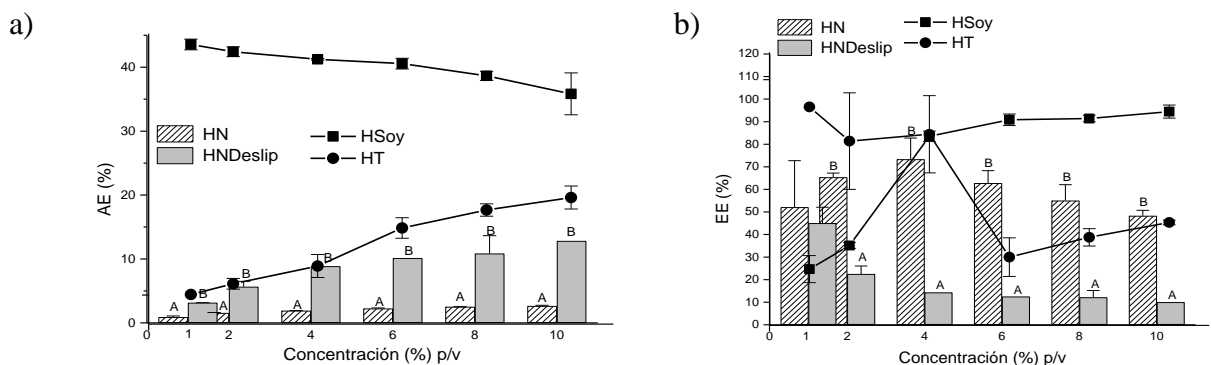
En las emulsiones preparadas con HSoy, los valores de AE superaron ($p \leq 0,05$) a los de las harinas de nuez y trigo, en todas las concentraciones ensayadas, pero con un perfil inverso,

es decir se registró una disminución de la AE (de 43,1 a 34,6%), con el aumento de la concentración de la muestra. A baja concentración proteica, la adsorción de la proteína en la interfase O/W es, en esta matriz, dependiente de la difusión de la misma. A concentraciones crecientes, las barreras de activación energética impiden la migración de la proteína a la interfase, y explican en parte la disminución de la AE. Sze-Tao y Sathe (2000), encontraron un comportamiento similar en emulsiones preparadas con aislados de soja en concentraciones que variaron entre 0,1 y 1,0% p/v.

Respecto a la EE (Figura II.10b) se observa que los perfiles de las muestras son diferentes; en las harinas con bajo contenido en aceite (HT y HNDeslip), disminuye con el incremento de la concentración, en tanto que en HSoy se observa un comportamiento inverso. Por otra parte, en el rango de concentración entre 2 y 10% p/v, las emulsiones de HN son más estables que las de HNDeslip ($p \leq 0,05$).

En HN, (con AE inferior al 3%), los valores de EE fueron superiores al 45%, con un máximo (73% EE) al 4% p/v. Estos valores son comparables a los informados para aislados de *Parkia biglobosa* por Lawal (2004). Dicho autor encontró un incremento de la EE con el aumento de la concentración, desde 1% hasta 4% (p/v), y luego una disminución con posteriores incrementos. Este comportamiento lo atribuyó a que a partir del 1% p/v, la cada vez mayor concentración de proteínas solubles facilita la interacción con la interfase hasta que, a concentraciones del 4% p/v y superiores, la disminución de la EE es debida a una mayor interacción proteína-proteína en detrimento de la proteína-interfase.

El comportamiento de HNDeslip, se puede también atribuir al mayor contenido proteico de esta harina, por lo que aumenta la interacción proteína-proteína a expensas de la proteína interfase, disminuyendo la EE con incrementos en la concentración de la muestra.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre harinas de nuez a una misma concentración.

Figura II.10: Capacidad emulsionante de las harinas a pH "natural" en función de la concentración a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE)

Al comparar los perfiles de AE y EE surge que la capacidad emulsionante depende de la matriz, y a la vez, que las interacciones necesarias para la actividad emulsionante son diferentes a las de la estabilidad.

Dado que, en HN y HNDeslip, se observa una relación entre los valores de AE y el incremento de la concentración de las muestras, y que los valores de AE de HN son inferiores a los de HNDeslip, se pone en evidencia que el menor contenido proteico y la presencia de lípidos presentes en HN afectan negativamente la capacidad de formar emulsiones.

Respecto a la EE, se observa una relación de dependencia de los valores con la concentración, por un lado, y por otro, con los componentes de la muestra. Esto último debido a que los mayores valores de EE se encontraron en la harina con mayor contenido lipídico (HN). A diferencia de lo que ocurre con la AE, la presencia de lípidos en la muestra favorece la estabilidad de la emulsión.

II.3.4.3.- CE en función de la fuerza iónica (M)

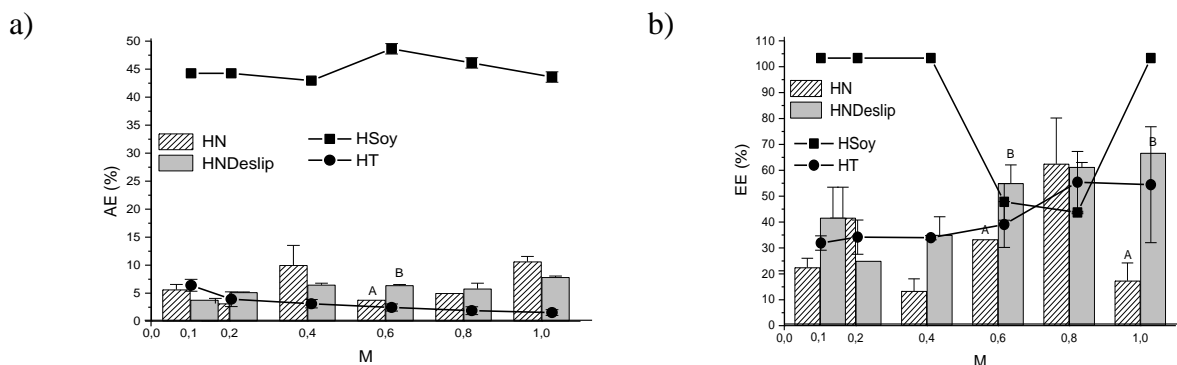
HN, HNDeslip y HT presentaron baja AE (< 11%) en el rango de molaridad ensayada y significativamente inferior ($p \leq 0,05$) a la HSoy (Figura II.11a). La menor AE de las harinas de nuez y trigo está vinculada a la baja solubilidad proteica en estos medios, debido al reducido porcentaje de albuminas y globulinas de las muestras en comparación con la HSoy.

La AE de HN y HNDeslip presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) únicamente cuando el medio fue 0,6 M, solo a esta fuerza iónica la AE dependió de la composición de la matriz.

Al igual que con la AE, la EE de las harinas de nuez presentó perfiles más parecidos a la HT que a la HSoy. El tipo de proteína presente en cada matriz condiciona en gran medida las diferencias en los valores encontrados (Figura II.11b).

Al comparar las harinas de nuez entre sí, se observaron diferencias ($p \leq 0,05$) solo a 0,6 y 1,0 M. En ambos medios los valores de HN fueron inferiores a los de HNDeslip. La menor estabilidad encontrada en HN en comparación con HNDeslip (17,3 y 66,7%, respectivamente a 1,0 M) se puede atribuir a una disminución en las interacciones proteína-iones salinos en la superficie de las gotas emulsionadas, debido a un aumento de las interacciones hidrófobas

entre los residuos apolares de las proteínas desplegadas luego del calentamiento con los lípidos de la muestra, lo que conduce a la desestabilización de la emulsión.



Letras distintas indican diferencias ($p \leq 0,05$) entre muestras de nuez a una misma molaridad.

Figura II.11: Capacidad emulsionante de las harinas en función de la fuerza iónica, a) Actividad emulsionante (AE) y b) Estabilidad emulsionante (EE).

Las diferencias encontradas en la CE de las muestras analizadas en relación a variaciones en el pH, fuerza iónica del medio y concentración de la muestra, se pueden atribuir a distintos factores: diferencias en la composición de las muestras, tipos de proteínas mayoritarias y, principalmente, a la disponibilidad proteica para interactuar con la interfase, en las distintas condiciones de ensayo. Con los datos obtenidos es posible concluir que las harinas de nuez pueden formar emulsiones, sin embargo, cuando presentan una buena AE, las emulsiones formadas no son estables.

II.3.5.-Capacidad de Gelificación (CG)

En los sistemas alimenticios complejos, los geles son redes moleculares con una estructura tridimensional ordenada, constituidos por proteínas, carbohidratos o una mezcla de ambos, en la que quedan retenidos el agua, los glóbulos de grasa, las sales y otras sustancias de bajo peso molecular.

Las razones por las cuales se forman los geles están relacionadas con la matriz de las muestras (Sathe y col., 1982), cantidad y tipo de proteínas presentes (Fleming, 1975; Kinsella, 1979; Sathe y col., 1982; Mizubuti y col., 2000; Yu y col., 2007), la capacidad de absorción de agua; las intensidades de las fuerzas de atracción-repulsión que se generan (Lawal, 2004); y con el equilibrio entre cationes y aniones (Van Camp y col., 1997; Boye y col., 1995; Lawal, 2004). Por otra parte, tanto la formación como la dureza del gel están en función del

pH. En general se ha informado que el pH óptimo para la formación de geles se encuentra entre 7 y 8 para la mayor parte de las proteínas (Fennema, 2000; Granito y col., 2004) y que la temperatura y la fuerza iónica afectan la formación de geles preparados con aislados proteicos (Makri y col., 2006). Respecto a harinas de nuez, no hay información relacionada con su capacidad de gelificación.

Dado que las interacciones intra e intermoleculares que se puedan establecer, en y con el entorno, son las que regirán los valores de la mínima concentración necesaria para la gelificación y firmeza del gel, es que se analizaron el efecto del pH y de la fuerza iónica del medio en función de la concentración de la muestra en la capacidad de gelificación de las harinas.

II.3.5.1.- CG en función del pH

En la Tabla II.2 se registra la CG de las harinas de nuez, en función del pH y en la Figura inserta se muestra la menor concentración de gelificación “least gelation concentration” (LGC), tanto de las harinas de nuez como de las harinas de referencia. Este valor es considerado como un índice de la capacidad de gelificación de una muestra. Una baja LGC indica una mejor CG (Lawal, 2004).

La LGC de las harinas de nuez y soja dependió del pH del medio, a diferencia de lo que ocurrió con HT. Los valores de LGC encontrado en HT fueron los más bajos (2%), en los tres pHs ensayados. La alta capacidad gelificante de esta harina se puede atribuir al contenido en carbohidratos (88,4%), los cuales disminuyen la afinidad termodinámica de las proteínas por la solución acuosa, aumentando la magnitud de las interacciones entre las moléculas proteicas, con lo cual la capacidad de gelificación es superior (Adebowale y Adebowale, 2008). En algunos casos, se ha encontrado que la adición de hidratos de carbono mejora la CG (Adebowale y Lawal, 2004).

Para las harinas de nuez, la capacidad de gelificación fue menor cuando el pH correspondió al pH isoeléctrico. Por otra parte, el bajo valor de LGC encontrado en HN, a pH 7 (0,5%), se puede atribuir a la asociación-disociación de los componentes de la fracción lipídica, que ejercen un efecto favorable, tanto en la solubilidad proteica (Figura II.1b) como en la posterior agregación.

A pH 10, en tanto, el mayor valor de LGC de HN, que el registrado a pH 7, se debe a una mayor interacción proteína-compuestos polifenólicos que ocurre a pH alcalino (Xu y Diosady, 2000, 2002) lo cual se traduce en una menor disponibilidad de proteínas para la formación de la estructura tridimensional.

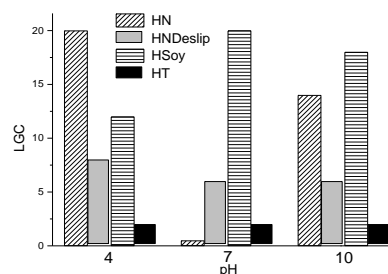
En HNDeslip, donde la concentración de lípidos es menor, se observa que la CG mejoró a pH neutro/alcalino respecto a la del pI; esto se atribuye, por un lado al incremento de la ionización de los componentes hidrosolubles, y con ello el de la solubilidad de las proteínas (Wiltoon y col., 1997), en segundo lugar a un incremento en la formación de puentes disulfuro, que en general ocurre en medio alcalino, dando lugar a geles más firmes (Avanza y col., 2005) y en tercer lugar a la mayor capacidad de absorción de agua por parte de las proteínas y de los carbohidratos, componentes mayoritarios en la muestra deslipidizada.

Respecto a la firmeza de los geles de las harinas de nuez, a bajas concentraciones se obtuvieron geles débiles. Por otra parte, la presencia de lípidos afectó la CG: mejoró la LGC, a pH 7, y disminuyó la fortaleza del gel. A los pHs 4 y 10, en tanto, la harina deslipidizada (HNDeslip) presentó mejores propiedades gelificantes que HN.

Tabla II.2: Capacidad de gelificación en función del pH

% p/v	HN			HNDeslip		
	pH			pH		
	4	7	10	4	7	10
0,5	0	1	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0
6	0	1	0	0	1	1
8	0	1	0	1	1	1
10	0	1	0	1	2	2
12	0	1	0	1	2	2
14	0	1	1			
16	0	1	1			
18	0	1	1			
20	1	3	3			

Ref: 0 = ausencia de gel; 1 = gel débil; 2= gel firme; 3= gel muy firme



LGC: Concentración mínima necesaria para formación de gel (“Least Gelation Concentration”)

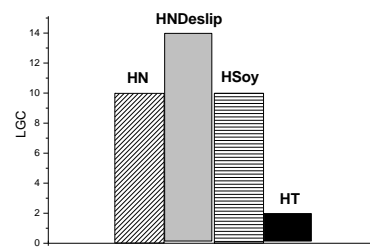
II.3.5.2.-CG en función del pH “natural”

En la Tabla II.3 se registra la CG de las harinas a pH “natural”. La LGC para la HN correspondió a una concentración del 10% p/v, al igual que la harina de soja (HSoy), en tanto que en la HNDeslip fue del 14% p/v. Estos valores son comparables a los obtenidos por otros autores con harinas de leguminosas y cereales (Lqari y col., 2002; Lawal, 2004; Adebowale y col., 2005; Fasasi, 2009, entre otros).

Al comparar las harinas de nuez entre sí, se encontró que la presencia de lípidos en HN afecta esta propiedad: mejora la LGC pero disminuye la fortaleza del gel.

Tabla II.3: Capacidad de gelificación a pH “natural”

% p/v	HN	HNdeslip
2	0	0
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	1	0
12	1	0
14	1	1
16	1	2
18	3	
20	3	



LGC: Least Gelation Concentration

Ref: 0 = ausencia de gel; 1 = gel débil; 2= gel firme; 3= gel muy firme

II.3.5.3.- CG en función de la fuerza iónica (M)

La CG de las harinas HN y HNDeslip, en función de la concentración y de la fuerza iónica del medio se observa en la Tabla II.4. Ambas harinas poseen capacidad de gelificación, siendo la de HN superior a la de HNDeslip. De acuerdo a estos resultados, la CG depende de la matriz de la muestra. Si bien la formación del gel para cada muestra es independiente de la fuerza iónica del medio, ésta influye en la fortaleza de dicho gel.

Los resultados en HN y HNDeslip, son opuestos a lo encontrado en HSoy y a los informados por otros autores (Adebowale y Lawal, 2003; Lawal, 2004; Castimpoalas y Meyer, 1970), quienes encuentran una relación de dependencia entre LGC y la fuerza iónica del medio en proteínas de *Mucuna*, y globulinas de soja. También ha sido informada la relación de la firmeza de los geles con la fuerza iónica del medio por varios autores, con

resultados diversos según el tipo de muestra (Otte y col. 1999; Adebowale y Lawal, 2003; Makry y col., 2005).

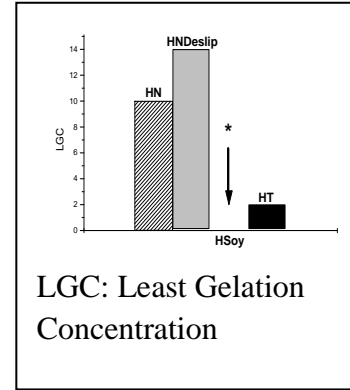
Las diferencias se explican por el tipo de proteínas mayoritarias presentes en las muestras, ya que tanto las globulinas de soja y de otras leguminosas son, principalmente solubles en agua o soluciones salinas diluidas. Con lo cual, el medio con baja fuerza iónica ejerce un efecto protector en la carga superficial al disminuir las fuerzas repulsivas que actúan entre moléculas proteicas, creando una situación idéntica a la de la región isoeléctrica. Un incremento de la fuerza iónica influye negativamente en la formación del gel, debido a que el agua se une a los iones, lo que provoca deshidratación proteica y consecuentemente una disminución del desplegamiento de la proteína (Lawal, 2004). En HN, con predominio de glutelinas, estructuralmente más lipofílicas, no sería afectada por el entorno salino; por otro lado, la presencia de lípidos estabiliza la estructura proteica (Tang, 2007; Tapia, 2004) y, a la vez, dificulta el contacto entre las proteínas y el medio salino. A concentraciones crecientes de muestra, las proteínas hidrosolubles compiten con los iones salinos por el agua, resultando en una mayor interacción proteína-proteína y la formación de geles cada vez más fuertes.

En HNDeslip, al presentar un mayor contenido proteico, aumentan las interacciones proteína-proteína, pero también proteína-agua y proteína-iones, lo que explica la mayor cantidad de muestra necesaria para la formación del gel. Las interacciones electrostáticas, en esta matriz, son las afectadas por el entorno salino, al disminuir las fuerzas repulsivas que actúan entre moléculas proteicas, lo que favorece la formación del gel.

Al mismo tiempo, el mayor contenido en carbohidratos en esta matriz, afecta la estructura del gel. Resultados similares han sido informados por Sathe y col., (1982), Adebowale y Lawal (2003, 2004), quienes encontraron que la CG mejora en presencia de carbohidratos, debido a una disminución de la afinidad termodinámica de las proteínas por la solución acuosa, y por Makry y col., (2005) quienes informan que la incorporación de polisacáridos en el sistema proteico afecta el comportamiento a la compresión y la estructura de los geles.

Tabla II.4: Capacidad de gelificación en función de la fuerza iónica

%	HN							HNDeslip						
	Fuerza Iónica (M)							Fuerza Iónica (M)						
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
12	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1	1	2	2	3	3	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	2	3	3	3	2	2	2	1	1	2	1
18	3	3	3	3	3	3	3							
20	3	3	3	3	3	3	3							



Ref: 0 = ausencia de gel
 1 = gel débil
 2 = gel firme
 3 = gel muy firme

*HSoy						
M	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
LGC	12	16	18	20	20	18

Los resultados indican que la CG de las harinas de nuez depende de la matriz de la muestra y del pH y, si bien la formación del gel es independiente de la fuerza iónica del medio, ésta, al igual que el pH, influye en la fortaleza de los geles. A pH neutro/alcalino se tienen condiciones adecuadas para la gelificación y los geles más firmes se obtienen con la harina deslipidizada. La presencia de lípidos propios de la muestra en HN mejora la LGC así como también la firmeza de los geles en diferentes fuerzas iónicas. Por otra parte, si bien para HN no existe relación entre la LGC y la capacidad de absorción de agua; parecería que para HNDeslip, esta propiedad juega un papel importante en la formación y en la estructura del gel. La CG de HN y HNDeslip, es inferior a la de HT y serían aptas para incorporarlas en la elaboración de productos horneados o como espesantes en sopas, batidos, salsas, mayonesas.

II.4. CONCLUSIÓN

Las harinas de nuez obtenidas con la prensa a tornillo a 50°C (HN), y la sometida a una post extracción del aceite remanente con disolvente (HNDeslip), presentaron moderada solubilidad y buena capacidad de absorción de agua. La capacidad de absorción de aceite, se vió afectada por la presencia de lípidos propios de la muestra, debido a la reducción en la cantidad de sitios apolares disponibles, para asociarse con el aceite agregado; sin embargo el valor encontrado en HN fue comparable a los de las harinas de referencia.

En relación a las propiedades emulsionantes de las harinas de nuez, se encontró que el bajo contenido de las fracciones proteicas solubles en agua y en soluciones salinas diluídas, condiciona la baja capacidad emulsionante encontrada.

La capacidad de gelificación de las harinas de nuez fue afectada por el medio y la presencia de lípidos. A pH neutro o alcalino y en el rango de fuerza iónica ensayado se tienen condiciones adecuadas para la gelificación. Entre las harinas de nuez, los geles más firmes se obtuvieron con la harina deslipidizada.

Teniendo en cuenta los resultados se considera que las harinas de nuez son aptas para incorporarlas en la formulación de alimentos, así como también para atrapar/retener aromas y sabores, o para vehiculizar sustancias liposolubles.

CAPÍTULO III: EFECTO DE LA PRESENCIA DE TEGUMENTO EN LA FRACCIÓN PROTEICA DE HARINA DE NUEZ. COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD INHIBITORIA DE RADICALES LIBRES DE EXTRACTOS FENÓLICOS

III.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados por Payne (1985), Sze-Tao y Sathe (2000) y Savage (2001) revelan que las proteínas de la nuez son altamente digeribles y poseen un buen balance de aminoácidos esenciales. Por otra parte y de acuerdo a los resultados obtenidos en el Capítulo I, en la var. Franquette, la relación entre aminoácidos esenciales/totales es de 39,8%, similar a la informada por Sze-Tao y Sathe, (2000) en mezclas de nueces comerciales.

Con las propiedades funcionales determinadas en el Capítulo II, y el reciente trabajo de Mao y Hua (2012), es posible afirmar que las harinas de nuez serían aptas para ser incorporadas como ingredientes de numerosos productos alimenticios y ser empleadas en la producción de aislados y/o concentrados proteicos.

Sin embargo, la nuez es uno de los frutos secos que presenta un alto contenido en compuestos fenólicos (Anderson y col., 2001), sustancias en su mayoría hidrosolubles que se encuentran principalmente en el tegumento seminal y debido a su baja solubilidad en aceite permanecen en el residuo luego que los lípidos son extraídos. En su mayor parte a estos compuestos se los ha identificado como ácidos fenólicos y elagitaninos o taninos condensados y se ha demostrado que la mayoría contribuye a la actividad antioxidante de los extractos de nuez en diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro* (Anderson y col., 2001; Fukuda y col., 2003; Colaric y col., 2005; Kornsteiner y col., 2006; Ito y col., 2007).

Los compuestos fenólicos son responsables del color oscuro y sabor astringente de muchos productos proteicos vegetales y pueden unirse a las proteínas por medio de diferentes mecanismos tales como puentes de hidrógeno, uniones covalentes, interacciones hidrofóbicas o iónicas en medios acuosos. Estos compuestos producen quinonas, como resultado de reacciones enzimáticas o no enzimáticas, las cuales son capaces de reaccionar con las proteínas dando lugar a productos coloreados. Estos compuestos fenólicos o las formas oxidadas, en muchos casos interactúan con los aminoácidos esenciales u otros nutrientes,

reduciendo la disponibilidad de los mismos. El conocimiento de estas interacciones es otro aspecto importante para valorar la calidad de las harinas, comprender su comportamiento o utilización en aplicaciones industriales.

La falta de información relacionada al efecto de los fenoles del tegumento en la fracción proteica de harinas de nuez de la var. Franquette, motivó el planteo de los siguientes objetivos, con el propósito de contribuir a su conocimiento y establecer las bases para la elaboración de subproductos proteicos y/o la obtención de extractos fenólicos con potenciales aplicaciones como antioxidantes naturales.

Objetivos específicos

- 1.- Estudiar el efecto de la presencia del tegumento de la semilla en la fracción proteica de harina de nuez.
- 2.- Determinar, en harina y en tegumento, el contenido de fenoles totales y la capacidad inhibitoria de radicales libres de los mismos.
- 3.- Obtener, a partir de la harina procedente de la prensa a tornillo, extractos alcohólicos, a fin de identificar y cuantificar los componentes fenólicos presentes en el mismo.

III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS (Objetivos específicos 1 y 2)

III.2.1. Obtención de las muestras

Las semillas de nuez se dividieron en dos lotes; uno de ellos se utilizó para obtener harina de nuez a partir de la semilla con tegumento (HNCT) y al otro lote se le retiró el tegumento, en forma manual, para obtener harina de nuez sin tegumento (HNST). En ambas muestras las semillas fueron trituradas y el aceite se extrajo por lixiviado, utilizando *n*-hexano como disolvente (1:20, sólido:disolvente), a temperatura ambiente (25°C). Las harinas resultantes (con 4,7% p/p de aceite) fueron desolventizadas (a presión reducida y a 30°C), molidas, tamizadas y conservadas a -10°C.

III.2.2. Proteínas solubles en función del disolvente

Las proteínas solubles de HNCT y HNST (0,25 g) se extrajeron con los siguientes sistemas disolventes: agua destilada deionizada y soluciones acuosas de: NaCl 1,0 M (pH 7); etanol al 70% v/v; Na₂B₄O₇ 0,1 M (pH 10) y NaOH 0,1 M (pH 13). En todos los casos la relación harina/disolvente fue 1:20 (p/v) y el período de extracción fue de 2 h (a temperatura ambiente, con agitación cada 10 min). Luego se centrifugó (13.000 g, 25°C, 10 min) y en el sobrenadante se determinó el contenido de proteína soluble (PS), por el método de Bradford (1976). Los resultados fueron expresados como mg PS/g PT, donde PT corresponde a la proteína total determinada por Kjeldahl.

III.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La composición polipeptídica de los precipitados acetónicos, obtenidos a partir de una alícuota (4 ml) de las proteínas solubles en cada sistema disolvente, fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras, de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970).

Se emplearon geles apiladores y de separación de 3 y 10% p/v, respectivamente, en un sistema de mini-placas (Cole-Parmer Dual Vertical Mini-Gel System, Modelo 28575-00). Los *buffers* utilizados fueron: *buffer* de separación: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3; *buffer* de la muestra: 0,2 M Tris-HCl, 14,6% v/v glicerol, 5,3% p/v SDS, 2,6 mM EDTA, 4% v/v 2-mercaptoetanol, 0,02% p/v azul de bromofenol, pH 6,8.

Los precipitados acetónicos de cada muestra fueron resuspendidos en el *buffer* de la muestra, calentados a 100°C durante 2 min y centrifugados a 14000 g durante 20 min, a temperatura ambiente. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (20 mV).

Los geles se fijaron durante 45 min en ácido acético al 25% v/v y colorearon con una solución de metanol, agua y ácido acético (5:5:2) conteniendo 0,5% de Coomassie Brilliant Blue G-250. La decoloración se realizó con solución acuosa de etanol 30% v/v y ácido acético 10% v/v.

Para estimar la masa molecular de las proteínas, se sembraron en los geles, patrones de peso molecular conocido (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

III.2.4. Extractos fenólicos

Las harinas deslipidizadas (HNCT y HNST) fueron divididas en dos lotes, cada uno fue tratado con un sistema disolvente: etanol:agua (7:3 v/v) y metanol:agua (6:4 v/v). La extracción se llevó a cabo mediante dos lavados sucesivos (2 horas cada uno, con agitación continua), la relación peso de material:volumen de disolvente en cada extracción fue de 1:5 p/v. Las mezclas soluto-disolvente obtenidas fueron filtradas y concentradas (a presión reducida, a 40°C y en oscuridad). Los extractos se conservaron a -10°C hasta su posterior utilización.

A modo comparativo, se procedió a la obtención de extractos fenólicos a partir del tegumento, oportunamente retirado de la semilla. Los sistemas disolventes utilizados fueron los mismos que para la obtención de los extractos a partir de la harina. En este caso la relación peso de material: volumen de disolvente de cada extracción fue de 1:50 p/v.

III.2.5. Cuantificación de los compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (FT), tanto de los extractos obtenidos de las harinas como del tegumento, se determinó colorimétricamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Siddhuraju y col., 2002). A 0,1 ml de extracto, se agregaron 0,9 ml de agua deionizada y 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu; luego de un minuto se añadieron 2,5 ml de una solución de Na₂CO₃ (20% p/v), se agitó vigorosamente, se colocó en oscuridad y luego de 40 min se registró la absorbancia a 725 nm. La concentración de FT en los extractos se determinó a partir de los datos obtenidos de una curva de calibración realizada con ácido

gálico y los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

III.2.6. Capacidad inhibitoria de radicales libres

La actividad secuestrante de radicales libres de los extractos fenólicos se realizó mediante la reacción de los componentes del extracto con el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Gálvez y col., 2005). Con cada uno de los extractos obtenidos a partir de las harinas y del tegumento, se prepararon soluciones metanólicas de distintas concentraciones (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 y 15,63 ppm). Una alícuota (1610 µl) de las mismas se agregó a 350 µl de una solución metanólica de DPPH• (0,022% p/v); se agitó vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente (30 min). El DPPH• remanente se determinó colorimétricamente a 517 nm. La capacidad inhibitoria de radicales libres de los extractos se expresó como la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) (concentración de los extractos, expresada en µg/ml, que causa la disminución del 50% de la concentración inicial del radical DPPH•). Los valores fueron calculados a partir del logaritmo decimal de la curva de la dosis inhibitoria. La CI₅₀ del BHT se determinó como control positivo.

III.2.7 Análisis estadístico

Según se detalló en II.2.2.6.

III.3.- MATERIALES Y MÉTODOS (Objetivo específico 3)

III.3.1. Extracto fenólico a partir de harina

A la harina de nuez obtenida mediante prensa a tornillo, se le agregó etanol al 70% (v/v) en una relación 1:2,5 (p/v), se mantuvo en cámara refrigerada durante 72 h (4°C, bajo atmósfera de Nitrógeno, en oscuridad), se filtró (papel Whatman N° 1), se redujo el volumen (evaporador rotatorio, a 40°C, en oscuridad) y se particionó con *n*-hexano (40 ml cada vez, a temperatura ambiente) hasta la obtención de un líquido incoloro. A la fase acuosa se la llevó a sequedad y se la retomó con etanol al 70% (v/v), obteniendo el extracto etanólico de la harina procedente de la prensa a tornillo (EEpt).

III.3.2. Fraccionamiento secuencial de compuestos fenólicos

Una alícuota (2 ml) del EEpt se sembró en una columna cromatográfica (35 cm de longitud; diámetro interno de 1 cm), rellena con Diaion HP20 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) y se eluyó con agua destilada y cantidades crecientes de etanol [agua:etanol (1:0); (9:1); (8:2); (0:1)]. Los eluatos obtenidos fueron evaporados a sequedad (40°C, en oscuridad) y mantenidos a -18°C hasta proceder con los análisis correspondientes (Fukuda y col., 2003).

III.3.3. Cuantificación de FT y CI₅₀

Los FT y CI₅₀ del EEpt y de los eluatos se determinaron de acuerdo a la metodología descrita precedentemente.

III.3.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

El extracto y eluato seleccionados de acuerdo al contenido en FT y CI₅₀, fueron analizados mediante HPLC-ESI-MS/MS (Agilent Serie 1200 LC System, acoplado a un MicroTOF Q II). El sistema consistió en un micro desgasificador de vacío, con bombas binarias e inyector automático, compartimento de columna termostaticado y detector de arreglo de diodo (DAD). Para el análisis de estructura de los compuestos fenólicos se usó un espectrómetro de masas, equipado con una fuente de iones de electrospray y analizador qTOF, en modo MS y MS/MS.

Los análisis por HPLC se realizaron a 40°C, con una columna C18 (Phenomenex Luna) de 250 mm x 4,6 mm (partícula: 5 µm), a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min, utilizando 0,5% (v/v) de ácido fórmico (Solvente A) y metanol (Solvente B) con el siguiente gradiente de composición: inicio con 20% y cambiando a 50% de solvente B en 3 min, mantenido durante 5 min, seguido de una segunda rampa a 80% de B en 5min, se mantuvo durante 17 min, una tercera rampa hasta 20% de B en 1 min, manteniendo esta última condición durante 10 min antes de la siguiente ejecución. El volumen de inyección fue de 40 µl.

La detección por ESI-MS se realizó en modo de ion negativo y positivo con la adquisición de masa entre 100 y 1500 Da. Se utilizó Nitrógeno como gas de secado y nebulizador (7 litro/min y 3,5 Bar, respectivamente), y la temperatura de secado se programó en 180°C. Para MS/MS, la fragmentación se logró mediante el uso de la opción Auto MS². El análisis DAD se llevó a cabo en el intervalo entre 200 y 700 nm.

La identificación de los componentes de los extractos fenólicos de la nuez se realizó por comparación de las características espectrales de los compuestos (UV y ESI-MS y MS/MS) con los de las muestras de referencia cuando estuvieron disponibles o por datos bibliográficos.

Las curvas de calibración se prepararon a partir de diluciones apropiadas con metanol de las soluciones madre (1000 mg/litro) de ácido gálico, catequina y ácido elágico, las cuales se filtraron con papel Millipore (0,45 µm) antes de su uso. La cuantificación de los compuestos con curvas de calibración específicas (cuando los compuestos de referencia no estaban disponibles, se utilizó la calibración de sustancias estructuralmente relacionadas) se realizó por espectrometría de masas. En todos los casos la concentración de los compuestos se determinó por triplicado.

III.3.5. Parámetros moleculares

Las estructuras moleculares de los compuestos identificados por HPLC-ESI-MS/MS se construyeron usando el programa ChemWindow y fueron transferidos al programa Chemaxon con el cual se determinó el confórmero de menor energía y se calcularon los siguientes parámetros estructurales: log D a los pHs 3; 7; 10 y 13; sitios donantes y aceptores

de hidrógeno (HBD y HBA, respectivamente); pKa (expresado como carga y % de la especie mayoritaria a cada pH).

El log D es pH dependiente y se expresa como el logaritmo del cociente entre la suma de las concentraciones de todas las formas del compuesto (ionizadas y no-ionizadas) en un disolvente apolar (octanol), y la suma de las concentraciones de todas sus formas en un disolvente polar (agua).

III.3.6. Análisis estadístico

Según se detalló en II.2.2.6.

III.4. RESULTADOS

III.4.1. Efecto del tegumento en la fracción proteica

A fin de evaluar el efecto del tegumento en la fracción proteica de las harinas deslipidizadas obtenidas de semillas con y sin tegumento se determinó tanto la solubilidad como los perfiles electroforéticos de las mismas.

III.4.2. Proteínas solubles en función del disolvente

Respecto a la solubilidad en función de los disolventes utilizados para la extracción (Tabla III.1) se observa que, en la muestra con tegumento (HNCT) las proteínas solubles, tanto en agua como en NaCl, presentaron valores significativamente menores ($p < 0,05$) que los correspondientes a la muestra sin tegumento (HNST). Esto indica, por un lado, que efectivamente los compuestos fenólicos presentes en el tegumento se encuentran unidos a las proteínas dispersas en dicho medio, acuoso o salino, a pH neutro, y por otro, que el tratamiento con NaCl (1,0 M) no es suficiente para liberar los fenoles de las proteínas.

En $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (0,1 M, pH 10), en tanto, no hubo diferencias entre HNCT y HNST (114 y 132 mg/g, respectivamente). Este efecto pH-dependiente se debe probablemente a los diferentes mecanismos que mantienen unidos a los fenoles con las proteínas. Xu y Diosady (2000, 2002), han observado que una alta fracción de taninos condensados libres y taninos hidrofóbicos están presentes a pH alcalino. Con lo cual, bajo estas condiciones, los taninos se encuentran libres o débilmente unidos a las proteínas, y por lo tanto la solubilidad proteica no se ve afectada significativamente. En medio alcalino, pero con NaOH (0,1 M, pH 13), la solubilidad proteica de HNCT fue 26% inferior a HNST (143 y 194 mg/g, respectivamente). La solución acuosa de la base fuerte provoca la desnaturalización y disociación de las moléculas proteicas (Abugoch y col. 2003), una mayor exposición de los residuos apolares de las proteínas y, en HNCT, la asociación con los taninos condensados por medio de asociaciones hidrofóbicas, lo que conlleva a la reducción en la solubilidad proteica observada.

La solubilidad proteica de ambas muestras en etanol 70%, presentó los valores más bajos (0,09 y 0,14 mg/g, respectivamente), atribuidos a la pequeña proporción (5–6%) de prolaminas presentes en la harina de nuez (Capítulo I sec B.2.2. y Sze Tao y col., 2000).

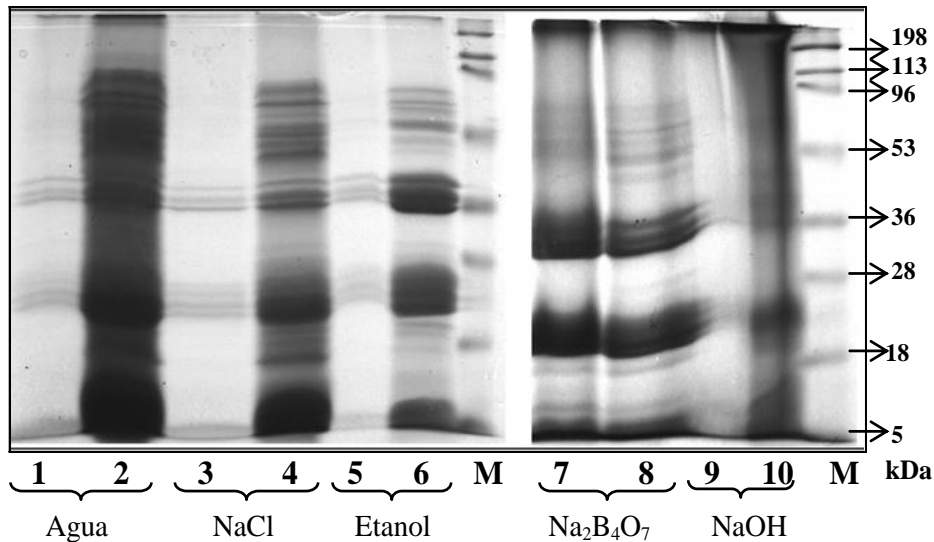
Tabla III.1: Solubilidad proteica (mg PS/g PT) en diferentes sistemas disolventes de las harinas de nuez con (HNCT) y sin tegumento (HNST).

Sistema disolvente/Fracción proteica	PS/ PT	
	HNCT	HNST
Agua/Albúminas	0,19 ± 0,02 ^a	26,1 ± 0,25 ^b
NaCl (1,0 M)/Globulinas	0,45 ± 0,05 ^a	44,0 ± 5,90 ^b
Etanol 70%/Prolaminas	0,09 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,02 ^b
Na ₂ B ₄ O ₇ (0,1 M, pH 10)/Glutelinas	114 ± 8,2 ^a	132 ± 11,0 ^a
NaOH (0,1 M, pH 13)/PT	143 ± 8,1 ^a	194 ± 7,2 ^b

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,05)

III.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los electroferogramas (Figura III.1) confirman el efecto del tegumento en la solubilidad de las proteínas cuando las mismas son extraídas con agua, NaCl (1,0 M) o etanol (70%). Con estos disolventes, los patrones polipeptídicos obtenidos a partir de HNCT muestran bandas tenues y difusas, especialmente a pesos moleculares superiores a 50 kDa. Por otra parte, no se observaron diferencias entre los perfiles proteicos de HNCT y HNST utilizando Na₂B₄O₇ como agente extractivo (líneas 7 y 8, respectivamente), a diferencia de lo que ocurre cuando la proteína es extraída con NaOH (0,1 M, pH 13). En este medio ocurre desnaturalización, disociación e ionización de las moléculas proteicas y los perfiles obtenidos muestran un patrón difuso y significativamente diferente cuando se comparan las harinas con y sin tegumento (líneas 9 y 10 de la figura). El NaOH favorece la solubilidad de la proteína, pero ésta se ve afectada cuando los componentes fenólicos del tegumento están presentes (HNCT).



Números impares: proteínas de HNCT; N° pares: proteínas de HNST. M: masa molecular de patrones proteicos

Figura III.1: Electroferograma de las proteínas de harina de nuez con y sin tegumento (HNCT y HNST, respectivamente), extraídas con diferentes disolventes.

Estos resultados indican que, tanto la solubilidad como los perfiles electroforéticos de las fracciones solubles difieren según la presencia/ausencia de tegumento en la muestra y según el tipo de disolvente utilizado para obtener dichas fracciones proteicas. Si bien, la remoción manual del tegumento favorece la solubilidad de las proteínas resulta poco viable para aplicaciones industriales. Sin embargo, entre las proteínas de nuez, predominan las glutelinas y las globulinas (70 y 18% de las proteínas totales de la semilla, respectivamente), ambas insolubles en soluciones etanólicas. Con lo cual, la harina de nuez con tegumento podría ser utilizada para obtener extractos fenólicos, mediante disolventes alcohólicos, sin reducir significativamente el rendimiento proteico. La importancia de obtener tales extractos radica en sus potenciales aplicaciones como antioxidantes naturales, que podrían reemplazar a los sintéticos, actual objetivo de diversas investigaciones, tanto en el área de la salud como en el de la tecnología de los alimentos.

III.4.4. Contenido en fenoles totales (FT) y capacidad inhibitoria 50 (CI₅₀) de radicales libres

El contenido en FT de los extractos obtenidos a partir de la HNCT y del tegumento se presenta en la Tabla III.2. Como era de esperar, una mayor concentración de FT se encontró en los extractos etanol:agua y metanol:agua del tegumento (396,76 y 403,09 mg EAG/g, respectivamente); valores 15 y 17 veces superiores a los de los extractos de harina obtenidos con idénticos sistemas disolventes (25,5 y 23,7 mg EAG/g, respectivamente). Estos resultados muestran que, si bien el tegumento aporta solo el 5% aproximadamente del peso de la semilla (Colaric y col., 2005), el contenido en FT es por lo menos 93-95% superior.

Los valores de FT encontrados (expresados sobre base deslipidizada) fueron superiores a los informados por otros autores en diferentes variedades de nueces (*Juglans regia*). Anderson y col., (2001) reportaron un contenido en FT de 16,04 mg EAG/g en extractos acetónicos obtenidos a partir de nueces inglesas (mezcla de las vars. Hartley y Chandler) y Gunduc y El (2003) informan un valor de 7,05 mg EAG/g. En tanto que, Colaric y col., (2005), encuentran valores de 0,74 y 18,27 mg/g en semillas y tegumento, respectivamente, correspondientes a la sumatoria de nueve compuestos fenólicos identificados en la var. Franquette. Por otra parte, tanto con la harina como con el tegumento, no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de FT entre los dos sistemas alcohólicos probados como agentes extractivos.

En relación a la CI₅₀ (Tabla III.2), los extractos etanol:agua y metanol:agua, provenientes de la harina no presentaron diferencias significativas entre sí (11,2 y 10,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) y resultaron intermedios a los de los extractos obtenidos a partir del tegumento (7,5 y 14,2 $\mu\text{g/ml}$), aún cuando la concentración en FT fue significativamente inferior. La capacidad antirradicalaria de los extractos fue comparable a la del BHT, antioxidante sintético utilizado a los fines comparativos, y similares a los valores informados para algunos antioxidantes naturales derivados de plantas alimenticias (Miller y col., 2000; Halvorsen y col., 2002; Pellegrini y col., 2003).

Al correlacionar la CI₅₀ de los extractos con su contenido en fenoles totales se obtuvieron valores, estadísticamente significativos, tanto en la harina ($r^2 = 0,95$) como en tegumento ($r^2 = -1$).

Tabla III.2: Contenido de fenoles totales (FT) y concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de extractos obtenidos de harina y de tegumento.

Muestra	Extracto	FT (mg EAG/g)	CI ₅₀ (µg/ml)
HNCT	Etanol:agua	25,5 ^a ± 6,7	11,2 ^b ± 0,6
	Metanol:agua	23,7 ^a ± 8,0	10,5 ^b ± 0,3
Tegumento	Etanol:agua	396,8 ^b ± 65,8	7,5 ^a ± 0,07
	Metanol:agua	403,1 ^b ± 40,6	14,2 ^c ± 0,5
BHT			10,1 ^b ± 0,02

BHT: butilhidroxitolueno (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol)
 Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

Los resultados ponen de manifiesto que los extractos de harina con tegumento de la var. Franquette (HNCT), poseen un contenido en FT cuya capacidad antirradicalaria es comparable a la de los extractos obtenidos a partir de tegumento y semejante al del antioxidante referente (BHT). Los compuestos presentes en las harinas poseen actividad aun luego del proceso de extracción del aceite y se justificaría plenamente su obtención.

III.4.5. Extracto fenólico de harina procedente de la prensa a tornillo. FT y CI₅₀

De acuerdo a los resultados alcanzados con los extractos de la HNCT, se procedió a obtener el extracto etanólico de la harina de nuez, resultante de la prensa a tornillo (EEpt) y los eluatos, del fraccionamiento del EEpt en un sistema cromatográfico secuencial, de acuerdo a la metodología descrita en los puntos III.3.1. y III.3.2, respectivamente. Tanto el EEpt como todos los eluatos fueron evaluados en el contenido en FT así como en la capacidad antirradicalaria frente al DPPH• (resultados expresados como mg EAG/g y CI₅₀, respectivamente).

El valor de FT en el EEpt (24,8 ± 3,6 mg EAG/g de harina deslipidizada) (Tabla III.3) fue similar (p<0,05) al encontrado en el extracto etanol:agua (7:3 v/v) obtenido a partir de la HNCT (Tabla III.2), lo que indica que la metodología utilizada para la obtención del extracto, así como el tratamiento para reducir el contenido de aceite, no ejerció efecto en la solubilidad de los compuestos fenólicos.

En relación a la CI_{50} del EEpt, el valor obtenido ($10,4 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$), resultó inferior ($p < 0,05$) al del extracto etanólico obtenido a partir de HNCT ($11,21 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$), diferencia que puede ser atribuida al tipo de compuestos fenólicos presentes en estos extractos y pone en evidencia la existencia de una relación entre estructura y actividad.

III.4.6. Eluatos fenólicos: FT y CI_{50}

En la Tabla III.3 se resume además el sistema disolvente (relación v:v), volumen eluido (ml), rendimiento (% p/p) para cada eluato obtenido del fraccionamiento del EEpt y el contenido de FT y la CI_{50} del EEpt y los eluatos.

Los resultados que se muestran en dicha Tabla indican que el eluato con mayor rendimiento, agua:etanol (1:0) presentó el menor contenido de fenoles totales y la mayor CI_{50} , es decir que los compuestos fenólicos presentes en el eluato acuoso del EEpt son hidrosolubles y con baja capacidad antirradicalaria (eluato 1:0, $7,14 \text{ mgEAG/g}$; $CI_{50} = 72,9 \mu\text{g/ml}$). En tanto que, en cada eluato alcohólico, la cantidad de compuestos fenólicos depende de la proporción de cada disolvente utilizado, lo que confirma la solubilidad diferencial de los mismos. Por otra parte, estos eluatos alcohólicos presentan una alta capacidad antioxidante, con valores de CI_{50} entre $3,74$ y $4,42 \mu\text{g/ml}$ (sin diferencias significativas entre los mismos), comparable a la del ácido ascórbico y superior a la del BHT.

Tabla III.3: Sistema disolvente utilizado, volumen eluido (ml), rendimiento (% p/p) de los eluatos obtenidos a partir del EEpt y contenido de fenoles totales (FT) y concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del EEpt, eluatos, BHT y ácido ascórbico.

	agua:etanol (v:v)	Vol (ml)	Rendimiento (% p/p)	FT (mg EAG/g)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EEpt				$24,8^a \pm 3,6^*$	$10,4^b \pm 0,16$
Eluatos	1:0	140	67,2	$7,14^a \pm 0,01$	$72,9^c \pm 6,51$
	9:1	295	4,21	$147,3^b \pm 4,1$	$4,42^a \pm 0,05$
	8:2	830	8,30	$147,1^b \pm 4,2$	$3,74^a \pm 0,06$
	0:1	135	2,44	$371,7^c \pm 26,6$	$4,13^a \pm 0,47$
BHT					$10,1^b \pm 0,02$
Ác. ascórbico					$4,14^a \pm 0,01$

* Expresado como mg EAG/g de harina deslipidizada
Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

III.4.7. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

Con el objetivo de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos, se seleccionó entre los extractos obtenidos de las harinas, el EEpt y entre los eluatos que presentaron la menor CI_{50} , el 8:2, por registrar el mayor rendimiento.

En la Tabla III.4 se presentan los 19 compuestos identificados y la concentración de los mismos (mg/litro), así como el tiempo de retención, características espectrales y especificación de los métodos de identificación y cuantificación.

Los principales compuestos en el extracto procedente de la harina fueron el ácido elágico (compuesto n° 18), galoil hexósido (compuesto n° 3), digaloil hexósidos (compuestos n° 5 y 8) y ácido gálico (compuesto n° 9). También se identificaron cantidades menores de algunos derivados del hexahidroxidifenilo (HHDP) (compuestos n° 1; 2; 4; 6; 7 y 11), ácido elágico unido a hexosas o a pentosas (compuestos n° 13; 15; 17 y 19), catequina (compuesto n° 12), un dímero de la procianidina (compuesto n° 10) y dos estructuras no fenólicas (Glansreginina A y B). Las respectivas imágenes, en dos dimensiones (2D), se muestran en la Figura III.2. En el eluato 8:2, en tanto, se identificaron un total de 7 compuestos y, así como en el EEpt, los de mayor concentración fueron el ácido elágico, ácido gálico y dos derivados del ácido gálico (digaloil hexósidos) que eluyeron a diferentes tiempos de retención (9 y 10,2 min, respectivamente).

Todos los compuestos informados en la tabla han sido identificados y en algunos casos aislados por diferentes autores a partir de extractos obtenidos de diversas variedades de nuez entera o de su tegumento. En general se ha observado que los compuestos fenólicos se presentan como ácidos fenólicos y taninos condensados, de tamaños diferentes y mayor solubilidad en alcohol que en agua (Lavedrine y col., 1999; Zamboni y col., 2000; Anderson y col., 2001; Fukuda y col., 2003; Gunduc y El, 2003; Gómez-Caravaca y col., 2008). Fukuda y col., (2003), por ejemplo, obtuvieron polifenoles de la fracción *n*-BuOH, provenientes del extracto etanólico e identificaron 16 compuestos polifenólicos en los que se incluyen algunos de los compuestos identificados en el EEpt y en el eluato 8:2. Zhang y col., (2009), en tanto, concentraron su estudio en el aislamiento de los fenoles de polaridad media (fracción de acetato de etilo) procedente del extracto 70% etanol y aislaron e identificaron 7 compuestos. Ito y col., (2007) obtuvieron a partir del extracto etanólico, taninos dímeros hidrolizables

(rugosina, desgaloilrugosina y heterofiliina, desde la fracción hidrosoluble) y galotaninos (tetra-O-galoil y penta-O-galoil-beta-D-glucosas, desde la fracción acetato de etilo).

Además se ha relacionado en varios trabajos, la dependencia entre estructura y función. Fukuda y col., (2003), informaron que los elagitaninos con un grupo galoil, más un grupo HHDP, tienden a exhibir un efecto más potente de captura de radicales libres, frente al DPPH•, que aquéllos con solo un grupo HHDP. En tanto que el número y posición de los hidroxilos unidos al anillo aromático también tienen un efecto significativo en la capacidad antirradicalaria, ya que una estructura con *orto*-hidroxilos es crucial para la fácil formación de *orto*-quinona, involucrada en el mecanismo de reacción entre fenoles y radicales libres. Zhang y col., (2009) informan que, entre los 7 compuestos identificados, encontraron la mayor actividad antioxidante en una cetona (3,4,8,9,10-pentahidroxidibenzo[b,d]piran-6-ona) y en el ácido gálico, galato de etilo y pirogalol, todos ellos con *orto*-hidroxilos. Estos mismos autores informan que otras sustituciones en el anillo aromático, tales como carbonilos y metoxilos, contribuyen menos a la actividad antioxidante que los hidroxilos.

Al relacionar la estructura de los compuestos identificados en el presente con algunos de los parámetros moleculares (Tabla III.5), es posible establecer que la mayoría de ellos presentan valores bajos o negativos de log D (indicando que se particionan mejor en agua que en octanol). Además, los valores negativos se acentúan a medida que el pH aumenta, debido a la ionización y consecuente incremento en la hidrofiliidad.

Por otra parte, la carga de los compuestos a diferentes pH, indican que en medios alcalinos (pH 10 y 13), un alto porcentaje presenta carga neta negativa (entre -3 y -13), con lo cual en este medio se encontrarían libres, no unidos a proteínas, y la fracción que podría interactuar con la proteína correspondería a otros elagitaninos o galotaninos de mayor tamaño y menor polaridad, (no obtenidos en el presente debido al sistema disolvente utilizado), los cuales se acomplejarían con las proteínas por medio de interacciones hidrofóbicas.

A pH 7 en tanto, los compuestos fenólicos se encuentran menos ionizados y el tipo de interacción que se podría establecer con los aminoácidos básicos de la proteínas, no totalmente desprotonados a este pH, serían de tipo iónica. A modo de ejemplo, en la Figura III.3 se muestra la ionización en función del pH, del ácido gálico y elágico, dos de los principales constituyentes identificados en EEpt y en el eluato.

Tabla III.4: Compuestos identificados y cuantificados por HPLC-ESI-MS/MS del extracto EtOH:Agua (EEpt) y del eluato 8:2.

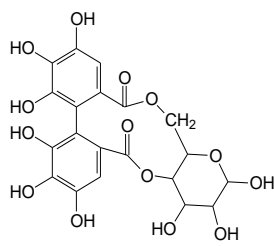
N°	Compuesto	tR (min)	[M-H] ⁻	MS ² [M-H] ⁻	Identificación Cuantificación	EEpt EtOH:Agua (7:3 v/v)	Eluato 8:2
1	HHDP hexósido	7,5	481	301	b, c	2,72 ± 0,01	1,39 ± 0,12
2	Galoil-HHDP hexósido	8,2	633	301	b, c	0,37 ± 2,4E-03	
3	Galoil hexósido	8,5	331	169, 271	b, d	7,4 ± 0,5	
4	di HHDP hexósido	8,9	783	481, 301	b, c	0,45 ± 0,05	
5	digaloil hexósido	9	483	169	b, d	3,15 ± 0,16	2,05 ± 0,78
6	Galoil-HHDP hexósido	9,9	633	301	b, c	0,35 ± 0,01	
7	di HHDP hexósido	10,1	783	481, 301	b, c	0,5 ± 0,05	
8	digaloil hexósido	10,2	483	169	b, d	4,32 ± 0,5	1,67 ± 0,01
9	Ácido gálico	10,9	169	125	a	3,78 ± 0,51	2,38 ± 0,01
10	Procianidina dímero	11,1	577	289	b, e	0,54 ± 5E-03	
11	Galoil-HHDP hexósido	11,1	633	301	b, c	0,44 ± 0,01	
12	Catequina	12	289	245	a	2,82 ± 0,01	
13	Ácid elágico hexósido	14,5	463	301	b, c	0,63 ± 0,01	
14	Glansregina B	15,1	565	403, 343, 241	b, c	2,76 ± 0,2	
15	Ácid elágico pentósido	18	433	301	b, c	2,52 ± 0,22	0,53 ± 0,03
16	Glansregina A	18,3	592	403, 343, 241	b, c	3,39 ± 0,02	0,35 ± 1,7E-03
17	Ácido elágico hexósido	18,9	463	301	b, c	0,42 ± 0,01	
18	Ácido elágico	20,5	301		a	8,39 ± 1,54	3,5 ± 0,45
19	Ácido elágico ramnósido	20,9	447	301	b, c	0,54 ± 0,01	

Procedimientos empleados para la identificación o identificación provisoria. a: co-análisis con respecto a un compuesto puro con idéntico tiempo de retención y los datos de masa, b: comparación con datos bibliográficos de MS, MS/MS y UV. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración de los correspondientes estándar, excepto cuando se indica, c: cuantificado como ácido elágico; d: cuantificado como ácido gálico, e: cuantificado como catequina. tR: tiempo de retención, en minutos.

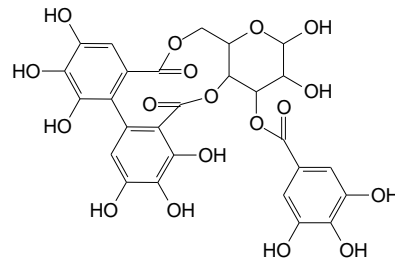
Tabla III.5: Parámetros moleculares de los compuestos fenólicos identificados por HPLC-ESI-MS/MS

N°	Compuesto	Log D				HBD	HBA	pH							
		pH						3	7	10	13	3	7	10	13
		3	7	10	13			pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)	pKa / (%)
1	HHDP hexósido	-0,5	-0,6	-4,6	-10,7	9	14	0	(100)	0	(72,2)	-2	(77,4)	-7	(49,4)
2,6,11	Galoil-HHDP hexósido	1,5	1,3	-4,2	-10,1	11	18	0	(100)	0	(64,8)	-5	(56,1)	-10	(42,4)
3	Galoil hexósido	-1,3	-1,4	-3,1	-7,3	7	10	0	(100)	0	(92,8)	-1	(92,6)	-5	(54,3)
4,7	di HHDP hexósido	2,7	2,6	-2,6	-9,2	13	22	0	(100)	0	(65,9)	-7	(84,8)	-13	(52,6)
5,8	digaloil hexósido	0,2	0,2	-3,2	-8,1	9	14	0	(100)	0	(85,2)	-2	(95,2)	-6	(45,2)
9	Ácido gálico	0,7	-2,2	-3,8	-6,6	4	5	0	(89,7)	-1	(99,0)	-2	(49,7)	-3	(91,6)
10	Procianidina dímero	3,1	3,1	0,0	-10,4	10	12	0	(100)	0	(98,0)	-5	(39,6)	-8	(66,3)
12	Catequina	1,8	1,8	0,2	-0,5	5	6	0	(100)	0	(99,0)	-2	(20,0)	-4	(62,8)
13,17	Ácido elágico hexósido	-0,6	-2,6	-4,8	-7,9	5	15	0	(99,8)	-2	(84,5)	-2	(94,2)	-5	(48,1)
14	Glansreginina B	-2,9	-5,3	-6,4	-9,3	9	18	0	(96,9)	-1	(99,7)	-1	(98,0)	-5	(41,2)
15	Ácid elágico pentósido	-0,1	-0,3	-3,4	-8,6	6	12	0	(100)	0	(73,3)	-2	(85,2)	-5	(59,4)
16	Glansreginina A	0,0	-6,0	-6,7	-8,5	5	19	-1	(49,1)	-2	(99,9)	-2	(98,8)	-4	(47,4)
18	Ácido elágico	2,3	0,1	-1,9	-3,7	4	8	0	(99,7)	-2	(85,2)	-2	(98,3)	-4	(79,0)
19	Ácido elágico ramnósido	-0,3	-2,4	-4,5	-8,1	5	15	0	(99,8)	-2	(87,9)	-2	(93,3)	-5	(55,4)

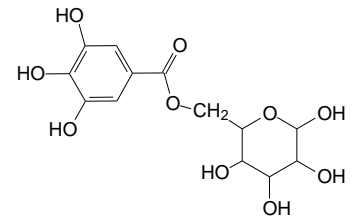
HPLC-ESI-MS/MS: Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa. Log D: partición octanol/agua en función del pH. HBD: sitios donantes de Hidrógeno (Hydrogen bond donor sites). HBA: sitios aceptores de Hidrógeno (Hydrogen bond acceptor sites).



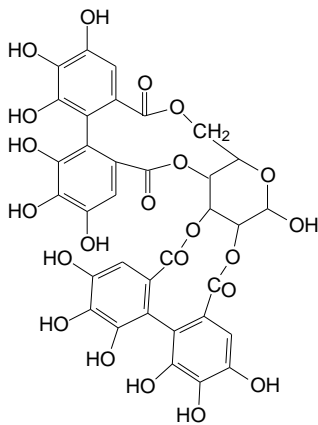
1 [HHDP hexósido]



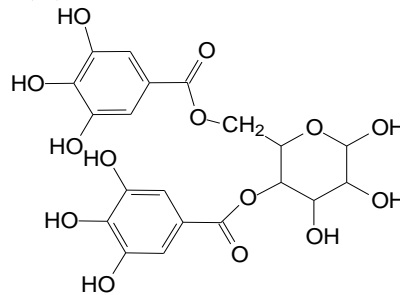
2;6;11 [Galoil-HHDP-hexósido]



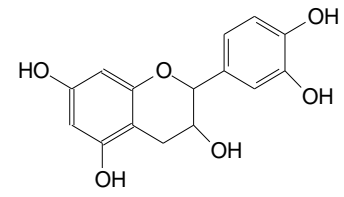
3 [Galoil hexósido]



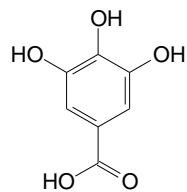
4;7 [di-HHDP-hexósido]



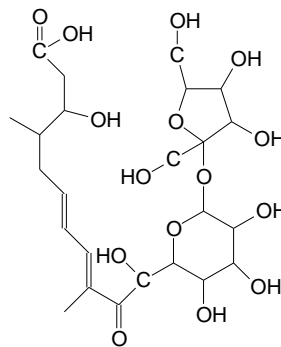
5;8 [digaloil hexósido]



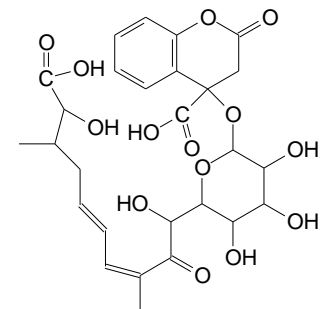
12 Catequina



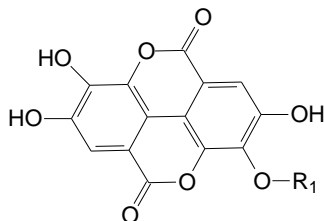
9 [Ácido gálico]



14 [Glansreginina B]



16 [Glansreginina A]

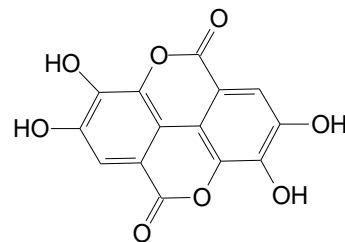


13; 17 [R_1 = hexosa, Ácido elágico hexósido]

15 [R_1 = pentosa, Ácido elágico pentósido]

18 [R_1 = H, Ácido elágico]

19 [R_1 = ramnosa, Ácido elágico ramnósido]



18 [Ácido elágico]

Figura III.2: Estructuras moleculares tentativas, en 2D, de los compuestos identificados por HPLC-ESI-MS/MS.

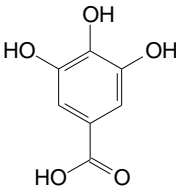
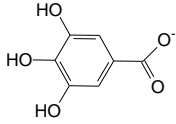
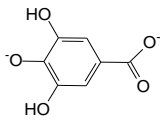
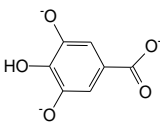
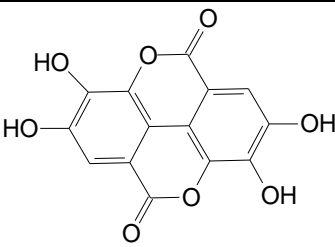
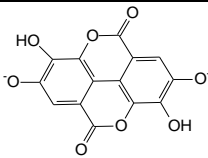
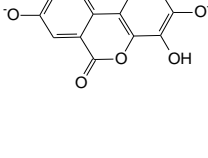
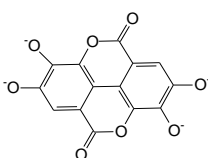
 <p>9 Ácido gálico</p> <p>pH 3 (89,7%)</p>	 <p>pH 7 (99,0%)</p>
	 <p>pH 10 (49,7%)</p>
	 <p>pH 13 (91,6%)</p>
 <p>18 Ácido elágico</p> <p>pH 3 (99,7%)</p>	 <p>pH 7 (85,2%)</p>
	 <p>pH 10 (98,3%)</p>
	 <p>pH 13 (79,0%)</p>

Figura III.3: Porcentaje de cada microespecie de los ácidos gálico y elágico a pH 3; 7; 10; 13.

El tegumento de nuez, las harinas y las fracciones que se pueden obtener de las mismas poseen compuestos fenólicos, que si bien disminuyen la solubilidad proteica, presentan como constituyentes mayoritarios los ácidos elágico y gálico; ambas estructuras, junto con el grupo galoil y el HHDP, con probada actividad antioxidante frente al DPPH• y podrían ser utilizados como aditivos antioxidantes, ya sea mediante la incorporación de los mismos directamente desde la harina o desde extractos obtenidos con sistemas disolventes alcohólicos. Al extraerlos de esta manera, además, se evita reducir significativamente el contenido en proteínas del residuo.

III.5. CONCLUSIÓN

Las proteínas de la nuez se vieron afectadas, tanto por el tipo de disolvente utilizado para solubilizarlas, como por la presencia del tegumento. Los sistemas alcohólicos resultan ventajosos ya que no solubilizan las proteínas mayoritarias de la nuez y extraen los compuestos fenólicos presentes en el tegumento.

En los extractos etanólicos obtenidos de harina de nuez, procedente de la extracción de aceite mediante prensa a tornillo, predominan los ácidos elágico y gálico y otros compuestos cuyas estructuras se relacionan con los grupos galoil y HHDP. Tanto el tegumento como las harinas poseen compuestos fenólicos que presentan actividad antioxidante aún luego del proceso de remoción del aceite.

El tratamiento de las harinas con sistemas alcohólicos permitiría obtener dos productos diferenciados, por un lado la harina desfenolizada, con mayor solubilidad proteica, y por otro, el extracto alcohólico, con compuestos fenólicos, cuyas propiedades antioxidantes lo tornan potencialmente aprovechable para su aplicación en productos alimenticios.

CAPÍTULO IV: ESTABILIDAD DE LA HARINA DE NUEZ EN DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

IV.1. INTRODUCCIÓN

La extracción del aceite da lugar al residuo (harina de nuez), la cual, de acuerdo a los resultados del Capítulo II y a Cofrades y col., (2008), Ayo y col., (2008), Mao y Hua (2012), puede ser utilizada como ingrediente en productos de panificación, ser incorporada a alimentos como carnes, pastas, etc.

Aunque la composición de ácidos grasos del aceite de nuez se considera nutricionalmente favorable, presenta una baja estabilidad oxidativa. En particular, el aceite de nuez es altamente susceptible a la foto-degradación oxidativa. Teniendo en cuenta que la harina de nuez que se obtiene luego del prensado contiene un alto porcentaje de aceite, es importante determinar cuánto tiempo y bajo qué condiciones se puede almacenar en condiciones de góndola (25°C), sin ningún tipo de deterioro. Utilizando el índice de peróxidos como una medida de la calidad, Vanhanen y Savage, (2006) encontraron que la harina de nuez puede ser preservada de la oxidación hasta 26 semanas cuando se almacena por debajo de 23°C en envases plásticos de polipropileno. Sin embargo, los resultados de estos experimentos no tienen en cuenta los posibles cambios en otros indicadores de calidad de los lípidos y de las proteínas, con lo cual, el objetivo planteado fue evaluar el efecto del almacenamiento prolongado y el tipo de envase sobre algunos parámetros de calidad del aceite y de las proteínas de la harina de nuez parcialmente deslipidizada.

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. Preparación de la harina

Tres muestras independientes (10 kg cada una) de nueces sin cáscara (*Juglans regia* L. var. *Franquette*), procedentes de Belén, Catamarca, Argentina (2009), se secaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h y se molieron utilizando un molino a rodillos. Las partículas de entre 2,5 y 4,8 mm fueron seleccionadas utilizando un tamiz automático y se acondicionaron para obtener un material con un contenido de humedad del 7,5%, el cual se procesó en una prensa a tornillo a 50°C . La torta residual obtenida se sometió a molienda en una minipimer profesional (marca Brown) para producir harina de nuez parcialmente deslipidizada (HN).

Los contenidos de humedad, proteínas (N x 5,3), aceite (Soxhlet, *n*-hexano, 12 h) y cenizas (horno Mufla a 600°C) de la HN se determinaron utilizando métodos estandarizados (AOAC, 1995). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

IV.2.2. Condiciones de almacenamiento y muestreos

Muestras de HN (12 g cada una), se envasaron y almacenaron en cámara con temperatura y luz controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 800 lux). Para el ensayo se utilizaron dos tipos de envases: laminado plástico transparente (HNP) y laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA). Los controles se almacenaron en freezer (-18°C). Mensualmente, durante 8 meses, tres muestras individuales de cada tratamiento y los controles fueron retirados y se le realizaron los análisis programados. La harina obtenida inmediatamente después del prensado se consideró como harina tiempo cero (t_0).

IV.2.3. Fracción proteica

IV.2.3.1. Actividad proteolítica endógena total y determinación de la solubilidad proteica en TCA.

La actividad proteolítica endógena total y la determinación de la solubilidad proteica en TCA se determinaron utilizando el método descrito por Abugoch y col. (2009) con modificaciones. Con cada muestra de HN deslipidizada (Soxhelt, *n*-hexano, 12 h) se preparó una dispersión al 1% (w/v) en *buffer* fosfato 0,2 M (pH 8,0), se agitó y colocó en un baño termostático a 37°C por 90 min. Las muestras no tratadas (sin calentamiento) fueron usadas

como controles. La reacción se detuvo agregando TCA al 5% (solución TCA:dispersión de HN, 1:1), y las muestras se centrifugaron a 4.000 g por 5min, a 15°C. La determinación de los péptidos solubles se cuantificó en el sobrenadante de acuerdo a Bradford (1976). La solubilidad se expresó como mg/g de la proteína total, usando la siguiente ecuación:

$$S_{TCA_t} = PS_{TCA_t} / PT_t$$

donde S_{TCA} corresponde a la solubilidad de la proteína en TCA; PS son los péptidos solubles en TCA, PT es la proteína total y t indica cada tiempo de almacenamiento.

IV.2.3.2. Espectros UV

El espectro UV de las muestras deslipidizadas se determinó de acuerdo a Abugoch y col. (2009), con modificaciones. Dispersiones de HN (0,02 mg/ml) en *buffer* fosfato 0,2 M (pH 8) se agitaron suavemente durante 1 h, a temperatura ambiente y se centrifugaron a 8.500 g durante 30 min, a 15°C. La concentración de la fracción de proteína soluble se normalizó a 0,3 mg/ml por el método de Kalckar (Kalckar, 1947). El espectro UV se obtuvo a temperatura ambiente, por lecturas de absorbancia en el rango de 250-350 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis.

IV.2.3.3. Electroforesis

Las muestras deslipidizadas de cada tratamiento se homogeneizaron en *buffer* fosfato (0,2 M, pH 8) y se centrifugaron a 8.500 g por 30 min, a 4°C. La proteína soluble se precipitó con acetona fría.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones nativas (PAGE-nativa), con el agregado de SDS (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras con β -mercaptoethanol (2-ME) (SDS-PAGE-2ME), de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo I, sección B.

IV.2.3.4. Solubilidad

A fin de determinar la solubilidad proteica a pH natural se preparó, para cada muestra y tiempo de muestreo, una dispersión de harina de nuez en agua destilada (1% p/v), se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 5.500 g durante 30 min, a 15°C. Las

proteínas solubles (PS) en el sobrenadante se determinaron por Bradford (1976) y la solubilidad proteica (S) se calculó como porcentaje respecto a la proteína total (PT) obtenida para cada tiempo (t) de almacenamiento, según la siguiente ecuación:

$$S(\%) = 100 \times PS_t / PT_t$$

IV.2.3.5. Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de cada muestra fue determinada agitando en vortex una dispersión de 0,1 g de muestra en 1ml de agua durante 30 s y luego se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente (25°C). La mezcla se centrifugó (3.000 g, 20 min, 25°C) y se midió el volumen del sobrenadante. El volumen (ml) de agua absorbida por g de muestra, en base seca, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CAAg = [m_2 - (m_1 - m_3)] / m_1 \times \delta$$

donde m_1 es el peso (g) de la muestra; m_2 es el peso (g) del sedimento; m_3 es el peso (g) de la proteína soluble en el sobrenadante determinada por Bradford y δ es la densidad del agua (1 g/ml).

IV.2.4. Fracción lipídica

IV.2.4.1. Composición en ácidos grasos

Para determinar la composición de ácidos grasos de cada muestra, el aceite (50 μ l) fue sometido a saponificación alcalina (0,5 N KOH en MeOH). El material insaponificable se extrajo con *n*-hexano. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se prepararon por transesterificación con 400 μ l de una solución de HCl:MeOH (4:1 v/v) siguiendo la metodología descrita por Scheuermann y col. (2002); se analizaron por cromatografía gaseosa (Perkin Elmer, Clarus 500) equipado con un detector de ionización de llama (FID) de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo I (ver I.B.1.2.3.a) y se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con los de muestras patrón (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). Por otra parte, con los datos de composición de ácidos grasos se calculó el Índice de Doble Enlace (DBI) de acuerdo a Senanayake y Shahidi (2002). Este índice permite describir el nivel de insaturación del aceite y se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$DBI = [Oleico + Linoleico \times 2 + Linolénico \times 3] / 100$$

IV.2.4.2. Índice de Peróxido, dienos y trienos conjugados

El Índice de Peróxido (IP), (expresado como meq O₂/kg de aceite) y los dienos (K₂₃₂) y trienos (K₂₇₀) conjugados se determinaron siguiendo la metodología descrita en la regulación EEC/2568/91 de la European Union Comision (EEC, 1991).

IV.2.5. Análisis estadístico

Todas las determinaciones analíticas se expresaron como el promedio de mediciones realizadas por triplicado a partir de tres muestras independientes. Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron estimadas por ANOVA con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$) para todos los parámetros evaluados. Siempre que ANOVA indicó diferencias significativas, se realizaron comparaciones pareadas por LSD. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat (versión 1.1).

IV.3. RESULTADOS

La harina empleada en el ensayo de almacenamiento prolongado contenía 33,3% de proteínas, 27,03% de aceite y 5,73% de cenizas (% p/p de sólidos secos).

IV.3.1. Fracción proteica

IV.3.1.1. Actividad proteolítica endógena total y solubilidad proteica en TCA.

La actividad proteolítica endógena y la solubilidad proteica en TCA de las muestras HNP y HNA se muestran en la Tabla IV.1. Durante los primeros tres meses de almacenamiento, las muestras fueron más susceptibles a la hidrólisis endógena, por lo que se observó un aumento en la concentración de péptidos solubles tanto en HNP como en HNA. Después de dicho período no se observaron diferencias ($p \leq 0,05$) entre las muestras tratadas (h) y las no tratadas (Nh). La disminución significativa que se observa a partir del sexto mes en la HNP, coincide con el deterioro oxidativo observado en los perfiles de ácidos grasos e índice de peróxido, dienos y trienos conjugados.

Tabla IV.1: Efectos del tiempo de almacenamiento y el tipo de envase sobre la actividad proteolítica endógena de la harina de nuez, expresada como mg/g proteína.

Meses	HNA		HNP	
	Nh	h	Nh	h
	mg/g proteína	mg/g proteína	mg/g proteína	mg/ proteína
0	68,2 ± 3,2 ^a	104,5 ± 4,2 ^b	67,9 ± 4,8 ^a	95,5 ± 5,1 ^b
1	58,6 ± 4,8 ^a	101,7 ± 4,6 ^b	79,3 ± 12,2 ^a	87,3 ± 16,3 ^b
2	56,5 ± 9,8 ^a	82,8 ± 2,9 ^b	70,0 ± 5,6 ^a	105,7 ± 9,6 ^b
3	74,7 ± 7,3 ^a	84,6 ± 10,9 ^a	85,8 ± 1,1 ^a	85,8 ± 7,9 ^a
4	77,0 ± 5,0 ^a	77,2 ± 12,1 ^a	68,3 ± 1,8 ^a	71,4 ± 1,5 ^a
5	81,1 ± 4,6 ^a	87,9 ± 1,2 ^a	73,2 ± 1,6 ^a	73,9 ± 1,3 ^a
6	60,6 ± 3,9 ^a	83,2 ± 7,5 ^a	24,4 ± 0,9 ^a	24,9 ± 0,2 ^a
7	84,7 ± 3,9 ^a	89,6 ± 6,2 ^a	16,7 ± 1,9 ^a	19,1 ± 0,4 ^a
8	76,1 ± 5,8 ^a	84,6 ± 0,2 ^a	11,7 ± 3,3 ^a	18,8 ± 4,0 ^a

HNA: harina en envase de laminado plástico con cubierta de aluminio. HNP: harina en envase de laminado plástico transparente. Nh: muestras no tratadas. h: muestras tratadas (37°C, 90min). Valores medios con letras diferentes en la misma fila para cada tipo de envase indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

IV.3.1.2. Espectros UV

Los espectros UV de la proteína soluble de HNP y HNA durante el período de almacenamiento se presentan en la Figura IV.1. Para todos los tiempos muestreados, HNP mostró menores valores de absorbancia que HNA. Para las determinaciones de los perfiles UV, se emplearon concentraciones normalizadas de la fracción soluble de cada muestra. Hasta el séptimo mes, la solubilidad proteica de las muestras no mostró una tendencia clara. Por otro lado no hubo correlación significativa entre la solubilidad proteica y la absorbancia a 260 y 280 nm, con lo cual se descarta un posible efecto de la solubilidad proteica sobre la intensidad en la absorción UV.

La mayoría de las proteínas muestran un máximo de absorción a 280 nm, debido principalmente a la presencia de tirosina y triptofano y a 260 nm debido a la fenilalanina. Estos aminoácidos aromáticos están presentes en la harina de nuez en cantidades relativamente altas (Capítulo I, Sze-Tao y Sathe, 2000). Se ha sugerido que los aminoácidos aromáticos son marcadores sensibles del medio en el que se encuentra la proteína (Chem y Barkley, 1998). La reducción en los espectros de absorción UV a lo largo del período de almacenamiento podría deberse a la desnaturalización de las proteínas. Abugoch y col. (2009), encontraron que el efecto del almacenamiento de harinas proteicas provoca desnaturalización proteica al igual que los tratamientos térmicos (Avanza y Añon, 2007). Como resultado de la desnaturalización de las proteínas, los aminoácidos aromáticos pueden quedar ocultos en el ambiente apolar de las proteínas, y provocar una disminución en los valores de absorbancia.

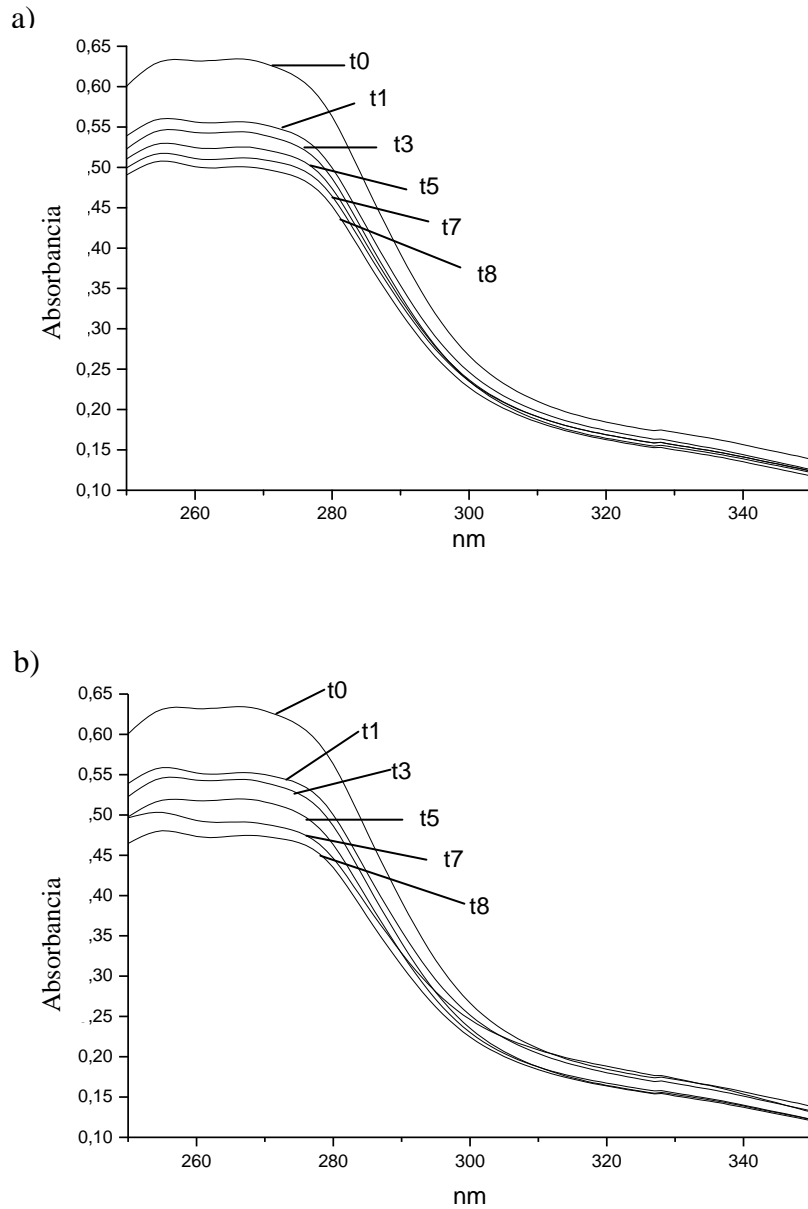


Figura IV.1: Efecto del envase y tiempo (t) de almacenamiento sobre el espectro UV de la proteína soluble. a) HNA y b) HNP.

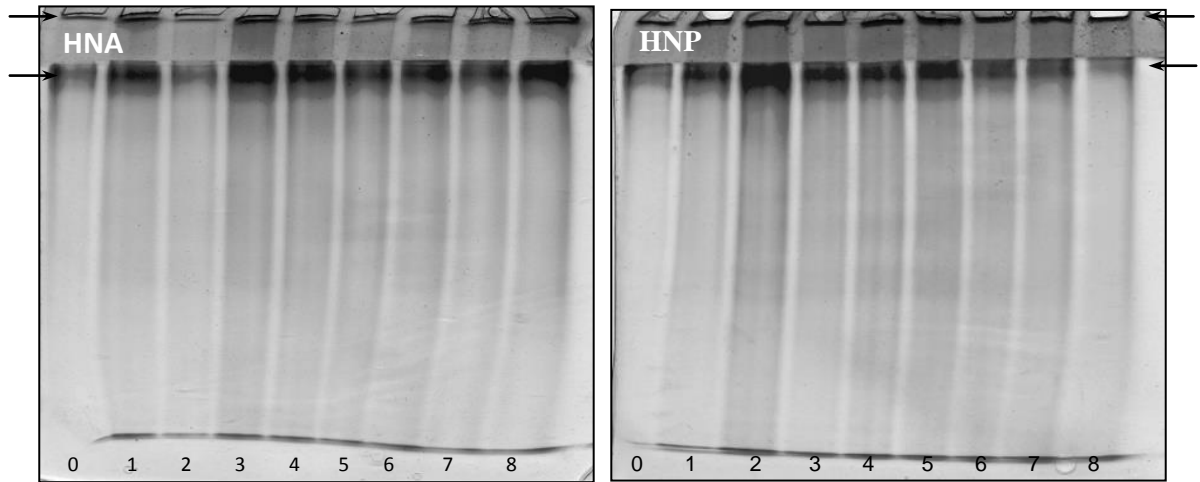
IV.3.1.3. Análisis electroforético

Los perfiles electroforéticos de la proteína soluble en *buffer* fosfato a pH 8 bajo condiciones nativas (no desnaturalizante, no reductoras) se muestran en la Figura IV.2. Las HN almacenadas, tanto en envase plástico (HNP) como en envase plástico con cubierta de aluminio (HNA), mostraron una banda predominante en la parte superior de gel de separación, lo que indica la presencia de proteína de alto peso molecular estabilizada por puentes disulfuro. No se observaron diferencias a nivel molecular a lo largo del período de almacenamiento.

En las electroforesis en ausencia de agente reductor (SDS-PAGE) (Figura IV.3) se evidenciaron dos grupos importantes de polipéptidos tanto en HNP como en HNA a lo largo de los 8 meses de ensayo. El rango de pesos moleculares de estos grupos fue entre 5 – 15 kDa y 35 – 60 kDa (indicado en la figura con corchetes) y parte de la proteína permaneció en la parte superior del gel de separación, indicando la presencia de proteína estabilizada por puentes disulfuro. Resultados similares han sido informados por Sze-Tao y Sathe (2000) para la fracción de glutelinas de nuez, corridas en geles con un gradiente de poli(acrilamida) de 8 a 25%.

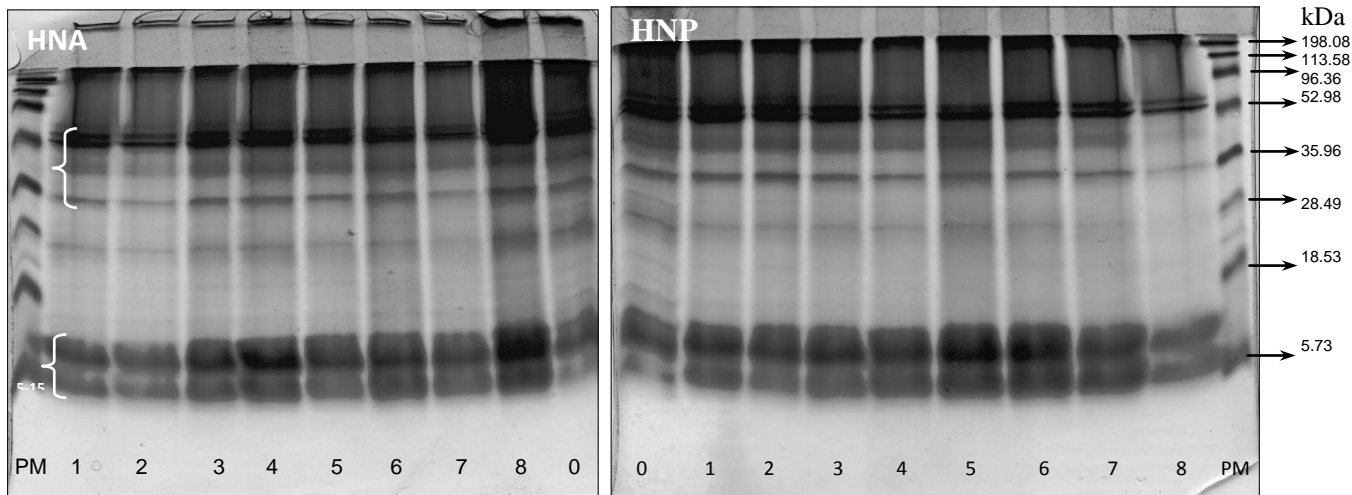
Los resultados de las electroforesis SDS-PAGE con 2-ME se muestran en la Figura IV.4. El total de las proteínas de nuez se compone de un gran número de polipéptidos con pesos moleculares en el rango de 5 a 200 kDa. Las bandas más oscuras corresponden a los pesos moleculares de 80, 60, 52, 38, 35, 20, 7 y 5 kDa. El patrón polipeptídico es similar al informado por Sathe y col. (2009) para las proteínas de nuez bajo condiciones reductoras. Al comparar los patrones de SDS-PAGE en ausencia (Figura IV.3) y presencia (Figura IV.4) de agente reductor (2-ME), la ruptura de los puentes disulfuro provocada por la acción del 2-ME conlleva una reducción en la intensidad de algunas bandas y la desaparición de las bandas correspondientes a los péptidos de alto peso molecular (> 50kDa) que se observan en la SDS-PAGE sin 2-ME. Por otro lado, se observa un aumento del número y la intensidad de las bandas de peso molecular inferior a 50 kDa en los perfiles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. El rango de pesos moleculares en las electroforesis SDS-PAGE se encontraron dentro de los valores reportados para varias proteínas de semillas (Sathe y col., 2009; Abugoch y col., 2009; Sharma y col., 2010).

Teniendo en cuenta los perfiles electroforéticos de ambos tratamientos para cada tiempo de almacenamiento, los patrones son casi idénticos, lo que sugiere que los componentes de las proteínas de la harina de nuez no se ven afectados significativamente por el tiempo de almacenamiento.



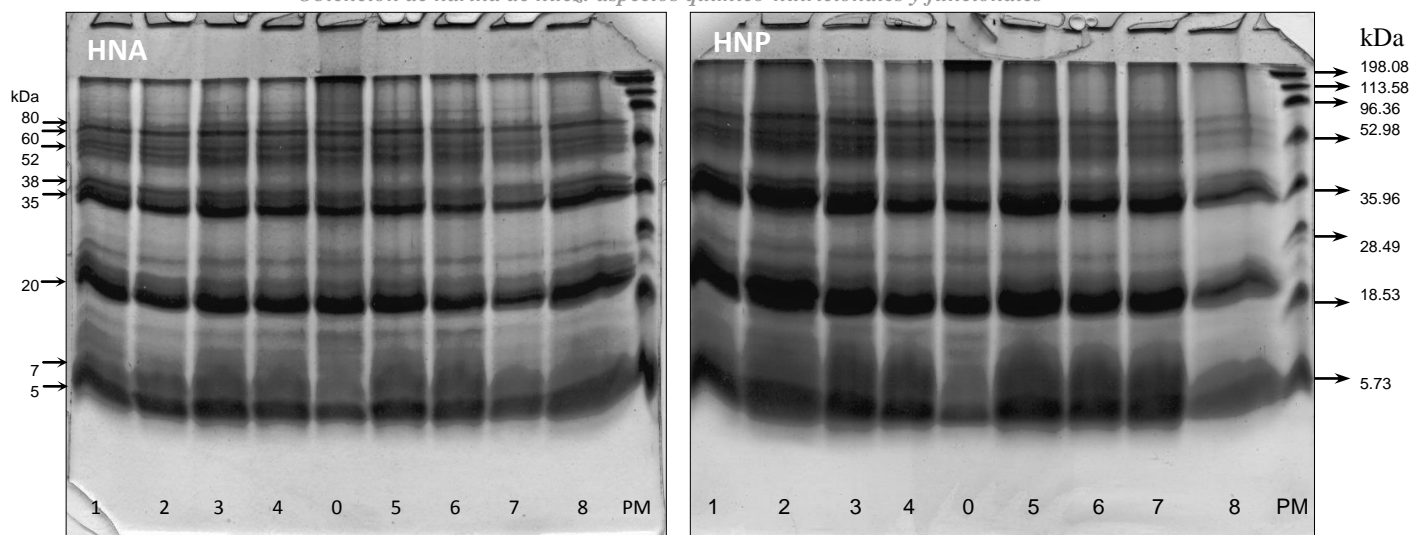
HNA: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico con cubierta de aluminio, HNP: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico

Figura IV.2: Electroferogramas (PAGE-Nativa) de la harina de nuez almacenada 8 meses en dos tipos de envase.



HNA: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico con cubierta de aluminio, HNP: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico. PM: patrones moleculares.

Figura IV.3: Electroferogramas (SDS-PAGE) de la harina de nuez almacenada (8 meses) en dos tipos de envase.

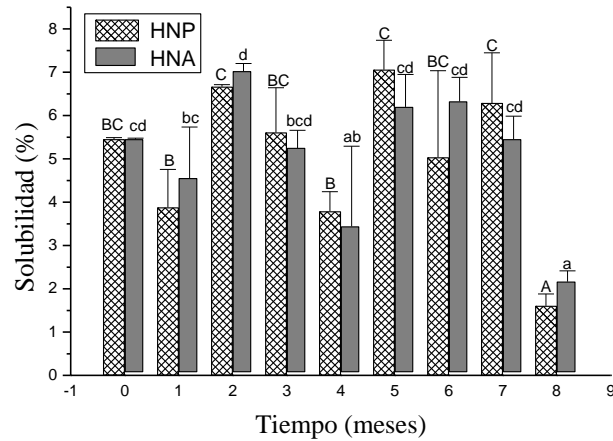


HNA: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico con cubierta de aluminio, HNP: Harina de nuez almacenada en envase laminado plástico. Línea PM: patrones moleculares

Figura IV.4: Electroferogramas (SDS-PAGE con 2-ME) de la harina de nuez almacenada (8 meses) en dos tipos de envase.

IV.3.1.4. Solubilidad proteica

La solubilidad de la proteína en agua a pH natural es un indicador práctico de la desnaturalización y también mide el potencial o la limitación de las proteínas como ingredientes funcionales. El pH natural de la HN fue de 6,5. En el tiempo 0, la solubilidad de la proteína fue de 5,4%, un valor similar al obtenido por Sze-Tao y Sathe (2000) para las proteínas de nuez extraídas en agua. Durante el período ensayado, la solubilidad proteica no difirió significativamente entre HNP y HNA y por otra parte no se observó un comportamiento claro (Figura IV.5). Al final del período de almacenamiento (octavo mes) se constató una disminución significativa en la solubilidad tanto en HNP como en HNA. Este hecho puede estar relacionado con un aumento de la hidrofobicidad en la superficie de las proteínas y la formación de agregados a través de interacciones hidrofóbicas. En las muestras control (-18°C) no se encontraron diferencias en la solubilidad proteica entre el tiempo 0 y 8 (5,71% y 5,73%, respectivamente).



Letras mayúsculas diferentes para HNP y letras minúsculas diferentes para HNA presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Figura IV.5: Efecto del envase y el tiempo de almacenamiento sobre la solubilidad de la harina de nuez (% de la proteína total) envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA). Valores medios de tres determinaciones independientes.

IV.3.1.5. Capacidad de absorción de agua (CAAg)

La capacidad de absorción de agua representa la capacidad de una matriz de absorber y retener agua, la propia y la agregada. Es una característica física importante que afecta la manufactura de los alimentos. Los principales componentes de la HN que mejoran esta propiedad son las proteínas y los hidratos de carbono, ya que contienen cadenas laterales o grupos funcionales polares o cargados.

Las glutelinas, solubles en NaOH, constituyen la principal fracción proteica en la HN ($\cong 70\%$) (Capítulo I; Sze-Tao y Sathe, 2000), son insolubles en agua, por lo que esta fracción contribuye en gran medida con la hidratación de la harina. La CAAg de la HN a tiempo 0 fue de 3,8 ml de agua /g de harina (Figura IV.6). Este valor es superior a los valores reportados por Yu y col. (2007) para harinas fermentadas y sin fermentar de maní crudo y tostado. En base a los datos informados por Tang (2007), la CAAg de la HN es superior a los valores encontrados para productos proteicos de trigo y ligeramente inferiores que los informados para aislados de soja. En comparación con otros frutos secos, la HN presentó mayor CAAg que los aislados, concentrados y harinas obtenidas de castañas de cajú (2,2; 1,74 y 0,81 ml agua/g de muestra, respectivamente) (Ogunwolu y col. 2009).

La CAAg de la HNA no cambió significativamente a lo largo del período de almacenamiento. Por el contrario, una reducción progresiva y significativa en la CAAg (47%) se observó en HNP. Estos resultados pueden indicar una desnaturalización parcial de las proteínas de HNP, que conduce a la exposición de los grupos hidrófobos y a una mayor interacción con la fracción lipídica. Estas interacciones pueden llevar a sucesivas modificaciones de la estructura proteica y la reducción progresiva de la CAAg.

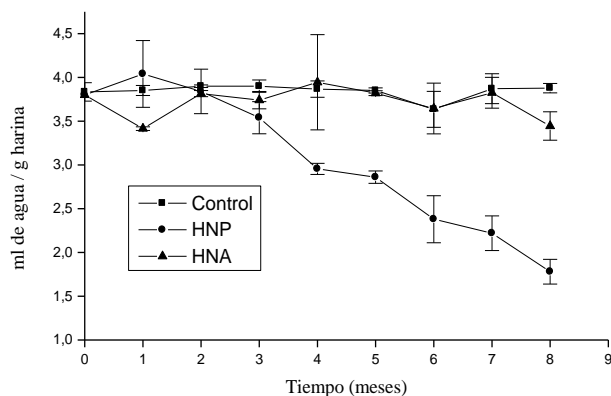


Figura IV.6: Efecto del tiempo de almacenamiento y envase sobre la capacidad de absorción de agua de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).

IV.3.2. Fracción lipídica

IV.3.2.1. Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos del aceite obtenido de las harinas HNP y HNA a lo largo del ensayo se muestra en la Tabla IV.2. La composición inicial se corresponde con los valores obtenidos por Martínez y col. (2010) para la var. Franquette de diferentes orígenes. La composición de ácidos grasos obtenida a partir de las muestras control (-18°C) no se modificó significativamente durante los 8 meses de ensayo. Del mismo modo, los perfiles de ácidos grasos de la harina de nuez almacenada en envase plástico con cubierta de aluminio (HNA) a 25°C se mantuvieron sin cambios a lo largo de la prueba de almacenamiento. Por el contrario, los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados de las muestras de HNP mostraron una disminución significativa en función del tiempo.

Tabla IV.2: Composición en ácidos grasos (%) del aceite extraído de la harina de nuez analizada en función del tiempo de almacenamiento

	HN	Control (-18 °C)		HNA						HNP						
		Tiempo 0	1	6	Tiempo (meses)						Tiempo (meses)					
					1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
16:0	7,08 ^{ab}	6,88 ^{ab}	6,89 ^{ab}	7,22 ^{ab}	6,78 ^{ab}	6,85 ^{ab}	7,16 ^{ab}	6,82 ^{ab}	6,59 ^a	7,07 ^{ab}	7,1 ^{ab}	7,32 ^b	8,27 ^c	8,8 ^c	10,07 ^d	
	±0,23	±0,32	±0,01	±0,23	±0,07	±0,08	±0,06	±0,27	±0,02	±0,2	±0,08	±0,59	±0,15	±0,2	±0,76	
18:0	2,22 ^{bc}	2,22 ^{bc}	2,21 ^{bc}	2,16 ^{bc}	2,04 ^b	2,1 ^{bc}	2,3 ^{bc}	2,19 ^{bc}	2,16 ^{bc}	2,13 ^{bc}	1,59 ^a	2,24 ^{bc}	2,47 ^c	2,36 ^{bc}	3,69 ^d	
	±0,04	±0,01	±0,02	±0,04	±0,15	±0,07	±0,02	±0,01	±0,09	±0,02	±0,1	±0,13	±0,49	±0,33	±0,3	
18:1	23,84 ^{ab}	24,97 ^{abc}	24,61 ^{abc}	25,02 ^{abc}	24,99 ^{abc}	24,96 ^{abc}	25,15 ^{abc}	24,2 ^{abc}	25,46 ^{bc}	23,26 ^a	24,42 ^{abc}	25,95 ^{cd}	28,23 ^e	27,73 ^{de}	33,6 ^f	
	±1,61	±0,07	±0,54	±0,17	±0,15	±0,22	±0,03	±2,15	±0,04	±1,82	±0,2	±1,18	±0,57	±0,79	±0,03	
18:2	53,24 ^b	52,34 ^b	51,97 ^b	53,33 ^b	52,85 ^b	52,96 ^b	52,53 ^b	53,87 ^b	52,9 ^b	53,94 ^b	54,33 ^b	53,48 ^b	54,27 ^b	54,13 ^b	46,56 ^a	
	±1,56	±0,23	±0,33	±0,25	±0,36	±0,37	±0,06	±1,51	±0,08	±1,18	±0,38	±1,1	±1,85	±1,89	±1,17	
18:3	13,61 ^c	13,57 ^c	13,81 ^c	12,18 ^{bc}	13,33 ^c	13,13 ^c	12,84 ^{bc}	12,92 ^c	12,88 ^c	13,58 ^c	12,55 ^{bc}	11 ^b	6,76 ^a	6,96 ^a	6,06 ^a	
	±0,32	±0,03	±0,51	±0,27	±0,00	±0,00	±0,17	±0,39	±0,04	±0,43	±0,39	±3,01	±0,64	±0,56	±0,15	
SFA	9,3 ^a	9,1 ^a	9,11 ^a	9,38 ^a	8,82 ^a	8,95 ^a	9,47 ^a	9,01 ^a	8,76 ^a	9,2 ^a	8,69 ^a	9,57 ^a	10,75 ^b	11,16 ^b	13,76 ^c	
	±0,27	±0,34	±0,01	±0,27	±0,25	±0,15	±0,08	±0,25	±0,07	±0,22	±0,18	±0,72	±0,64	±0,53	±1,07	
MUFA	24,97 ^{abc}	23,27 ^a	23,84 ^{ab}	25,02 ^{abc}	24,99 ^{abc}	24,96 ^{abc}	25,15 ^{abc}	24,2 ^{abc}	25,46 ^{bc}	23,26 ^a	24,42 ^{abc}	25,95 ^{cd}	28,23 ^e	27,73 ^{de}	33,6 ^f	
	±1,61	±0,07	±0,54	±0,17	±0,15	±0,22	±0,03	±2,15	±0,04	±1,82	±0,2	±1,18	±0,57	±0,79	±0,03	
PUFA	66,85 ^{cd}	65,92 ^{cd}	66,86 ^{cd}	65,51 ^{cd}	66,18 ^{cd}	66,09 ^{cd}	65,37 ^{cd}	66,8 ^{cd}	65,78 ^{cd}	67,53 ^d	66,88 ^{cd}	64,48 ^c	61,03 ^b	61,1 ^b	52,62 ^a	
	±1,89	±0,27	±0,18	±0,02	±0,37	±0,37	±0,11	±1,89	±0,03	±1,61	±0,01	±1,91	±1,22	±1,33	±1,02	

HNA: harina de nuez envasada en laminado plástico con cubierta de aluminio; HNP: harina de nuez envasada en laminado plástico. SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. Valores medios con letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p≤0,05).

El índice de doble enlace (DBI), usado como un indicador útil de la degradación de los PUFAS (Senanayake y Shahidi, 2002), fue graficado en función del período de almacenamiento (Figura IV.7). Se puede observar una reducción significativa en el DBI en HNP a partir del segundo mes de almacenamiento, mientras que en las harinas protegidas de la luz (HNA), el DBI no cambió significativamente a lo largo del período de ensayo.

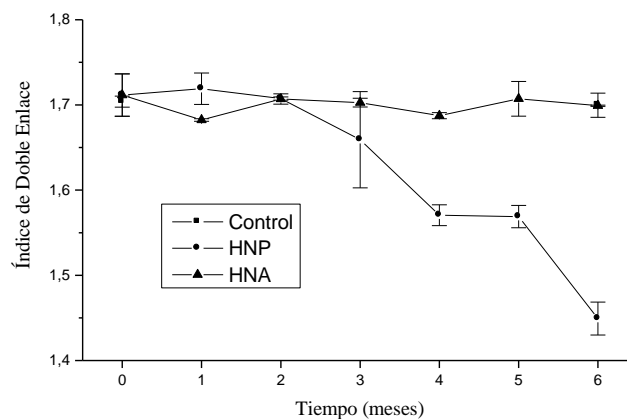


Figura IV.7: Cambios en el Índice de Doble Enlace del aceite extraído de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).

IV.3.2.2. Índice de peróxido (IP), dienos (DC) y trienos conjugados (TC)

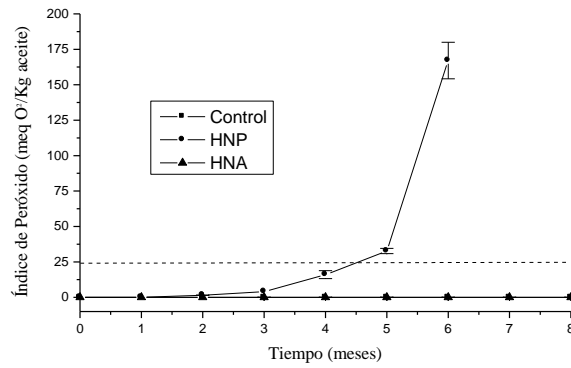
Los peróxidos, DC y TC son productos primarios de oxidación y se presentan durante los primeros estadios de oxidación lipídica. Los cambios en estos parámetros químicos en HNP y HNA se muestran en la Figura IV.8. En el aceite de HNP no varió significativamente el IP hasta el cuarto mes de almacenamiento. Un valor de 25 meq O_2 /kg de aceite, considerado como el límite máximo de aceptabilidad para frutos secos (Özgül, 1993) se alcanzó aproximadamente a los cuatro meses y medio de comenzado el ensayo. A partir de ese momento, el IP del aceite de HNP aumentó rápidamente y alcanzó un valor de 167 meq O_2 /kg de aceite a los 6 meses de almacenamiento. Debido al alto IP obtenido en HNP a los 6 meses, no se realizaron subsecuentes determinaciones de IP, DC y TC así como determinaciones de la composición de ácidos grasos. Por el contrario, el IP de HNA no varió significativamente a lo largo del período de ensayo, y se mantuvo en los valores obtenidos en las muestras control almacenadas en la oscuridad a $-18^\circ C$. Una tendencia similar se observó para los valores de DC. En cuanto a los TC, la muestra de HNP aumentó significativamente

desde 0,09 (tiempo 0) a 0,15 (6^{to} mes) y las muestra de HNA mostraron incrementos significativamente menores.

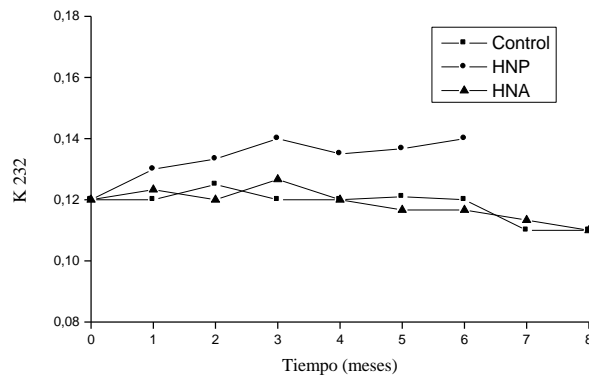
Por otra parte, en el tratamiento HNP, el DBI correlacionó negativamente con los valores de IP ($r^2 = -0,86$, $p \leq 0,01$) y TC ($r^2 = -0,85$, $p \leq 0,01$). En el caso de HNA, no hubo correlación significativa entre estos parámetros. Los resultados descriptos están de acuerdo en general con lo informado por Jensen y col. (2001) quienes demostraron que las nueces sin cáscara, almacenadas en presencia de luz, desarrollan pronunciados cambios oxidativos, mientras que cuando se almacenan en oscuridad presentan una vida útil más larga.

Utilizando condiciones de almacenamiento equivalentes a las empleadas en el presente ensayo (25°C, 800 lux) Martínez (2010) encontró que el aceite de nuez obtenido por prensado y almacenado en botellas con cubierta de aluminio alcanza el periodo de inducción (tiempo necesario para llegar a un valor en el IP de 20 meq O₂/kg de aceite) a los 105 días de almacenamiento. Esto implica que el aceite de nuez extraído es menos estable contra la oxidación que el aceite contenido en la HN. En la harina parcialmente deslipidizada, el aceite remanente podría estar protegido por compuestos fenólicos, la mayoría presentes en el tegumento de la semilla, los que persisten en la harina luego del deslipidizado. Estos compuestos fenólicos presentan fuerte actividad antioxidantes y actividad antirradicalaria como ha sido establecido precedentemente en el Capítulo III y por otros autores en diferentes variedades de nuez (Fukuda y col., 2003; Tsao y col., 2006; Tsao y col., 2007; Ito y col., 2007; Arranz y col., 2008; Zhang y col., 2009).

a)



b)



c)

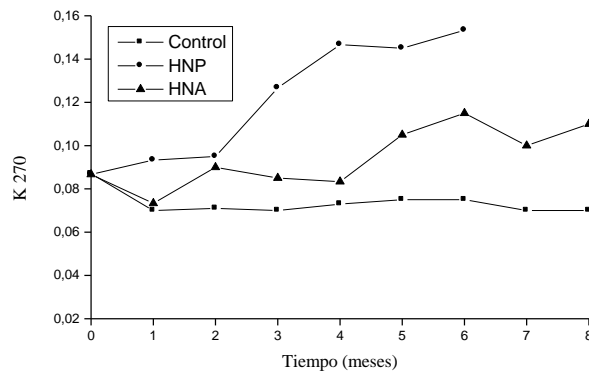


Figura IV.8: Acumulación de peróxidos (a), (b) Dienos conjugados K232 y (c) Trienos conjugados K270, del aceite extraído de la harina de nuez envasada en laminado plástico (HNP) y en laminado plástico con cubierta de aluminio (HNA).

IV.4. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente apartado pusieron en evidencia la influencia de la condición lumínica sobre los parámetros de calidad de la harina de nuez almacenada durante ocho meses. Los envases con barrera de luz, como el laminado plástico con cubierta de aluminio, protegen eficazmente a la HN contra la degradación de los PUFAS y la oxidación del aceite. La fracción lipídica de la HN almacenada en laminado plástico mostró una disminución de los valores de DBI y un aumento en la tasa de oxidación a lo largo del ensayo.

En cuanto a los patrones electroforéticos de las proteínas, se observaron cambios menores entre HNP y HNA. Sin embargo, una reducción progresiva en la capacidad de absorción de agua se registró en HNP.

En síntesis, los datos indican que:

- a) la oxidación de los lípidos es el factor más importante que afecta la calidad de la HN durante el almacenamiento,
- b) el uso de envases con barreras de luz, como el laminado plástico con cubierta de aluminio, resulta en un aumento en la estabilidad lipídica y proteica,
- c) este tipo de material de envasado puede ser utilizado para mantener la calidad de la HN, a temperatura ambiente, por lo menos durante 8 meses de almacenamiento.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se emplearon diversas metodologías que permitieron producir harinas de nuez con diferente composición y características.

Si bien el contenido proteico de las harinas obtenidas por prensado hidráulico y post extracción con disolvente fue mayor que en las obtenidas con la prensa a tornillo, la solubilidad de las mismas resultó baja. Con el proceso que involucró la prensa a tornillo a 50°C se obtuvo una harina cuya solubilidad proteica alcanzó el 33%.

La proteína total soluble de las harinas obtenidas, analizada por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, no fue afectada por los diversos métodos de deslipidizado. Sin embargo, los tratamientos donde se emplearon temperaturas superiores a las ambientales afectaron a las albúminas, y los que involucraron prensado hidráulico afectaron a las globulinas. Estas últimas no sufrieron alteración con la prensa a tornillo pero, el residuo obtenido a 70°C resultó oscuro, compacto, duro y de baja porosidad.

La utilización de prensa a tornillo empleando una temperatura de 50°C es una alternativa práctica, económica y apropiada, para la obtención de harina de nuez.

De acuerdo a las características de la harina obtenida con la prensa a tornillo a 50°C se resolvió profundizar el estudio sobre la misma (HN) y sobre la obtenida mediante una post extracción con disolvente (HNDeslip). Dadas las propiedades químico-nutricionales evaluadas, se las puede considerar como un alimento proteico, reducido en calorías, que contine aceite con ácidos grasos de la familia ω 3 y 6, con buen aporte de elementos minerales (K, Zn, Fe y P) y con compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

Además, HN y HNDeslip fueron evaluadas en sus propiedades funcionales. Ambas harinas presentaron una buena capacidad de absorción de agua, debido a la baja solubilidad de la proteína mayoritaria. También presentaron elevada capacidad de absorción de aceite, lo que las torna adecuadas para retener sabores y como vehículo de sustancias liposolubles.

La capacidad emulsionante, en comparación con la harina de soja, fue baja. El tipo de proteína mayoritaria determinó una baja solubilidad y migración de la misma hacia la interfase. En general, la presencia de lípidos propios de la muestra en HN, ejerció efecto en la capacidad emulsionante, disminuyó la actividad emulsionante y favoreció la estabilidad. En relación a la capacidad de gelificación, la presencia de lípidos mejoró la formación del gel, sin

embargo los geles resultaron débiles. Se plantea la necesidad de profundizar en las propiedades de los geles que se forman con las harinas de nuez con el objetivo de definir sus posibles aplicaciones.

La harina de nuez presentó abundante cantidad de compuestos fenólicos, con actividad antioxidante frente al DPPH•. Se determinó que estos compuestos, que provienen en su mayor parte del tegumento seminal, forman complejos insolubles con las proteínas y disminuyen su solubilidad.

La presencia de estos compuestos podría interpretarse como un inconveniente a la hora de proponer la utilización de la harina de nuez como fuente proteica. Sin embargo, con soluciones etanólicas al 70% se logró extraer efectivamente los compuestos fenólicos de las harinas. En este sistema disolvente las proteínas presentaron la menor solubilidad, por lo que puede utilizarse para la extracción de fenoles sin perjuicio de afectar el rendimiento proteico. Es así que con la extracción alcohólica de los compuestos fenólicos se podrían obtener dos productos diferenciados: harinas con mayor disponibilidad proteica y extractos fenólicos cuyas propiedades permitirían su utilización como antioxidante natural.

Además, y debido a que el contenido de aceite retenido en la harina de nuez procedente de la prensa a tornillo es alto (30%) y altamente insaturado, se evaluó el efecto de dos tipos de envases sobre la estabilidad oxidativa del aceite y de la proteína, durante el almacenamiento prolongado. Se encontró que la fotooxidación fue el factor más importante que afectó la calidad de la harina, y el envase con barrera de luz, protegió a la harina contra la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados y resultó más efectivo en la estabilidad de la proteína.

Los resultados obtenidos en este trabajo, tanto por las características químico-nutricionales como por las propiedades funcionales estudiadas muestran que tanto la harina de nuez (HN) como la harina de nuez deslipidizada mediante post extracción con disolvente (HNDeslip) podrían emplearse como tales o en la elaboración de productos de mayor valor agregado como concentrado y/o aislados proteicos, así como para la obtención de extractos fenólicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch L., Martínez N., Añón M.C. (2003). Influence of the extracting solvent upon the structural properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4060–4065
- Abugoch L., Castro E., Tapia C., Añón M.C., Gajardo P., Villarroel A. (2009). Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 2013-2020.
- Adebowale K.O., Lawal O.S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*, **83**, 237-246
- Adebowale K.O., Lawal O.S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flour. *Food Research International*, **37**, 355-365.
- Adebowale Y.A., Adebowale K.O. (2008). Evaluation of the gelation characteristics of mucuna bean flour and protein isolate. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7**, 3206-3222.
- Adebowale Y.A., Adeyemi I.A., Oshodi A.A. (2005). Functional and physicochemical properties of flours of six Mucuna species. *African Journal of Biotechnology*, **4**, 1461-1468.
- Ahrens S., Venkatachalam M., Mistry A.M., Lapsley K., Sathe S.K. (2005). Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, **60**, 123-128.
- Alaiz M., Navarro J.L., Girón J., Vioque E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, **591**, 181-186.
- Albert C.M., Gaziano J.M., Willett W.C., Manson J.E. (2002). Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the physicians' health study. *Archives of Internal Medicine*, **162**, 1382-1387.
- Allín M.G., Montenegro M., Martínez M.L., Labuckas D.O., Lamarque A.L., Ribotta P.D. (2010). Calidad de pastas elaboradas con harina de trigo y sólidos de nuez. *2º Congreso*

Internacional en Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Mendoza, Argentina. 20 y 21 de agosto.

Allín M.G., Martínez M.L., Labuckas D.O., Marín M.A., Ribotta P.D., Lamarque A.L. (2010). Contenido proteico, fenoles y capacidad antioxidante de pasta fresca laminada elaborada con harina de trigo y sólidos de nuez. *2º Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los Alimentos*. Mendoza, Argentina. 20 y 21 de agosto.

Amaral J.S., Casal S., Pereira J.A., Seabra R.M., 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. (2001). Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition*, **131**, 2837-2842.

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., Washington, DC, USA.

Aoki H., Taneyama O., Ubanu M. (1980). Emulsifying properties of soy proteins: characteristics of 7S and 11S proteins. *Journal of Food Science*, **45**, 534-538.

Arcan I., Yemenicioglu A. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 184-188.

Arranz S., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. (2008). Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*, **227**, 425-431.

Avanza M.V., Añón M.C. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 616-623.

Avanza M.V., Puppo M.C., Añón M.C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*, **19**, 889-898.

Ayo J., Carballo J., Solas M.T., Jiménez-Colmenero F. (2008). Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content. *Food Chemistry*, **107**, 1547-1552.

- Badui-Dergal S. (1999). *Química de los Alimentos*. Addison-Wesley Longman (Ed.). México.
- Badui-Dergal S., Bourges Rodríguez H., Anzaldúa Morales A. (2003). Proteínas. En: *Química de los Alimentos*. Pearson Educación (Ed). pp. 123-212.
- Barbut S. (1999). Determining water and fat holding. En: *Methods of testing protein functionality*. Hall G.M. (Ed.). Blackie Academic and Professional. New York, pp. 186-225.
- Bernardino-Nicanor A., Scilingo A.A., Añón M.C., Dávila Ortiz G. (2005). Guava seed storage protein. Fractionation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*, **53**, 3613-3617.
- Bockish M. (1998). Extraction of vegetable oils. En: *Fats and oils handbook*. AOCS (Ed.). Press Champaign, USA.
- Bradford M.A. (1976). Rapid sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Buera M.P., Pollio M.L., Pilosof A.M., Bartholomai G. B. (1983). Cinética de la pérdida de solubilidad y de lisina disponible en harinas de protos tratadas térmicamente. *Rev. Agroquím. Technol. Alimentos*, **23**(2), 262.
- Bulló M., Nogués M.R., López-Uriarte P., Salas-Salvadó J., Romeu M. (2010). Effect of whole walnuts and walnut-skin extracts on oxidant status in mice. *Nutrition*, **26**, 823-828.
- Carvalho M., Ferreira P.J., Mendes V., Silva R., Pereira J.A., Jerónimo C., Silca B.M. (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 441-447.
- Castimpoolas N., Meyer C. (1979). Gelation phenomenon of soybean globulins I. Protein-protein interaction. *Cereal Chemistry*, **47**, 559-570.
- Chau C.F., Cheung P.C.K. (1998). Functional properties of flour prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, **61**, 429-433.
- Cheftel J.C. (1989). En *Proteínas Alimentarias*; Ch. 4. Acribia (Ed.). Zaragoza, pp 49-100.
- Chen Y., Barkley M.D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, **37**, 9976-9982.

Código Alimentario Argentino (CAA). <http://www.anmat.gov.ar>

- Cofrades S., Serrano A., Ayo J., Carballo J., Jiménez-Colmenero F. (2008). Characteristics of meat batters with added native and preheated defatted walnut. *Food Chemistry*, **107**, 1506-1514.
- Colaric M., Veberic R., Solar A., Hudina M., Stampar F. (2005). Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6390-6396
- Colombo A., León A.E., Ribotta P.D. (2011). Rheological and calorimetric properties of corn-, wheat-, and cassava-starches and soybean protein concentrate composites. *Starch/Stearke*, **63**, 83-95.
- Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guiet S., Winkelmann W. (2005). Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4853-4860.
- Crowe T.D., Crowe T.W., Johnson L.A., White P.J. (2002). Impact of extraction method on yield of lipid oxidation products from oxidized and unoxidized walnuts. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **79**, 453-456.
- Damodaran S. (1989). Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **11**, 2-8.
- Damodaran S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. En: Food proteins and their applications. Damodaran S., Paraf A., Dekker M. (Ed.). New York, pp 57-110.
- Demir C., Cetin M. (1999). Determination of tocopherols, fatty acids and oxidative stability of pecan, walnut and sunflower oils. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **95**, 278-282.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., González L., Tablada M., Díaz M.D.P, Robledo C., Balzarini M. (2008). Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Séptima edición. Brujas (ed). Córdoba, Argentina.
- EEC. (1991). Characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods. Regulation EEC/2568/91 and latter modifications. *Official Journal of the European Communities*, **L248**, 1-82.

- Eltayeb A.R.S.M., Ali A.O., Haron R. (2010). The chemical composition of Pigeon pea (*Cajanus cajana*) seed and functional properties of protein isolate. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9:1069-1073.
- FAO Food and Agricultural Organization of the United Nations. (disponible en: <http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/economic/faodef/FAODEFS/H53F.HTM#>)
- FAO/OMS: Food and Agricultural Organization of the United Nations /Organización Mundial de la Salud (disponible en: <http://new.paho.org/index.php>).
- FAO/OMS (2003): (disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916_spa.pdf)
- FAO/OMS (2004) (disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/DD/PUB/alimentaci%C3%B3n-y-nutrici%C3%B3n.pdf>).
- Fasasi O.S. (2009). Proximate, antinutritional factors and functional properties of processed Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*). *Journal of Food Technology*, 7, 92-97.
- Feinberg M., Favier J.C., Ireland-Riper J. (1987). Repertoire général des aliments (INRA), Technique et documentation. Lavoisier (Ed.). Paris, P 189.
- Fennema O. (2000). Química de los Alimentos. 2º Acribia (Ed.). Zaragoza, España, pp 433-469.
- Fernández-López J., Aleta N., Alía R. (2000). Forest genetic resources conservation of *Juglans regia* L. IPGRI, Rome, Italy.
- Fleming S.E., Sosulski F. (1975). Gelation and thickening phenomena of vegetable protein products. *Journal of Food Science*, 40, 805-807.
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnut (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, 63, 795-801.
- Gallardo M. (2005). Soja: harinas de extracción para la alimentación del ganado. Un análisis de las cualidades nutricionales de los distintos tipos de acuerdo al método de extracción utilizado. EEA INTA Rafaela.
- Gallo. (2008). (<https://sites.google.com/a/agro.uba.ar/newsletter-paa/newsletter-no-15/el-negocio-de-la-nuez-de-nogal-en-la-argentina>).

- Gálvez M., Martín-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1927-1933.
- García-Parrilla M.C., Cantos E., Troncoso A.M. (2009). Analysis of melatonin in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 177-183.
- Gómez-Caravaca A.M., Verardo V., Segura-Carretero A., Caboni M.F., 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.
- Gorinstein S., Delgado-Licon E., Pawelzik E., Permad H.H., Weisz M., Trakhtenberg S. (2001). Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5595-5601.
- Granito A., Guerra M., Torres A., Guinand J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*. *Interciencia*, **29**, 521-526.
- Grave L.C., McCranahan G., ACEI L., Snyder R., Nelly K., Goldhawk D. (1992). Variation in polyunsaturated fatty acids composition of Persian walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**, 518-522.
- Gunduc N., El S.N. (2003). Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Food Science*, **68**, 2591-2595.
- Haldimann E., Carter J., Kuranaliev R., Kamyrov M. (2000). The potential for collaborative forest management in the juniper (*archa*) forests of Kyrgyzstan. Paper presented at the International Symposium on Juniper Forest Management Problems, Osh, Kyrgyzstan, 7-11, August.
- Halvorsen B., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A., Haffner K., Baugerod H., Andersen L.F., Moskaug J., Jacobs D.R., Blomhoff R. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*, **132**, 461-471.

- Hardman W.E., Ion G. (2008). Suppression of implanted MDA-MB 231 human breast cancer growth in nude mice by dietary walnut. *Nutrition and Cancer*, **60**, 666-674.
- Idouraine A., Yensen S.B, Weber C.W. (1991). Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. *Journal of Food Science*, **56**, 1316-1319.
- InfosStat (2008). *Manual del usuario*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Segunda Edición, Brujas (Ed.). Argentina.
- Ito H., Okuda T., Fukuda T., Hatano T., Yoshida T. (2007). Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 672-679.
- Jensen P.N., Sorensen G., Engelsen S.B., Bertelsen G. (2001). Evaluation of quality in walnut kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5790-5796.
- Jitngarmkusol S., Hongsuwankul J., Tananuwong K. (2008). Chemical composition, functional properties, and microstructure of defatted macadamia flours. *Food Chemistry*, **110**, 23-30.
- Kalckar H.M. (1947). Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **167**, 461-475.
- Kinsella J.E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **7**, 219-280.
- Klepping J., Guillard J.C., Fuchs F., Marcer I., Houard-Malval M. (1989). Recueil de données sur la composition des aliments, CEIV, Roche, Neuilly sur Seine, p. 128.
- Kölsal A.I., Artik N., Simsek A., Günes N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry* **99**, 509-515.
- Kornsteiner M., Wagner K.H., Elmadfa I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, **98**, 381-387.
- Labuckas D.O. (2005). Utilización de harinas de soja y maní en la elaboración de productos de panificación: aspectos químicos, nutricionales y sensoriales Tesis de Maestría. Córdoba, Argentina. Universidad Católica de Córdoba.

- Lavedrine F., Zmirou D., Ravel A., Balducci F., Alary J. (1999). Blood cholesterol and walnut consumption: a cross-sectional survey in France. *Preventive Medicine*, **28**, 333-339
- Lawal O.S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: Effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, **86**, 345-355.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lin M.J.Y., Humbert E.S., Sosulski F.W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, **39**, 368–370.
- Lqari H., Vioque J., Pedroche J., Millán F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, **76**, 349-356.
- Maestri D.M., Labuckas D.O., Meriles J.M., Lamarque A.L., Zygadlo J.A., Guzman C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**, 494-498.
- Maestri D.M., Nepote V., Lamarque A.L., Zygadlo J.A. (2006). Natural products as antioxidants. En: *Phytochemistry: Advances in research*. Imperato F. (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, pp. 105-135.
- Maguire L.S., O`Sullivan S.M., Galvin K., O`Connor T.P., O`Brien N.M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnut, almond, peanut, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **55**, 171-178.
- Makri E., Papalamprou E., Doxastakis, G. (2005). Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **19**, 583-594.
- Makri E.A., Papalamprou E.M. Doxastakis G.I. (2006). Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 1855-1862.

- Mao X., 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.
- Martínez E.N., Añón M.C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2523-2530.
- Martínez M., Sosa M., Labuckas D., Mattea M., Maestri D.M. (2005) Obtención y caracterización de aceites de nuez (*Juglans regia* L.). XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Buenos Aires, Argentina. Noviembre.
- Martínez M.L., Mattea M., Maestri D.M. (2006). Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **83**, 791-796.
- Martínez M.L., Maestri D.M. (2008). Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 1183-1189.
- Martínez M.L. (2010). Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L.): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa. Tesis Doctoral. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- Martínez M.L., Labuckas D.O., Lamarque A.L., Maestri D.M. (2010). Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1959-1967.
- Mattea M.A. (1999). Fundamentos sobre el prensado de semillas oleaginosas. *Aceites y Grasas*, 427-431.
- Méndez J.M., Covacevich M., Capurro J. (2010). Procesamiento del grano de soja en la provincia de Santa Fe mediante extrusado y prensado. En: Para mejorar la producción 45 de INTA-EEA-OLIVEROS.
- Mercosur (2003): (disponible en: <http://www.mercosuronline.com/>).
- Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*, **19**, 312S-319S.

- Meriles J.M., Lamarque A.L., Labuckas D.O., Maestri D.M. (2004). Effect of fungal damage by *Fusarium* spp and *Diaporthe/Phomopsis* complex on protein quantity and quality of soybean seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**, 1594-1598.
- Morgan J., Horton K., Reese D., Carey C., Walker K., Capuzzi D. (2002). Effects of walnut consumption as part of low fat, low-cholesterol diet on serum cardiovascular risk factors. *Internation Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **72**, 341-347.
- Nunes M.C., Batista P., Raymundo A., Alves M., Sousa I. (2003). Vegetable proteins and milk puddings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **31**, 21-29
- Ogunwolu S.O., Henshaw F.O., Mock H-P., Santos A., Awonorin S.O. (2009). Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food Chemistry*, **115**, 852-858.
- Oseni K., Owolarafe M., Faborode O., Obafemi O.A. (2002). Comparative evaluation of the digester–screw press and a hand-operated hydraulic press for palm fruit processing. *Journal of Food Engineering*, **52**, 249-255.
- Osborne T. (1924). En: *The Vegetable Proteins*. 2da. edición. Longmans y Green (Ed.). Nueva York.
- Otte J., Schumacher E., Ipsen R., Ju Z., Qvist K.B. (1999). Protease induced gelation of unheated and heated whey proteins. Effects of pH, temperature and concentration of proteins, enzyme and salt. *International Dairy Journal*, **9**, 801-812.
- Özgül E. (1993). The effects of temperature and moisture content of lipid peroxidation during storage of unblanched salted roasted peanuts. Shelf life studies for unblanched salted roasted peanut. *International Journal of Food Science and Technology*, **28**, 193-199.
- Payne T. (1985). California walnuts and light foods. *Cereal Foods Word*, **30**, 215-218.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, **133**, 2812-2819.
- Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L. (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2103-2111.

- Petrucelli S. (1993). Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Petrucelli S., Añón M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 2161-2169.
- Pilosof A.M.R. (2000). Propiedades de hidratación. En Caracterización funcional y estructural de proteínas, Cap. 1. Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B. (Ed). Eudeba, CYTED. Buenos Aires, Argentina, pp 17–28.
- Prasad R.N.B. (1993). Walnuts and pecans. En: Encyclopedia of Food Science and Technology, Vol II. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (Ed.). Academic Press. London, pp 4828-4834.
- Prasad R.B.N. (2003). Walnuts and pecans. En: Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Academic Press, London, pp. 6071-6079
- Primo Yúfera E. (1979). Química de los Alimentos III. Alhambra Editorial, España.
- Ramírez A., Delahaye E.P. (2009). Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, **34**, 293-298.
- Ravai M. (1992). Quality characteristics of California walnut. *Cereal Foods Word*, **37**, 362-366.
- Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D. (2005). Melatonin in walnut: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*, **21**, 920-924
- Riccardi G., Rivellesse A., Williams C. (2003). The cardiovascular system. En: Nutrition and metabolism. Gybney M., MacDonald I., Roche, H. (Ed.). Blackwell Sci. Ames, Iowa, pp. 224-245.
- Ros E. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, **2**, 652-682.
- Sabaté J., Radak T., Brown J. (2001). The role of nuts in cardiovascular disease prevention. En: Handbook of nutraceuticals and functional foods. Wildman R.E.C. (Ed.). CRC Press Boca Raton, USA, pp. 477–495.
- Sangronis E., Machado C., Cava R. (2004). Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Cajan cajan*) germinadas. *Interciencia*, **29**, 80-85.

- Sathe S.K. (2002). Dry bean protein functionality. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **22**, 175-223.
- Sathe S.K., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (1982). Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis* L.) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science*, **47**, 491-497.
- Sathe S.K., Venkatachalam M., Sharama G.M., Kshirsagar H.H., Teuber S.S., Roux K.H. (2009). Solubilization and electrophoretic characterization of select edible nut seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 7846-7856.
- Savage G.P., Dutta P.C., McNeil D.L. (1999). Fatty acid, tocopherol content and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **76**, 1059-1063.
- Savage G.P. (2001). Chemical composition of walnut (*Juglans regis* L.) grown in New Zealand. *Plant Foods for Human Nutrition*, **56**, 75-82.
- Scheuermann E., Cea M., Schoch S., Ojeda M., Ihl M. (2002). Estudio de la estabilidad de aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y con adición de oleoresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante el almacenamiento en oscuridad. *Grasas y Aceites*, **53**, 289-297.
- Senanayake S.P.J.N., Shahidi F. (2002). Chemical and stability characteristics of structured lipids from borage (*Borago officinalis* L.) oils. *Journal of Food Science*, **67**, 2038-2045.
- Sharma G.M., Su M., Joshi A.U., Roux K.H., Sathe, S.K. (2010). Functional properties of select edible oilseed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5457-5464.
- Siddhuraju P., Mohan P.S., Becker K. (2002). Studies in the antioxidant activity of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, **79**, 61-67.
- Simopoulos A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **56**, 365-379.
- Singh J., Bargale P.C. (2000). Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, **43**, 75-82.
- Singh K.K., Wiesenborn D.P., Tostenson K., Kangas N. (2002). Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **79**, 165-170.

- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. (1994). Food composition and nutrition tables. Medpharm, CRC Press, Stuttgart, pp. 955-956.
- Sze-Tao K.W.C., Sathe S.K. (2000). Walnut (*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.
- Tang C-H. (2007). Functional properties and in vitro digestibility of buckwheat protein products: influence of processing. *Journal of Food Engineering*, **82**, 568-576.
- Tapia O.C. (2004). En Bioquímica de los Procesos Metabólicos. Reverté (Ed.). Pp. 94-96.
- Thomas M.C., Schumann D.R. (1992). Seeing the forest instead of the trees - Income opportunities in special forest products. Kansas City, Missouri, Midwest Research Institute.
- Tobares L., Guzmán C.A. Maestri D.M. (2003). Effect of the extraction method and blanching on jojoba (*Simmondsia chinensis*) wax quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 749-753.
- Tsamouris G., Hatziantoniou S., Demetzos C. (2002). Lipid analysis of Greed walnut oil (*Juglans regia* L.). *Z. Naturforsch*, **57**, 51-56.
- USDA. (2000). United States Department of Agriculture. National Agricultural Library. <http://www.nal.usda.gov>
- Vanhanen L.P., Savage G. P. (2006). The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperature using three different types of packaging. *Food Chemistry*, **99**, 64-69.
- Vázquez D.E., Polenta G.A. (2012). disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/valor-agregado-en-origen-aportes-de-inta-y-extra-inta/agregado-de-valor-a-las-frutas-argentinas-programa-nacional-frutales-proyecto-integrado-de-poscosecha-e-industrializacion-de-fruta>
- Veiga-Santos P., Suzuki C.K., Cereda M.P., Scamparini A.R.P. (2005). Microstructure and color of starch-gum films: Effect of gum deacetylation and additives. Part 2. *Food Hydrocolloids*, **19**, 1064-1073.
- Venkatachalam M., Sathe S.K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4705-4714.

- Voutsinas L.P., Nakai S., Harwalkar V.R. (1983). Relationship between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, **16**, 185-190.
- Wagner J. (2000). Propiedades superficiales. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Bartholomai G., Pilosof A. (Ed.). Cyted, Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina, pp 55-70.
- Wagner J.R., Sorgentini D.A., Añón M.C. (2002). Relación entre propiedades fisicoquímicas e hidrodinámicas de aislados de soja commercial y de laboratorio. En: Proteínas y Polisacáridos como Ingredientes Funcionales. Añón M.C., Pilosof A.M. (Ed.). Edulp; La Plata, Argentina, pp 87-96.
- Wardlaw G.M. (1999). Perspectives in nutrition. McGraw-Hill, New York, USA.
- Wheatcroft S., Noronha B., Kearney M. (2005). The heart and blood vessels. En: Clinical Nutrition. Gibney M., Elia M., Ljungqvist O., Dowsett J. (Ed.). Blackwell Sci. Ames, Iowa, pp. 268-293.
- Wiesenborn D., Doddapaneni R., Tostenson K., Kangas N. (2001). Cooking indices to predict screw-press performance for crambe seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **78**, 467-471.
- Wiltoon P., Larry R. Beuchat K., Dixon P. (1997). Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour as affected by soaking, o, and fungal fermentation. *Journal of Food Science*, **45**, 480-486.
- Xu L., Diosady L.L. (2000). Interactions between canola protein and phenolic compounds in aqueous media. *Food Research International*, **33**, 725-731.
- Xu L., Diosady L.L. (2002). Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International*, **35**, 23-30.
- Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. (2007). Peanut protein concentrates: production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, **103**, 121-129.
- Zambon D., Sabate J., Muñoz S., Campero B., Casals E., Merlos M. (2000). Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women: a randomized crossover trial. *Annals of Internal Medicine*, **132**, 538-546.

- Zayas J.F. (1997). *Functionality of protein in food*. Heidelberg (Ed.). Springer. Berlin.
- Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T., Wang Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, **113**, 160-165.
- Zhang J.L., Gao F., Lin Y.J., Wang Y.Y., Yang C.T., Zhang F., Li Y.H., Li X.D. (2013). Differences in seed kernel quality and related enzyme activities of different quality type peanut cultivars. *Chinese Journal of Applied Ecology*, **24**, 481-487.
- Zheng Y., Wiesenborn D.P., Tostenson K., Kangas N. (2003). Screw pressing of whole and dehulled flaxseed for organic oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **80**, 1039-1045.
- Zlatanov M., Ivanov S., Aitzetmuller K. (1999). Phospholipid and fatty acid composition of Bulgarian nut oil. *Fett-Lipid*, **101**, 437-439.