

**FORMULACIÓN DE UNA MATERIA PRIMA CON COMPETENCIA TECNOLÓGICA  
PARA SER APLICADA EN EL DISEÑO DE ALIMENTOS LIBRES DE GLUTEN  
MEJORADOS NUTRICIONALMENTE**

Trabajo de Investigación presentado por:

**CAROLINA ÁLVAREZ RESTREPO**

Como requisito para optar al título de  
Magíster en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Tutora: MSc. Seneida María Lopera Cardona

Cotutora: Dra. Cecilia Gallardo Cabrera



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

1 8 0 3

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
MEDELLÍN  
2014**

Trabajo de investigación presentado en el marco del proyecto:

“DESARROLLO DE UNA MULTIMEZCLA CON VALOR AGREGADO NUTRICIONAL  
A PARTIR CULTIVOS REGIONALES PARA SER APLICADA EN LA  
FORMULACIÓN Y EL DISEÑO DE PRODUCTOS INNOVADORES DE ALTA  
ACEPTABILIDAD Y CON POTENCIALIDAD DE IMPACTO EN LA  
SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL DEL PAÍS”  
CODI N° CIQF 138-2010

**Grupo de Investigación**

Estabilidad de Medicamentos, Cosméticos y Alimentos

**Directora**

Dra. Cecilia Gallardo Cabrera



**FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

## DEDICATORIA

Con todo mi cariño dedico este trabajo,

**A mis padres,**  
*quienes durante toda mi vida me han brindado su amor, comprensión y apoyo incondicional; siendo testigos de mi crecimiento personal, académico y profesional. Gracias por darme este maravilloso hogar, por enseñarme a no rendirme, por ayudarme a cumplir mis sueños, por cada palabra de aliento, por cada abrazo, por creer en mí; a ustedes les debo todo lo que soy como ser humano: mis valores, mis principios, mi empeño y perseverancia. Me siento muy orgullosa y soy muy afortunada de tenerlos como ejemplo.*

**A mi hermano,**  
*quien ha sido un compañero de vida. Gracias Sebas por estar conmigo en mis victorias y no abandonarme en mis derrotas, por alentarme a continuar, mil gracias por tus sonrisas, por tu paciencia y por llenar mi vida de alegría y amor cuando más lo he necesitado.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora y amiga Seneida María Lopera Cardona, por creer en mí y darme la oportunidad de aprender, por mostrarme mi profesión desde otra perspectiva, por despertar en mí el amor por los granos y cereales, por ayudarme a realizar mis sueños, por sus orientaciones y consejos bajo su tutoría, por estar conmigo en los momentos difíciles proporcionándome soluciones y recursos para la culminación de mi trabajo.

A todos los integrantes del grupo de investigación de Estabilidad de Medicamentos, Cosméticos y Alimentos, especialmente a su directora Cecilia Gallardo, por aceptarme, creer en mi proyecto y brindarme los recursos.

Al profesor Herley Casanova por su tiempo, confianza, enseñanzas y especialmente por ayudarme a superar mis temores y crecer como ser humano.

A mis profesores de la maestría que dieron lo mejor de sí y con sus lecciones y experiencias me formaron para los retos profesionales que se han de presentar.

A mis amigos Jairo, Lina, Edwin, Fredy, Johanna, Yamilé y a mi prima Cristina por sus conocimientos, su apoyo emocional, sus palabras de aliento y especialmente por perdonar mis ausencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD, ubicado en Hermosillo, México; especialmente a la Dra. Ana María Calderón de la Barca por recibirme y poner a disposición las instalaciones y sus recursos, a Nina Heredia, Rene Valenzuela, Pame Granados y Denisse Rangel por su tiempo, colaboración y enseñanzas.

A la Universidad de Antioquia, su Facultad de Química Farmacéutica, su dirección de Relaciones Internacionales y su Comité Central de Posgrados por el apoyo.

A cada una de las personas y entidades que directa o indirectamente aportaron para la culminación de este trabajo de investigación; a las profesoras Cristina Valencia y Diana Granda, a mis colegas y amigos Juan Daniel Restrepo, Catalina Yepes, Sandra Yáñez y Stefany de la Hoz, a los estudiantes de Proyecto Comunitario de la Facultad de Química Farmacéutica.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	10
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
ESTRUCTURA DE LA METODOLOGÍA APLICADA.....	12
1. ESTADO DEL ARTE SOBRE EL GLUTEN EN LOS ALIMENTOS Y SU RELACIÓN CON LA SALUD .....	13
1.1 Proteínas de los cereales.....	13
1.1.1 Proteínas funcionales del grano.....	13
1.1.2 Proteínas de reserva y estructurales del grano .....	14
1.1.3 Gluten de trigo .....	15
1.2 Enfermedades asociadas al consumo de gluten .....	17
1.2.1 Enfermedad celiaca (EC).....	18
1.2.2 Ataxia por gluten (AG).....	20
1.2.3 Dermatitis herpetiforme (DH) .....	21
1.2.4 Alergia al trigo (AT).....	21
1.2.5 Sensibilidad al gluten (SG).....	22
1.3 Productos libres o reducidos en gluten.....	22
1.3.1 Normatividad.....	24
1.3.2 Ingredientes para elaborar productos libres de gluten .....	24
1.3.3 Calidad sensorial y nutricional de los productos libres de gluten.....	27
1.3.4 Mercado de los productos libres de gluten .....	29
1.4 Métodos analíticos para la detección de gluten en alimentos .....	30
1.4.1 Extracción de gluten en alimentos.....	31
1.4.2 Ensayo inmunoenzimático ELISA.....	31
1.4.3 PCR Cuantitativa.....	33
1.4.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	33
1.4.5 Técnica Western Blot .....	34
1.4.6 Técnicas cromatográficas.....	34
1.4.7 Tiras inmunocromatográficas .....	34
2. GERMINACIÓN COMO ESTRATEGIA DE MEJORAMIENTO NUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS.....	35
2.1 Introducción .....	35
2.2 Germinación .....	36
2.3 Leguminosas.....	37
2.3.1 Composición química y valor nutricional .....	38

2.3.2 Factores antinutricionales.....	39
2.3.3 Efecto de la germinación sobre la calidad nutricional de las leguminosas.....	40
2.3.4 Uso de leguminosas en productos libres de gluten .....	41
2.4 Micronutrientes de interés .....	42
2.4.1 Riboflavina (Rbf).....	42
2.4.2 Hierro (Fe) .....	43
2.4.3 Zinc .....	43
2.5 Trabajo experimental .....	44
2.5.1 Materiales .....	44
2.5.2 Métodos .....	44
2.6 Resultados y Discusión .....	46
2.6.1 Prueba germinativa .....	46
2.6.2 Germinación y curvas de imbibición .....	46
2.6.3 Cuantificación de micronutrientes.....	50
2.7 Conclusiones.....	53
3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HARINAS LIBRES DE GLUTEN .....	54
3.1 Introducción .....	54
3.2 Generalidades de los materiales vegetales seleccionados .....	54
3.3 Métodos para la caracterización de harinas .....	58
3.3.1 Propiedades funcionales .....	59
3.3.2 Propiedades de empastado (RVA): .....	61
3.4 Trabajo experimental .....	63
3.4.1 Materiales .....	63
3.4.2. Obtención de harinas .....	63
3.4.3 Métodos .....	63
3.4.4 Análisis estadístico .....	65
3.5 Resultados y Discusión .....	66
3.5.1 Obtención de harinas .....	66
3.5.2 Distribución de tamaño de partícula.....	66
3.5.3 Composición proximal.....	68
3.5.4 pH .....	71
3.5.5 Caracterización funcional.....	71
3.5.6 Propiedades de empastado (RVA) .....	80
3.6 Análisis estadístico .....	86
3.7 Conclusiones.....	88

4. FORMULACION Y APLICACIÓN DE UNA MATERIA PRIMA LIBRE DE GLUTEN CON VALOR NUTRICIONAL MEJORADO .....	89
4.1 Introducción .....	89
4.2 Elaboración de pan.....	90
4.3 Agentes estructurantes .....	91
4.3.1 Albumina de huevo .....	91
4.3.2 Goma Xanthan.....	92
4.3.3 Goma Guar .....	93
4.3.4 Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).....	94
4.4. Trabajo experimental .....	95
4.4.1 Materiales .....	95
4.4.2 Métodos .....	96
4.4.3 Análisis estadístico .....	99
4.5 Resultados y Discusión .....	99
ENSAYOS DE PREFORMULACIÓN .....	99
4.5.1 Elaboración de panificados modelo .....	99
4.5.2 Cuantificación de gluten por Elisa R5.....	105
ANÁLOGO DEL GLUTEN .....	107
4.5.3 Ensayos cualitativos .....	107
4.5.4 Propiedades reológicas .....	112
FORMULACIÓN DE LA MATERIA PRIMA LIBRE DE GLUTEN Y ENSAYO DE PROTOTIPO .....	115
4.5.5 Formulación de la materia prima y composición proximal en base seca .....	115
4.5.6 Propiedades reológicas de la mezcla .....	117
4.5.7 Elaboración de prototipo .....	119
4.5.8 Concentración de nutrientes.....	123
4.6 Conclusiones.....	124
CONCLUSIONES GENERALES .....	125
PERSPECTIVAS .....	126
BIBLIOGRAFIA.....	127
ANEXOS .....	145

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de las harinas obtenidas.

Tabla 2. Propiedades funcionales de las harinas obtenidas.

Tabla 3. Concentración mínima de gelificación de las harinas obtenidas.

Tabla 4. Propiedades de empastado (RVA) de las harinas obtenidas.

Tabla 5. Resultados obtenidos de los mixogramas.

Tabla 6. Panificados modelo preformulados.

Tabla 7. Volumen específico y dureza de los panes modelo preformulados.

Tabla 8. Curva estándar de gliadinas.

Tabla 9. Contenido de gluten en materias primas y panes modelo preformulados.

Tabla 10. Formulaciones para obtener el análogo del gluten.

Tabla 11. Formulaciones seleccionadas a partir del Ensayo 1 para el análogo del gluten.

Tabla 12. Formulación de la materia prima libre de gluten.

Tabla 13. Composición proximal en base seca de la materia prima libre de gluten.

Tabla 14. Formulación del prototipo libre de gluten.

Tabla 15. Contenido de micronutrientes en la materia prima y el prototipo libre de gluten.

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Clasificación de las enfermedades asociadas al gluten.

Figura. 2. Mucosa duodenal (A) de un paciente no celiaco y (B) de un paciente con enfermedad celiaca donde se muestra la lesión con atrofia vellositaria.

Figura. 3. Estructura química de la riboflavina con átomos numerados.

Figura. 4. Proceso de germinación para las leguminosas.

Figura 5. Prueba germinativa de (A) Lenteja y (B) Garbanzo.

Figura 6. Curva de imbibición para los granos de (A) Lenteja y (B) Garbanzo.

Figura 7. Granos germinados de lenteja.

Figura 8. Contenido de micronutrientes en la harina de lenteja germinada y sin germinar.

Figura 9. Perfil cromatográfico del contenido de riboflavina en la harina de lenteja germinada.

Figura 10. Curva RVA.

Figura 11. Harinas obtenidas.

Figura 12. Distribución de tamaño de partícula de las harinas.

Figura 13. Composición proximal de las harinas obtenidas.

Figura 14. Propiedades funcionales de hidratación de las harinas obtenidas.

Figura 15. Propiedades funcionales tecnológicas de las harinas obtenidas.

Figura 16. Estabilidad de la espuma de las harinas obtenidas.

Figura 17. Propiedades de empastado (RVA) de las harinas.

Figura 18. Análisis de componentes principales.

Figura 19. Estructura química de la goma xanthan.

Figura 20. Estructura química de la goma guar.

Figura 21. Estructura química de la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Figura 22. Masas obtenidas de los mixogramas.

Figura 23. Cortezas de los panes modelo preformulados y sus cortes transversales.

Figura 24. Volumen específico de los panes modelo preformulados.

Figura 25. Dureza de los panes modelo preformulados.

Figura 26. Extensibilidad de diferentes harinas evaluadas.

Figura 27. Curva estándar de gliadinas para la cuantificación de gluten.

Figura 28. Ensayo cualitativo 1 de los análogos del gluten.

Figura 29. Ensayo cualitativo 2 de los análogos del gluten.

Figura 30. Región viscoelástica lineal de las formulaciones análogas del gluten obtenida a partir del barrido de deformación.

Figura 31. Efecto de la adición de hidrocoloides en (A) el módulo de almacenamiento y (B) tangente de pérdida de las formulaciones análogas del gluten.

Figura 32. Barrido de frecuencia de los análogos del gluten.

Figura 33. Región viscoelástica lineal de la harina de trigo (control) y de la materia prima libre de gluten, obtenida a partir del barrido de deformación.

Figura 34. Barrido de frecuencia de la harina de trigo (control) y de la materia prima libre de gluten.

Figura 35. Prototipo libre de gluten (A) mezcla batida, (B) con 10 minutos de fermentación, (C) con 30 minutos de fermentación y (D) horneado.

Figura 36. Cortezas de los panes y sus cortes transversales: (A) Control de trigo y (B) prototipo libre de gluten.

Figura 37. Volumen específico y dureza del control de trigo y del prototipo libre de gluten.

## **RESUMEN**

La tendencia mundial en la industria alimentaria es elaborar productos saludables de buena calidad, que aporten valor nutricional a la dieta, esto se debe al incremento de personas que buscan bienestar general y salud digestiva. En este grupo de productos se incluyen los alimentos libres de gluten que surgen por la necesidad de ofrecer un tratamiento a las personas que presentan enteropatías asociadas al consumo de esta proteína. Sin embargo, la eliminación del gluten influye desfavorablemente en la calidad estructural y sensorial de los productos convirtiéndose esto en un problema tecnológico, ya que a nivel industrial aún no se logra encontrar un material que simule las propiedades únicas que el gluten confiere a los alimentos que lo contienen.

Lo anterior representa una oportunidad para incursionar en el tema con el fin de obtener una materia prima que permita ser incorporada en la formulación de productos libres de gluten aportando propiedades tecnológicas, funcionales y nutricionales que den solución al problema existente. La propuesta para el desarrollo de esta materia prima es aprovechar materiales vegetales disponibles en la región que aún no han sido utilizados en este tema, combinados con agentes estructurantes, someterlos a diferentes pruebas fisicoquímicas, funcionales, bromatológicas y de competencia panadera para determinar su interacción y definir la formulación óptima.

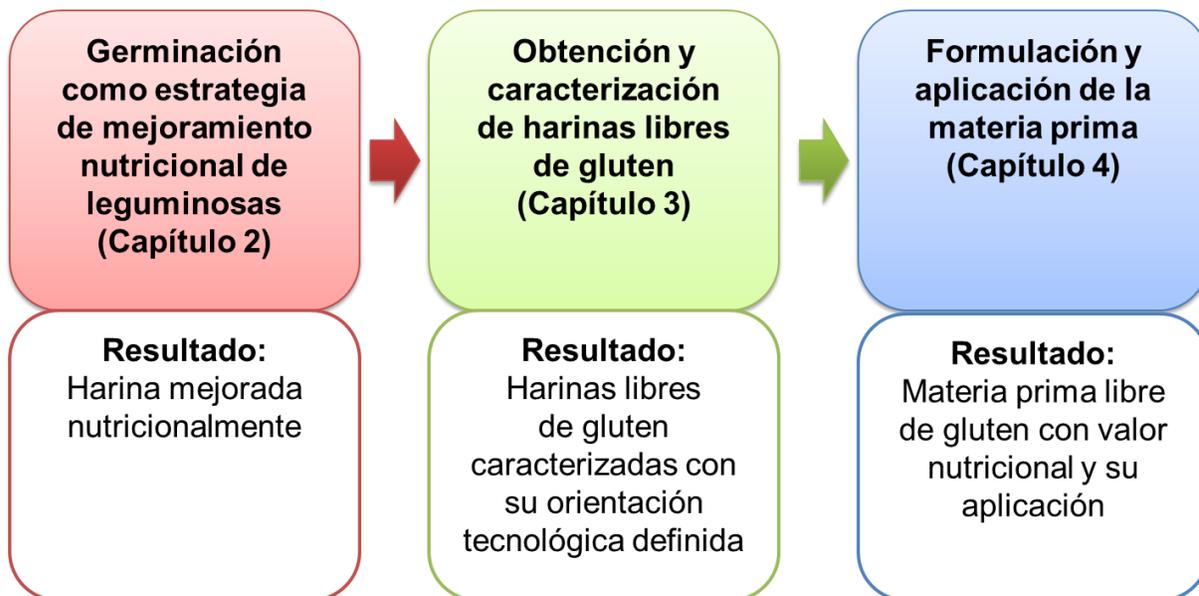
## OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una materia prima libre de gluten, mejorada nutricionalmente, con potencialidad para ser incorporada en la formulación de productos panificados, de molinería y afines; mediante el estudio y la caracterización de sus propiedades en diferentes mezclas de harinas vegetales y coadyuvantes, empleando métodos de análisis funcionales, bromatológicos y físicos, que orienten su aplicación tecnológica.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los cambios en el contenido de riboflavina (Rfb), hierro (Fe) y zinc (Zn) en harinas obtenidas a partir del grano germinado y sin germinar de lenteja **(Capítulo 2)**.
2. Caracterizar harinas obtenidas de materiales vegetales, mediante análisis bromatológicos, fisicoquímicos y funcionales, definiendo propiedades que orienten su aplicación en procesos alimentarios **(Capítulo 3)**.
3. Evaluar el efecto de los agentes de estructura al ser incorporados en la matriz alimentaria a través de pruebas reológicas y análisis estadísticos que faciliten la selección de la formulación óptima **(Capítulo 4)**.
4. Evaluar las características estructurales propiciadas por la aplicación de la materia prima formulada, en un producto panificado a través de pruebas de competencia panadera **(Capítulo 4)**.
5. Caracterizar los prototipos obtenidos mediante pruebas de detección de gluten, composición nutricional, volumen específico y dureza **(Capítulo 4)**.

## ESTRUCTURA DE LA METODOLOGÍA APLICADA



# 1. ESTADO DEL ARTE SOBRE EL GLUTEN EN LOS ALIMENTOS Y SU RELACIÓN CON LA SALUD

---

Históricamente, los cereales y sus derivados han estado asociados al origen y desarrollo de la civilización. Estos se encuentran entre los alimentos básicos, ocupando un lugar indiscutible en la base de la pirámide nutricional y son considerados la fuente de nutrientes más importante del mundo, gracias a que aportan a la dieta de los seres humanos carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas pertenecientes al complejo B. Los principales cereales son trigo, maíz, centeno, arroz, cebada y avena (Rosell, 2013).

Del procesamiento de los granos de cereales se obtiene una amplia variedad de alimentos, entre los que se encuentran harinas, productos horneados, pastas y bebidas fermentadas. Para todos estos productos las proteínas presentes en las semillas tienen efectos importantes, especialmente en los productos horneados ya que le confieren características estructurales y sensoriales únicas al producto final. El contenido proteico en los cereales varía entre 8 y 11% y depende del genotipo (cereal, especie, variedad), de las condiciones durante el cultivo (suelo, clima, fertilización) y del momento de la cosecha (Belitz et al., 2009; Kulp & Ponte, 2000).

## 1.1 Proteínas de los cereales

Convencionalmente, las proteínas presentes en los cereales han sido diferenciadas en cuatro grupos según su solubilidad en un rango de solventes acorde al fraccionamiento de Osborne. Las albuminas solubles en agua, las globulinas en soluciones de sal diluidas, las prolaminas en soluciones etanol acuoso al 70% y las glutelinas en ácidos o bases diluidos. En general, las albuminas y globulinas representan entre el 15-20% mientras que las prolaminas y glutelinas corresponden al 80-85% del total de las proteínas presentes en el grano (Kigel & Galili, 1995).

**1.1.1 Proteínas funcionales del grano:** en este grupo se encuentran las albuminas y globulinas. Son proteínas monoméricas, metabólicamente activas, compuestas por enzimas, nucleoproteínas y glucoproteínas, que se encuentran en el embrión y en las capas más externas del grano (Kulp & Ponte, 2000; Steffolani, 2012). Están concentradas en el germen, el salvado y las células de la capa de aleurona, y en menor medida en el endospermo. Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, presentan alto contenido de lisina y por lo tanto son nutricionalmente más completas que las prolaminas y glutelinas aunque son deficientes en aminoácidos que contienen sulfuro (cisteína y metionina) (Gobbetti & Gänzle, 2013).

**1.1.2 Proteínas de reserva y estructurales del grano:** a este grupo pertenecen las prolaminas y glutelinas. Se encuentran en el endospermo del grano donde forman una matriz continua alrededor de los gránulos de almidón (Steffolani, 2012). Su función biológica es proporcionar nitrógeno y aminoácidos a la semilla durante la germinación. Constituyen la fracción principal de proteínas en casi todos los cereales, excepto en la avena, donde predominan las globulinas. Aunque las glutelinas clásicamente han estado definidas como una fracción independiente, hoy en día deben ser consideradas prolaminas ya que gracias al conocimiento de su estructura y genética se determinó que son solubles en etanol acuoso tras la reducción de los puentes disulfuro (Giménez & Barro, 2013; Gobbetti & Gänzle, 2013).

Las fracciones de prolaminas reciben diferente nombre según el cereal de origen: en el trigo son gliadinas, en el centeno secalinas, en la cebada hordeínas, en la avena aveninas, en el maíz zeínas, en el mijo y sorgo kafirinas y en el arroz orizinas. La fracción de glutelina en el trigo se denomina glutenina (Gobbetti & Gänzle, 2013; Steffolani, 2012). Las dos fracciones contenidas en el trigo (gliadinas y gluteninas) en presencia de agua forman el gluten: una masa viscoelástica cohesiva que puede ser fácilmente aislada de la masa de trigo, pero difícilmente del centeno y la cebada a pesar de su estrecha relación filogenética (Kigel & Galili, 1995).

Las prolaminas son proteínas monoméricas con peso molecular entre 30.000 y 55.000. Se clasifican en  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  según su movilidad en geles de poliacrilamida a pH ácido por electroforesis y de acuerdo a su secuencia de aminoácidos N-terminales (Lutz, Wieser, & Koehler, 2012; Shewry & Tatham, 2000). Los enlaces disulfuro juegan un papel clave en la determinación de las propiedades de estas proteínas ya que vinculan dos residuos de cisteína. Las  $\omega$  gliadinas son libres de cisteína y por lo tanto ocurren como monómeros mientras que las  $\alpha/\beta$  y  $\gamma$  contienen 6 y 8 residuos de cisteína respectivamente formando 3 y 4 puentes disulfuro intramoleculares (Gobbetti & Gänzle, 2013; Lutz et al., 2012).

Las glutelinas por su parte, son proteínas poliméricas elásticas que se unen a través de enlaces disulfuro intra e intermoleculares, siendo estos últimos los responsables de la polimerización. Su peso molecular varía de 500.000 a más de 10 millones (Lutz et al., 2012). Están conformadas por dos subunidades: las de alto peso molecular (HMW-GS) consideradas componentes críticos en las características panaderas de la masa y las de bajo peso molecular (LMW-GS) subdivididas en los grupos B, C y D en función de sus características bioquímicas y sus propiedades funcionales (Pompa et al., 2013).

**1.1.3 Gluten de trigo:** la presencia de gluten en la harina de trigo, la convierte en la más representativa para la industria de la panificación, gracias a su capacidad única de formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua, capaz de retener el gas producido durante la fermentación. Esta propiedad se debe a la presencia de gliadinas y gluteninas en el grano (Belitz et al., 2009; Hui, 2006). Por lo tanto, la calidad de la harina de trigo está determinada principalmente por la estructura molecular, la cantidad y calidad de estas proteínas y la influencia de cada fracción en las propiedades funcionales de la masa durante el proceso de panificación (Rosell, 2013; Steffolani, 2012).

Se considera que las gliadinas son las responsables de la viscosidad y extensibilidad de la masa. Un exceso de estas debilita el gluten haciéndolo permeable, lo cual impide la retención de gas durante la fermentación y la masa en lugar de esponjarse se colapsa. Las gluteninas por su parte, aportan elasticidad y cohesividad a la masa; considerándose que un exceso de estas genera alta cohesividad impidiendo la expansión de la masa y por consiguiente la disminución del volumen en el producto final (Badui, 1996; León & Rosell, 2007; Lutz et al., 2012; Pompa et al., 2013)

El gluten puede definirse como una mezcla cohesiva y viscoelástica, obtenida de la hidratación y el amasado de una harina que contiene principalmente proteínas de los grupos gliadinas y gluteninas y otros componentes menores como almidón, cenizas, lípidos y agua. El gluten es el resultado del procesamiento de la harina y no existe como tal en el grano de los cereales. Químicamente, está compuesto por 70-85% de proteína, 5-15% de carbohidratos, 3-10% de lípidos y 1-2% de cenizas (Hui, 2006). Los carbohidratos presentes son principalmente pentosanos que al unirse retienen una cantidad significativa de agua, mientras que los lípidos y las proteínas forman un complejo lipoprotéico, responsable de las propiedades reológicas de la masa (Belitz et al., 2009).

Su desarrollo implica la formación de enlaces disulfuro covalentes e interacciones secundarias más débiles, tales como interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas e interacciones dipolo-dipolo, haciendo del perfil de aminoácidos un componente importante. En este predominan la glutamina y la prolina; quienes participan en la formación de puentes de hidrogeno durante el amasado y representan más del 50% de los residuos de aminoácidos del gluten, además la glutamina y los grupos hidroxilo de los polipéptidos del gluten contribuyen a sus propiedades de cohesión-adhesión (Arendt & Dal Bello, 2008; Steffolani, 2012).

La baja solubilidad en agua es atribuida a su bajo contenido de lisina, arginina y ácido aspártico que en conjunto representan menos del 10%. Los residuos de

aminoácidos del gluten hidrofóbicos son alrededor del 30% y contribuyen en gran medida a su capacidad para formar agregados de proteínas por interacciones hidrofóbicas, además unen lípidos y otras sustancias no polares. La presencia de aminoácidos sulfurados como la cisteína propician la formación de enlaces disulfuro intra e inter polipéptidos (Arendt & Dal Bello, 2008; Hui, 2006).

Todas estas características permiten diversas aplicaciones del gluten en la industria alimentaria, especialmente en el sector de la panificación. Una de las más importantes es la **viscoelasticidad**, que le permite a la masa expandirse y retener las burbujas de gas durante la fermentación, dando como resultado un pan leudado y poroso después del horneado. La **formación de film** le da a la masa la habilidad de retener partículas sólidas en suspensión, además contribuye con la textura de la miga y el volumen del producto final. Este film se crea por la interacción de las gliadinas y las gluteninas y se estabiliza por medio de puentes de hidrogeno, uniones hidrofóbicas y enlaces disulfuro intra e intermoleculares (Gobbetti & Gänzle, 2013; Hui, 2006)

El gluten también es **termoestable**, esta propiedad se aplica cuando la proteína es desnaturalizada por el calor y transformada en una masa firme durante el horneado, influyendo así en la textura y la forma final. Otra propiedad es la **capacidad de absorción de agua** que juega un papel importante en la humedad de la masa, en la corteza, volumen, textura de la miga y vida útil del producto; esta capacidad en el gluten es aproximadamente 150-200% de su peso seco (Hui, 2006).

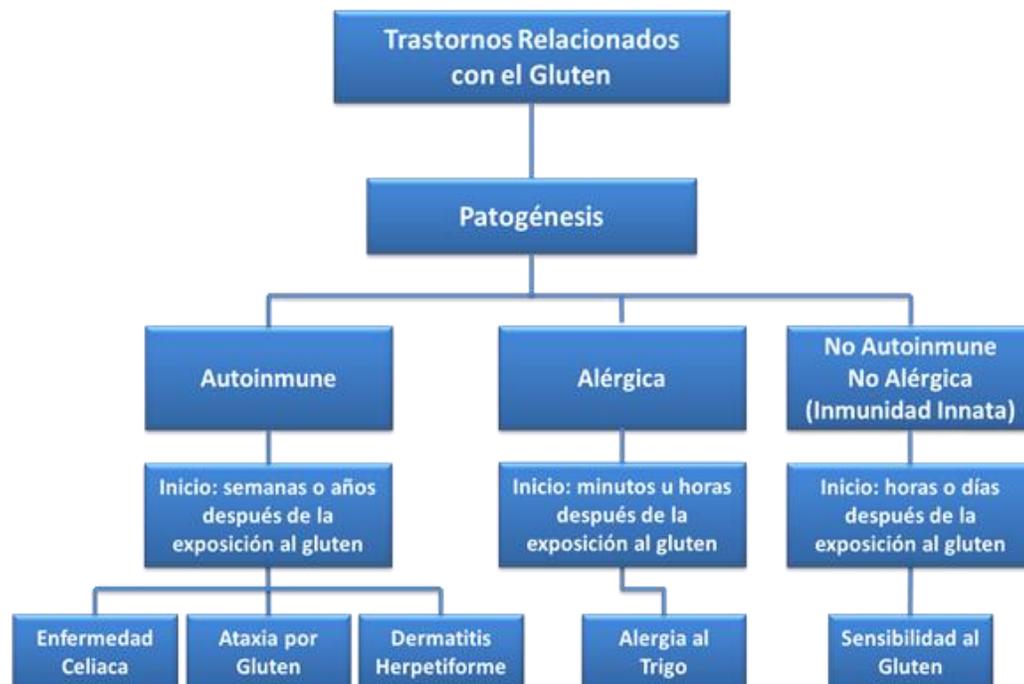
Aunque el gluten es un material valorado en la industria gracias a todas estas propiedades, en el área de la salud se ha convertido en un problema ya que su consumo genera un efecto toxico en individuos predispuestos genéticamente (Delegge, 2010). Sin embargo, es importante aclarar que no todas las proteínas del gluten son tóxicas, y que aquellas tóxicas, no lo son en la misma medida (Giménez & Barro, 2013).

Se considera que la toxicidad del gluten se produce en fragmentos específicos de las prolaminas del trigo, el centeno y la cebada (el papel de la avena aún es incierto), debido a la secuencia de los aminoácidos que los componen y al predominio de glutamina (~35%) y prolina (~15%) (Arendt & Dal Bello, 2008; Calderón de la Barca & Cabrera-Chávez, 2013). Estos fragmentos son difícilmente digeridos por las proteasas gastrointestinales, resultando en péptidos relativamente grandes que se acumulan en el intestino delgado (Giménez & Barro, 2013), mientras que los demás péptidos son hidrolizados por las proteasas allí presentes, demostrando que la estructura peptídica es esencial para producir el efecto toxico (Gallagher, 2009).

Se puede afirmar entonces que las gliadinas son el principal componente tóxico del gluten, incluso se han identificado péptidos específicos como el 33-mer y el 17-mer que contienen epítomos reconocidos por linfocitos T convirtiéndolos en contribuyentes principales de la inmunotoxicidad del gluten (Giménez & Barro, 2013; Peña & Rodrigo, 2013). Por este motivo, el gluten ha sido identificado como detonante de diferentes trastornos asociados a su consumo, entre ellos se encuentran la enfermedad celiaca, la dermatitis herpetiforme y la alergia al gluten, condiciones que afectan la calidad de vida de quienes las padecen y el único tratamiento existente es una dieta con total ausencia de éste (Arendt & Dal Bello, 2008; Delegge, 2010).

## 1.2 Enfermedades asociadas al consumo de gluten

Se cree que hace unos 10.000 años, la introducción de cereales que contienen gluten a la dieta de los seres humanos, representó un desafío evolutivo que origino las condiciones para las enfermedades asociadas a este complejo proteico (Sapone et al., 2012). Entre estas se encuentran la enfermedad celiaca (EC), considerada una enteropatía autoinmune y la alergia al trigo (AT), representada por una reacción inmunológica. Además, existen casos de reacciones al gluten conocidos como sensibilidad al gluten (SG) en los que no intervienen los mecanismos alérgicos ni autoinmune (Sapone et al., 2010). En la **Figura 1** se presenta la clasificación de las enfermedades asociadas al gluten, propuesta en febrero de 2011 por Sapone et al., (2012).



**Figura. 1.** Clasificación de las enfermedades asociadas al gluten.

**1.2.1 Enfermedad celiaca (EC):** la EC se define como una enteropatía autoinmune que se presenta en individuos predispuestos genéticamente, tras la ingestión de péptidos derivados del trigo y otros cereales (Peña & Rodrigo, 2013). Se caracteriza por una respuesta inmune inapropiada de los linfocitos T contra los péptidos del gluten en el intestino delgado, provocando atrofia vellositaria, inflamación crónica de la mucosa del intestino y la consecuente deficiencia en la absorción de nutrientes (Van Hees et al., 2013; Zarkadas et al., 2013).

La presentación clínica es variada, afecta tanto a niños como a adultos y la relación mujer/varón es 2:1 (Polanco, 2013). Esta incluye síntomas digestivos de diversos tipos así como manifestaciones extra-intestinales, hematológicas, afecciones en la piel, en las articulaciones, en el hígado y neurológicas. La forma típica en niños se caracteriza por diarrea crónica, vómitos, distensión abdominal, retraso en el desarrollo, pérdida de masa muscular y falta de apetito (Rodrigo & Peña, 2013).

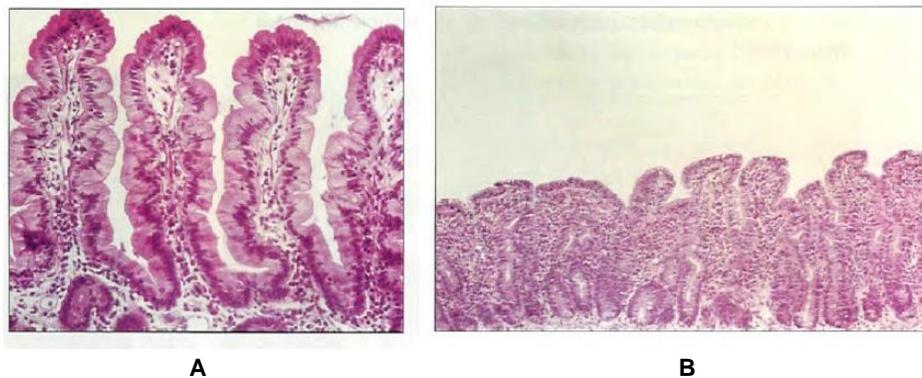
En los adultos la diarrea es el síntoma más común, acompañada de cansancio y pérdida de peso. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que existen muchas presentaciones menos clásicas como la anemia por deficiencia de hierro, deficiencia de ácido fólico, osteoporosis, afecciones en el sistema nervioso y síntomas gastrointestinales inespecíficos. Por esto ha sido catalogada como una enfermedad multisistémica (Crowe, 2010; Montoro & Domínguez Cajal, 2013; Van Hees et al., 2013).

La epidemiología de la EC se conceptualiza por el modelo iceberg, ya que la parte visible de éste representa tan solo el 30% de la población celiaca diagnosticada, pero el número de afectados (la zona invisible) es mucho mayor, el 70% restante serían los pacientes que aún no han sido detectados, por tal razón es considerada una enfermedad subdiagnosticada (Arendt & Dal Bello, 2008). Su frecuencia es elevada ya que aparece en el 1-2% de la población general y se cree que está en aumento, posiblemente como resultado de factores ambientales (Zarkadas et al., 2013).

Se considera uno de los trastornos más comunes en Europa y en los países poblados por personas de ascendencia europea (se incluye Australia y los países de América) y con menor prevalencia en Oriente Medio, Asia y Norte de África (Sapone et al., 2012). En Europa y América del Norte, la aparición de esta enfermedad es de 1 por cada 100 habitantes (Van Hees et al., 2013), lamentablemente se estima que por cada caso diagnosticado entre 5 a 10 permanecen sin diagnosticar. En Latinoamérica aún no se tienen datos específicos sobre el impacto de la celiaquía, sin embargo hay estudios poblacionales en Argentina y Brasil, donde se estiman prevalencias de 1:167 y 1:360 individuos, respectivamente (Gomez et al., 2001; Queiroz et al., 2004).

La patogénesis de la EC se asocia a la presencia de las moléculas DQ2 y DQ8 del HLA (antígeno específico de leucocitos humanos). Esta enteropatía se inicia con la respuesta inmune innata debido a la entrada de péptidos de gluten y más específicamente a la presencia de prolina y glutamina. La prolina debido a su estructura cíclica, impone algunas restricciones de accesibilidad a la acción proteolítica (Heredia, 2012), impidiendo la ruptura del enlace peptídico que la conforma dejando completos algunos péptidos que al cruzar la barrera intestinal presentan alto potencial inmunogénico (Calderón de la Barca & Cabrera-Chávez, 2013).

Por otra parte, en la lámina propia del intestino la glutamina es desaminada por la enzima transglutaminasa tisular (TGt), dejando con carga negativa a los péptidos, aumentando con esto su afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 de las células presentadoras de antígenos. Estas células presentan dichos epítomos a las células T, activándose la respuesta inmune adaptativa por la producción de citosinas y estimulando a las células B a producir anticuerpos contra el gluten y contra la propia transglutaminasa tisular. Como consecuencia, se produce una lesión en la mucosa del intestino delgado (**Figura 2**) que afecta la absorción y utilización de nutrientes (Arranz et al., 2013; Calderón de la Barca & Cabrera-Chávez, 2013).



**Figura. 2.** Mucosa duodenal (A) de un paciente no celiaco y (B) de un paciente con enfermedad celiaca donde se muestra la lesión con atrofia vellositaria. Tomada de Ecogastropediatria (2013).

El diagnóstico de la EC implica inicialmente la eliminación del gluten de la dieta durante un periodo de tiempo determinado con el fin de minimizar o desaparecer los síntomas, tras ese lapso de tiempo se reintroduce el gluten para verificar la recurrencia de los síntomas (Hodge, Swain, & Faulkner-Hogg, 2009). Otra forma de diagnóstico es la identificación de anticuerpos específicos en la sangre mediante pruebas serológicas. Los pacientes con EC presentan marcadores serológicos, cuando consumen alimentos que contienen gluten. Entre estos, se encuentran los anticuerpos anti-gliadinas (AGA), anti-endomision (EMA) y anti-transglutaminasa tisular (TTG) (Esquer Munguía, 2010).

Otro aspecto a evaluar es el genético, ya que esta enfermedad es más frecuente en ciertos grupos poblacionales. La determinación del tipo de HLA es clave y se puede usar como criterio de exclusión en las personas que carecen de HLA-DQ2 o HLA-DQ8, con un 99% de confiabilidad. Sin embargo, es necesario realizar una biopsia yeyunal como diagnóstico definitivo. Ésta, mostrara en el caso de la enfermedad, la atrofia de las vellosidades intestinales (Esquer Munguía, 2010). El diagnóstico de EC se confirma si se cumplen 4 de las 5 siguientes condiciones (Sapone et al., 2012):

- Síntomas típicos de EC.
- Seropositividad de autoanticuerpos específicos de EC de tipo IgA a títulos altos.
- Presencia de los haplotipos HLA-DQ2- o -DQ8.
- Presencia de enteropatía compatible en las biopsias de intestino delgado.
- Respuesta a la dieta sin gluten.

El tratamiento de la EC es esencialmente la eliminación completa de alimentos que contienen gluten, lo que conduce a la mejoría de los síntomas a partir de las dos semanas, la normalización serológica entre los 6 y 12 meses y la recuperación de las vellosidades intestinales después de los 2 años (Polanco, 2013; van Hees et al., 2013). Sin embargo, el seguimiento estricto de esta dieta resulta difícil debido a que se deben excluir todos los derivados del trigo, el centeno, la cebada y posiblemente la avena, además de una amplia variedad de productos manufacturados como embutidos, conservas, helados, salsas, entre otros; ya que en estos el gluten es incorporado como aditivo, como fuente de proteína vegetal, por razones tecnológicas del proceso o simplemente por contaminación cruzada (Arendt & Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009; Zarkadas et al., 2013).

**1.2.2 Ataxia por gluten (AG):** la AG es una enfermedad autoinmune asociada a la presencia de anticuerpos anti-gliadina (AGA) en el suero, capaz de provocar un daño en el cerebelo que resulta en un cuadro de ataxia (enfermedad que se caracteriza por provocar la descoordinación en el movimiento de las partes del cuerpo) con o sin afectación duodenal asociada (Montoro & Domínguez Cajal, 2013). La patogenia de este trastorno no está clara, pero en estos pacientes se han identificado depósitos de anticuerpos transglutaminasa alrededor de los vasos cerebrales.

Clínicamente se expresa como un cuadro de ataxia cerebelar pura, o más raramente en combinación con contracciones musculares repentinas y temblor palatal. La edad media de presentación es de 53 años. Algunos pacientes mejoran notablemente con una estricta dieta libre gluten, acompañada de un seguimiento regular para asegurarse de que los anticuerpos se eliminan, lo que generalmente requiere de seis a doce meses (Rodrigo et al., 2013; Sapone et al., 2012).

**1.2.3 Dermatitis herpetiforme (DH):** la DH es una enfermedad crónica de la piel muy pruriginosa, compuesta de protuberancias y ampollas que acaban rompiéndose para formar costras. Los síntomas predominantes son comezón intensa y ardor y las lesiones aparecen usualmente en los codos, las rodillas, la espalda, los glúteos, la cara y el cuero cabelludo. La erupción puede ser generalizada, pero se limita a uno o dos sitios (Kárpáti, 2012; Sapone et al., 2012).

Su presencia se relaciona directamente con la hipersensibilidad al gluten pero solo el 10% de los pacientes manifiestan síntomas gastrointestinales leves, aunque es común encontrar atrofia de las vellosidades en la mucosa del intestino delgado. La DH aparece en 1 de cada 10.000 personas de raza blanca y ascendencia europea; rara vez ocurre en asiáticos o africanos. Puede presentarse en cualquier edad, pero es poco frecuente en los extremos de la vida, con una edad media de presentación a los 40 años. A diferencia de la EC, la DH es más común en hombres que en mujeres (Montoro & Domínguez Cajal, 2013).

El diagnóstico de la DH se basa en la biopsia de piel y pruebas serológicas iguales a las de la EC. Una vez diagnosticada se debe seguir una estricta dieta sin gluten, ya que parece prevenir el desarrollo de linfomas y otras enfermedades asociadas, además se recomienda una alta dosis de suplementos de vitamina C y exposición al sol o radiación ultravioleta A para las manifestaciones de la piel (Kárpáti, 2012).

**1.2.4 Alergia al trigo (AT):** la AT es una reacción inmunológica adversa a las proteínas del trigo. Se clasifica en alergia alimentaria clásica que afecta la piel, el tracto gastrointestinal o las vías respiratorias; la anafilaxia inducida por el ejercicio dependiente del trigo (AIEDT), el asma ocupacional (asma del panadero) y la urticaria de contacto (Montoro & Domínguez Cajal, 2013).

La patogénesis se produce por mediación de anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) contra determinados alérgenos, en este caso la fracción proteica del trigo, apareciendo los síntomas entre unos minutos y unas pocas horas después de su ingestión (Sapone et al., 2012). En individuos atópicos, el consumo de trigo provoca la liberación de histamina y otros químicos de las células en el cuerpo, causando una reacción alérgica con síntomas que pueden incluir urticaria, sensación de hormigueo en la boca, dolor abdominal, vómitos, diarrea, disminución en la presión sanguínea y dificultad para respirar, causando en algunos casos la muerte (Hodge et al., 2009).

Se estima que afecta entre el 1-3% de la población mundial y su diagnóstico se basa en los resultados de las pruebas de punción cutánea y la determinación in vitro de IgE frente a los diversos alérgenos, además de la historia clínica detallada de los

síntomas y las reacciones al alimento. Su tratamiento implica la evitación completa del alérgeno identificado (Hodge et al., 2009).

**1.2.5 Sensibilidad al gluten (SG):** la SG ha sido definida como una reacción al gluten en la que se han excluido los mecanismos alérgicos y autoinmunes. Es decir, los pacientes anti-endomision (EMA) y/o anti-transglutaminasa tisular (tTG) son negativos y aunque los anticuerpos anti-gliadina (AGA) pueden estar presentes, la mucosa del intestino delgado es normal (Peña & Rodrigo, 2013). Los síntomas están asociados a los de la EC, pero con una prevalencia de síntomas extra-intestinales como los cambios de comportamiento, dolor en los huesos o articulaciones, calambres musculares, entumecimiento de las piernas, pérdida de peso y fatiga crónica (Sapone et al., 2012).

Existen evidencias de que este trastorno puede afectar hasta el 6% de la población. Por lo general, el diagnóstico se basa en criterios de exclusión durante un periodo de tiempo en el cual los síntomas desaparecen en su totalidad tras eliminar el gluten de la dieta seguido de un desafío abierto en donde se reintroduce el gluten a la dieta con la reaparición de síntomas (Montoro & Domínguez Cajal, 2013).

El diagnóstico cada vez mayor de estas enfermedades y la creciente tendencia mundial de consumir alimentos saludables ha generado un aumento en la demanda de productos libres de gluten, obligando a la industria alimentaria a buscar materiales alternativos capaces de imitar las propiedades funcionales del gluten y métodos tecnológicos óptimos para su procesamiento, que permitan la eliminación de esta proteína sin modificar las características del alimento y sin olvidar el aspecto nutricional de los mismos (Singh & Whelan, 2011).

### **1.3 Productos libres o reducidos en gluten**

La tendencia mundial en la industria alimentaria es elaborar productos saludables, de buena calidad y que aporten valor nutricional a la dieta, esto se debe al incremento de personas que buscan bienestar general y salud digestiva. En este grupo de productos se incluyen los alimentos libres de gluten, que surgen por la necesidad de ofrecer un tratamiento a las personas que presentan enteropatías asociadas al consumo de esta proteína.

Sin embargo, la eliminación del gluten influye desfavorablemente en la calidad estructural y sensorial de los productos, convirtiéndose esto en un problema tecnológico, ya que a nivel industrial aún no se logra encontrar un material que proporcione las mismas características que el gluten le confiere a los alimentos que lo contienen. Además, los alimentos sin gluten, son en su mayoría ricos en

carbohidratos y grasas y son deficientes en algunos macro y micronutrientes, por lo que su calidad nutricional es cuestionable (Rosell, 2013).

A todo esto se suma el alto costo de estos productos, debido a la variedad de componentes que se deben adicionar para obtener un producto aceptado por los consumidores (Gallagher, 2009; Singh & Whelan, 2011). Pese a lo anterior, la demanda de los productos sin gluten ha experimentado un crecimiento exponencial durante la última década. Inicialmente, con su desarrollo se buscaba obtener productos económicamente viables y sensorialmente aceptables pero con el interés creciente por la alimentación saludable, los productos sin gluten han sido mejorados en todos sus aspectos aumentando su demanda (Rosell, 2013).

Los consumidores de estos productos son, en su mayoría, personas que han sido diagnosticadas con algún trastorno asociado a esta proteína y por lo tanto deben adherirse a una estricta dieta libre de gluten, pero esto no es sencillo porque a) implica la modificación de los hábitos alimenticios, b) podría generar deficiencias nutricionales principalmente de las vitaminas del complejo B, vitamina D, calcio, hierro, zinc, magnesio y fibra (Arendt & Dal Bello, 2008; Singh & Whelan, 2011) c) los productos libres de gluten no están ampliamente disponibles, son más caros y tienen sabor inferior a los productos convencionales (Zannini et al., 2012).

A todo lo anterior se suma las falencias sociales existentes respecto a las enfermedades asociadas al gluten ya que la población en general no está familiarizada con estas y mucho menos con los alimentos detonantes y los efectos que causan en la salud, además el término “libre de gluten” aun no es claro y por consiguiente las personas afectadas se ven envueltas en situaciones que favorecen su ingesta involuntaria (Comino et al., 2013; Zarkadas et al., 2013).

En los esfuerzos por llegar a una definición universal de alimentos libres de gluten, se ha intentado definir el umbral seguro para las personas con trastornos. Estudios han demostrado que algunos individuos son capaces de tolerar una pequeña cantidad de gluten en su dieta, menos de 10 mg/día, sin causar alteraciones histológicas significativas. Sin embargo, este umbral sigue siendo limitado porque al parecer, el grado en el que el gluten debe excluirse de la dieta varía entre los individuos diagnosticados. Aun así, el término “libre de gluten” se refiere a un nivel de gluten que se supone es inofensivo y no a la ausencia total de este (Akobeng & Thomas, 2008; Lester, 2008).

Afortunadamente, diferentes organismos a nivel mundial se han dado a la tarea de reglamentar todo lo referente a los alimentos para regímenes especiales, con el fin de proteger al consumidor y llegar a una definición unificada.

**1.3.1 Normatividad:** diferentes entidades han elaborado normas que hacen referencia a las condiciones que deben cumplir los productos libres de gluten. Por ejemplo la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), en Agosto de 2013 publicó la norma final donde define cuáles son las características que debe cumplir un alimento “libre de gluten”. Uno de los criterios es que el límite de gluten debe ser inferior a 20 partes por millón (ppm o mg/kg) (FDA, 2013a).

Otro criterio es que el alimento no contenga trigo, centeno, cebada, sus variedades híbridas o ingredientes derivados de estos y que no haya sido procesado para eliminar el gluten y si ha sido procesado no debe de contener más de 20 ppm de gluten. Esta definición se hace con el fin de eliminar la incertidumbre de como los productores de alimentos etiquetan sus productos y garantizar a las personas con enfermedades asociadas que los alimentos etiquetados “sin gluten” cumplen con una norma clara, establecida y aplicada por la FDA (FDA, 2013a).

Por otra parte, el CODEX ALIMENTARIUS cuenta con la norma relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten - CODEX STAN 118 – 1979 revisada en 2008, que hace referencia a la diferencia entre alimentos exentos de gluten que no deben sobrepasar los 20 mg/Kg y los alimentos procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 y 100 mg/kg (CODEX, 2008). También los países de la Unión Europea cuentan con el reglamento (CE) N° 41/2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, el cual contiene parámetros iguales a la norma del CODEX (CE, 2009).

Se puede concluir entonces que los valores de gluten permitidos en estos productos (20 ppm o mg/Kg) son consistentes en todos los países y organismos internacionales que establecen las normas de seguridad alimentaria, lo que conlleva a que los productores de este tipo de alimentos empleen materias primas alternativas al trigo, el centeno y la cebada para dar cumplimiento.

**1.3.2 Ingredientes para elaborar productos libres de gluten:** los productos libres de gluten, en su mayoría, se ubican en el sector de la panificación por ser la industria más propensa a utilizar ingredientes derivados de cereales que lo contienen. Por lo tanto, los productores de alimentos deben ofrecer alternativas de consumo para no perder este segmento del mercado, lo que los obliga a buscar materiales sustitutos que propicien un comportamiento funcional y tecnológico que elimine los problemas de calidad.

Con el fin de ofrecer una solución, han incursionado en la utilización de harinas libres de gluten o sus mezclas; estas últimas denominadas harinas compuestas, procedentes

de cereales que no lo contienen (arroz, maíz, sorgo, teff, millo), leguminosas (lenteja, garbanzo, arveja), granos andinos (amaranto, quinua), entre otros, combinadas con agentes estructurantes como almidones, proteínas e hidrocoloides que simulan las características del gluten (Zannini et al., 2012). Estos materiales, por si solos no pueden comportarse como esta proteína, pero en conjunto interactúan armónicamente favoreciendo la reología de las masas y permitiendo la obtención de alimentos más estructurados y sensorialmente aceptables.

Las harinas compuestas son mezclas de diferentes harinas vegetales, ricas en almidón, proteína y micronutrientes, con o sin la adición de harina de trigo (en el caso de los productos libres de gluten sin la adición de esta); utilizadas para la elaboración de diferentes alimentos y diseñadas para mejorar su calidad nutricional. Por consiguiente, las materias primas empleadas para su obtención deben presentar alto contenido de los nutrientes que no están presentes o son deficientes en el producto tradicional, deben suplir las deficiencias al agregarse en cantidades relativamente pequeñas y no deben alterar las propiedades físicas y organolépticas del alimento (Preedy et al., 2011).

Estas harinas son consideradas una buena alternativa para sustituir la harina de trigo, ya que representan una opción interesante para la reducción de los costos asociados a su importación en los países en desarrollo, donde el trigo no se cultiva por razones climáticas. Por lo tanto, los vegetales usados en la composición de las harinas dependen de la disponibilidad de materias primas de cada zona. Además su utilización en la elaboración del pan permite obtener un producto con un índice glicémico bajo y con alto contenido de proteína y fibra en comparación con el pan de trigo (Preedy et al., 2011).

A pesar de estos beneficios, las harinas libres de gluten son deficientes en proteínas estructurales, dificultando la formación del film y la retención del gas durante la fermentación, dando como resultado una masa líquida de la que se obtienen productos densos, de bajo volumen y con textura quebradiza (Arendt & Dal Bello, 2008; Crockett et al., 2011); lo que no ocurre cuando se utiliza harina de trigo, ya que cuando esta es incorporada en la formulación, la calidad del pan se asocia al contenido de las proteínas formadoras de gluten y a la influencia de cada fracción en las propiedades viscoelásticas de la masa (Belitz et al., 2009; Steffolani, 2012).

En general, la funcionalidad de las harinas en el proceso de panificación está altamente relacionada con la compatibilidad entre sus distintos componentes. Normalmente presentan afinidad por el agua debido a las proteínas que contienen, condición que favorece la capacidad de absorción y retención de agua, evitando así la retrogradación del almidón y por lo tanto el envejecimiento del producto.

Otro ingrediente básico en la elaboración de productos sin gluten son los almidones. Estos tienen propiedades únicas que determinan su aplicabilidad y funcionalidad en muchos alimentos, particularmente en productos horneados derivados de cereales, donde contribuye a la textura, apariencia y aceptabilidad general (Arendt & Dal Bello, 2008). El tipo de almidón utilizado influye considerablemente en la consistencia de la mezcla y en la capacidad de gelatinización y gelificación; dos parámetros fuertemente relacionados con la calidad del pan (Milde, 2010; Sciarini et al., 2008).

En términos de estructura, pueden actuar como material de relleno inerte en la matriz continua de la masa o ser parte de una red bicontinua de proteína y almidón. Durante la cocción del pan, los gránulos de almidón se gelatinizan y se solubilizan parcialmente manteniendo su identidad granular. En la formulación de productos libres de gluten la gelatinización del almidón desempeña un papel importante gracias a la capacidad de la pasta de almidón para atrapar burbujas de aire que favorecen la retención de gas de la masa. Además, la adición de almidón podría mejorar la consistencia de la masa durante el mezclado y la suavidad de la miga (Gallagher, 2009; Zannini et al., 2012).

Por otra parte, las proteínas que se incorporan a las mezclas cumplen una función estructural, aportan elasticidad a las masas, contribuyen a la retención de gas y mejoran la calidad nutricional de los productos libres de gluten. Por ejemplo, en un producto horneado las proteínas lácteas son capaces de formar redes favoreciendo la absorción de agua de la masa, mejoran la textura, el sabor y el color de la corteza y reducen el envejecimiento del pan (Gallagher, 2009). A pesar de estos beneficios, las proteínas de origen lácteo no son convenientes para las personas con EC, ya que el daño causado en las vellosidades intestinales deja algo de intolerancia a la lactosa (Cabrera-Chávez & Calderon de la Barca, 2009).

Las proteínas del huevo forman películas viscoelásticas cohesivas fuertes, esenciales para la formación de espuma estable y una mejor retención de gas. En algunos productos horneados, los componentes del huevo pueden realizar varias funciones, incluyendo la emulsificación y estabilización de los lípidos en la masa (Arendt & Dal Bello, 2008). En las formulaciones libres de gluten la adición de albumina de huevo favorece la formación de una red proteica, similar a la que se encuentra en el pan de trigo. Por consiguiente, el huevo puede proveer la estructura a los productos libres de gluten y mejorar la calidad nutricional que tanto necesitan (Zannini et al., 2012).

Otro aditivo esencial son los hidrocoloides o gomas; definidos como sustancias poliméricas hidrófilas de alto peso molecular con propiedades coloidales, extraídos de plantas, algas y fuentes microbianas, así como gomas derivadas de exudados de

plantas y biopolímeros modificados obtenidos por tratamiento químico a partir de la celulosa (Zannini et al., 2012). Tienen amplio uso en la industria alimentaria, gracias a su capacidad de controlar la reología de los sistemas a través de la estabilización de las emulsiones, suspensiones y espumas.

En los productos panificados son utilizados para mejorar la textura, aumentar la viscosidad de las masas, propiciar la absorción de agua y mejorar la retención de gas, dando como resultado un producto horneado más húmedo, suave y con mayor volumen (Anton & Artfield, 2008; Crockett et al., 2011). Al ser incorporados en la matriz libre de gluten favorecen el desarrollo de propiedades viscoelásticas que mejoran la estructura, la sensación en la boca, la aceptabilidad y vida útil del producto final (Gallagher, 2009; C. Rosell, 2013).

Sin embargo, la funcionalidad depende de la fuente, el proceso de extracción, la estructura química, la dosis utilizada y la interacción con los demás componentes de la matriz alimentaria. En la elaboración de los productos libres de gluten todos los tipos de hidrocoloides se han considerado como sustitutos del gluten, siendo los más utilizados la HPMC, la goma guar y la goma xanthan ya que sustituyen con mayor éxito el gluten, originando productos de mejor calidad independiente de la formulación que se utilice (Arendt & Dal Bello, 2008; Gambus, 2007; Rosell, 2013).

Por último el agua, afecta el comportamiento reológico de las masas libres de gluten y la calidad de los panes. Si la proporción de agua es baja, menor de 40%, la masa se vuelve frágil e inconsistente y exhibe un aspecto de “corteza” debido a una rápida deshidratación en la superficie. Si la proporción de agua es alta, mayor a 60%, la viscosidad de la mezcla es baja, lo que resulta en poca resistencia a la deformación, ofreciendo poca extensibilidad. También la gelatinización del almidón y otras reacciones que se producen durante la cocción se ven afectados por el agua. Las formulaciones libres de gluten con un 10-20% de agua adicional resultan en un pan con miga más suave, corteza más crujiente y mayor volumen (Arendt & Dal Bello, 2008; Zannini et al., 2012).

En conclusión, estos materiales por separado no tienen la capacidad de imitar el comportamiento del gluten, ya que no cuentan con la misma composición, haciéndose necesario formular una mezcla balanceada que permita el aprovechamiento de sus propiedades en conjunto.

**1.3.3 Calidad sensorial y nutricional de los productos libres de gluten:** como se mencionó anteriormente, la eliminación del gluten dificulta la elaboración de los productos panificados, afectando desfavorablemente la estructura, la vida útil, la calidad sensorial y por consiguiente la aceptación del consumidor. Por esto, durante

los últimos años, grandes esfuerzos se han encaminado a mejorar la calidad sensorial, tecnológica y nutricional de estos productos con importantes avances; aunque no suficientes según algunos consumidores.

Arendt y Gallagher (2008), Rosell (2013), Singh (2011), Laureati et al., (2012) y Mohammadi et al.,(2013), han reportado que los panes sin gluten que se ofrecen en el mercado presentan textura desmenuzable, sabor desagradable, color deficiente, rápido envejecimiento y cuestionan su calidad nutricional debido a que no contienen los mismos niveles de nutrientes que sus productos homólogos derivados del trigo.

El rápido envejecimiento se atribuye al alto contenido de almidón en las formulaciones. Además, por la ausencia de gluten existe mayor cantidad de agua disponible lo que origina cortezas blandas y un rápido endurecimiento de la miga (Rosell, 2013). Debido a que la calidad y las características de los panes sin gluten dependen principalmente de los ingredientes utilizados y de su interacción durante la elaboración, numerosos estudios se han desarrollado integrando harinas sin gluten con enzimas, diferentes fuentes de proteínas, hidrocoloides y masas fermentadas para aumentar la calidad de los panes (Arendt & Dal Bello, 2008).

Respecto al tema nutricional, los productos libres de gluten se caracterizan por ser deficientes en algunos macronutrientes y micronutrientes (Arendt & Dal Bello, 2008; Krupa-Kozak, 2011; Rosell, 2013; Singh & Whelan, 2011). En estudios realizados se encontró que las personas que llevan una dieta libre de gluten reportan una menor ingesta de micronutrientes esenciales como hierro, calcio, zinc y vitaminas del complejo B (Crowe, 2010). Esto debido a que los alimentos sin gluten por lo general no son enriquecidos o fortificados y se elaboran con almidones o harinas refinadas, siendo este proceso el responsable de la pérdida de la mayoría de nutrientes. Además se considera que quienes se adhieren a esta dieta tienen una menor ingesta de fibra (Gallagher, 2009).

Con el fin de dar solución a este problema, los investigadores y productores de alimentos han incluido en las formulaciones sin gluten materias primas que además de aportar valor nutricional y favorecer funciones fisiológicas en el organismo, le aportan a los productos propiedades estructurales y funcionales. Es el caso de la adición de fibra dietética, la incorporación de inulina por ejemplo, le confiere mayor textura y contribuye a la estabilización del producto (Arendt & Dal Bello, 2008). También las harinas obtenidas a partir de leguminosas y granos andinos, están siendo muy utilizadas ya que por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales se incluyen en las mezclas como elemento de fortificación (C. Rosell, 2013).

La aplicación de minerales también ha tomado gran fuerza porque pueden influir en las propiedades estructurales del producto. Un estudio reciente demostró que la aplicación de sales de calcio orgánico, caseinato de calcio y citrato de calcio influye favorablemente en la elaboración de pan sin gluten al mejorar el volumen, desarrollar el color y aumentar el contenido de calcio disponible en el producto, sin embargo existen deficiencias en cuanto a la textura que deben ser mejoradas (Krupa-Kozak et al., 2011).

Pese a todos estos esfuerzos, los consumidores continúan manifestando su inconformidad con los productos libres de gluten. En septiembre de 2012, Case ("Gluten-Free Diet," 2012), realizó una encuesta a 148 consumidores habituales de productos sin gluten, con el fin de conocer su opinión sobre el sabor, la textura y la calidad nutricional de estos. Aunque los encuestados aseguran que la calidad de los productos ha mejorado con los años, afirman que los panes actuales presentan aun mal sabor, textura deficiente y seca, exceso de azúcar utilizada para enmascarar el sabor de las harinas sin gluten, alto costo y mala calidad nutricional.

La encuesta también incluyó la "lista de deseos" de los consumidores, ellos sugieren que los productos deben contener más proteínas, fibra y vitaminas del complejo B, deben ser frescos y no congelados, deben ser más suaves y ofrecer variedad de panes como focaccia, pita, francés y pan de masa fermentada. Por todo lo anterior, la elaboración de productos libres de gluten de alta calidad se ha convertido en un problema socio-económico muy importante (Zannini et al., 2012).

**1.3.4 Mercado de los productos libres de gluten:** en el pasado, los productores de alimentos evitaban elaborar productos sin gluten por la baja demanda, las dificultades técnicas, los costos involucrados en el desarrollo y la falta de regulación e inconsistencias que regían la definición o el etiquetado de estos alimentos (Gallagher, 2009). Sin embargo, el mercado de los productos libres de gluten se ha disparado en los últimos años gracias al incremento de personas que se adhieren a una dieta libre de este, no solo por presentar alguna enteropatía relacionada al gluten sino porque para muchos se ha convertido en un estilo de vida.

Sapone et al.,(2012), presentaron la tendencia de tres diferentes dietas: baja en carbohidratos, libre de grasas y libre de gluten en los EE.UU entre el 2004 y el 2011. La dieta libre de gluten estuvo por encima de las demás, con un crecimiento del 28% entre esos años con casi US \$ 1,6 mil millones en ventas al por menor en 2010. Según la Global New Products Database (GNPD), que supervisa la innovación y el éxito de productos en todo el mundo, 1.968 nuevos productos etiquetados "libres de gluten" fueron introducidos en 2011 al mercado estadounidense, cifra ligeramente superior a 1.936 en 2010 ("Food Business News," 2012).

Esta tendencia se apoya en la idea de que, junto con la enfermedad celíaca, otras condiciones relacionadas con la ingestión de gluten se han convertido en problemas de salud. Alrededor del 20% de los estadounidenses compran productos sin gluten y para 2017 se estima que el mercado tendrá un valor de alrededor de 6,6 millones de dólares (Peña & Rodrigo, 2013).

En el Reino Unido, el mercado de los productos sin gluten en 2007 fue de £ 74 millones, según Mintel Group Ltd. Esto supuso un aumento del 12% en las ventas al por menor en 2006, y un aumento del 57% con respecto a 2004, cuando el mercado estaba valorado en £ 42 millones. Según Euromonitor International, en el 2008 el mayor crecimiento del mercado libre de gluten se registró en América del Norte, que registró un crecimiento del 22% en el año, seguida de América Latina con un 21%, Asia Pacífico con un 19% y Europa del Este en el 11%. Europa Occidental, que tiene un mercado más desarrollado de los productos, mostró una tasa de crecimiento menor del 9% (Gallagher, 2009).

Las cifras presentadas indican que este mercado está cada vez más en aumento por lo que se hace necesario ofrecer a los consumidores productos de alta calidad sensorial y nutricional, además de garantizarles el cumplimiento de los umbrales de gluten establecidos en las normas de referencia.

#### **1.4 Métodos analíticos para la detección de gluten en alimentos**

El único tratamiento para la EC es seguir una dieta estricta sin gluten durante toda la vida, lo que implica la exclusión de las proteínas tóxicas del trigo (gliadinas y gluteninas), la cebada (hordeínas), el centeno (secalinas) y la avena (aveninas), así como sus variedades híbridas y productos derivados (Comino et al., 2013). Por lo tanto, es imprescindible el uso de técnicas cuantitativas, altamente específicas y con gran poder de detección para el análisis de gluten en los alimentos (Mena et al., 2012); dado que el uso de métodos de control inadecuados expone a los consumidores celíacos a un alto riesgo para su salud.

Sin embargo, la detección de gluten presenta ciertas complicaciones ya que durante el proceso de elaboración, los alimentos se someten a tratamientos térmicos y a otros procesos que pueden modificar la estructura del gluten dificultando la detección y cuantificación final de sus fragmentos tóxicos (González et al., 2007). Acorde a las normas de seguridad alimentaria presentadas por el Codex Alimentarius, la FDA y la Comisión de las Comunidades Europeas, el valor de gluten máximo permitido para los productos libres de gluten es de 20 ppm y para los alimentos reducidos en gluten máximo 100 ppm (Bugyi et al., 2013).

En la actualidad varias técnicas son empleadas para el análisis de gluten como la espectrometría de masas, los métodos inmunológicos basados en anticuerpos monoclonales o las técnicas de PCR (Comino et al., 2013; González et al., 2007). El método de referencia recomendado por la Comisión del Codex Alimentarius es el ELISA - R5, clasificado como Tipo I, por ofrecer el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación del analito (CODEX, 2008).

Aunque el ELISA - R5 es el método de referencia, es importante tener en cuenta las limitaciones que presenta, ya que la fiabilidad de los resultados obtenidos depende de diferentes factores como la complejidad de la matriz alimentaria, los efectos del proceso de elaboración sobre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de interés, el método de extracción, el tipo de anticuerpo aplicado y los materiales para la calibración del método (Bugyi et al., 2013).

**1.4.1 Extracción de gluten en alimentos:** durante el procesamiento los alimentos están expuestos a cambios físicos, bioquímicos y reológicos que conllevan a la modificación de sus macro y microcomponentes (Esquer, 2010). Debido a esto, la extracción del gluten del alimento es una etapa crítica para la cuantificación, ya que la estructura y la solubilidad de las proteínas son afectadas por los tratamientos térmicos y otros procesos (Bugyi et al., 2013).

Comúnmente, se utilizan soluciones de etanol acuoso al 70% para la extracción de prolaminas, pero para la extracción en alimentos que han sido procesados con calor se recomienda adicionar a la muestra sustancias desnaturizantes, tales como alcoholes (etanol y propanol) mezclados con agentes reductores como mercaptoetanol, ditioneitol, agentes disociantes tales como urea, dodecilsulfato de sodio, clorhidrato de guanidina y mezclas de estos para solubilizar los agregados de gluten producidos por el calor antes de la extracción definitiva en etanol. Posteriormente se cuantifica el gluten presente mediante un método analítico (González et al., 2007).

**1.4.2 Ensayo inmunoenzimático ELISA:** la técnica ELISA (del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) se fundamenta en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos) (González et al., 2007). Esta técnica permite detectar o medir la concentración de la proteína de interés en una muestra que puede contener numerosas proteínas distintas. Actualmente, se cuenta con distintos métodos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados: el método propuesto por el Codex Alimentarius que es el ELISA R5 tipo sándwich y los ensayos competitivos (Esquer, 2010).

El ELISA R5 Sándwich es un ensayo inmunológico basado en anticuerpos monoclonales que reconocen regiones repetitivas del gluten o han sido diseñados a partir de regiones conocidas como tóxicas, dentro de las secuencias proteicas del gluten (Comino et al., 2013). El anticuerpo monoclonal R5 es capaz de reconocer las fracciones  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  de las prolaminas presentes en todos los cereales tóxicos para los enfermos celíacos y reconoce específicamente el epítipo QQPFP que es potencialmente tóxico (Mena et al., 2012; Tranquet, 2012).

Un aspecto importante es que como el anticuerpo R5 detecta principalmente prolaminas, la concentración final de gluten debe extrapolarse a partir de la concentración de estas, asumiendo una relación prolaminas / glutelinas 1:1 constante en todas las muestras, lo cual sería incorrecto porque la composición del gluten es variada y depende de múltiples parámetros como las especies, los cultivos, las condiciones agronómicas y los procesos a los cuales fueron sometidos los alimentos (Mena et al., 2012; Tranquet et al., 2012).

En la técnica ELISA se utiliza una solución cocktail que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (2-mercaptoetanol y guanidina) los cuales solubilizan los agregados de proteínas del gluten producidos por el calor en los alimentos procesados. La solución cocktail ayuda a abrir la conformación de las proteínas del gluten y promueve su extracción en etanol al 60%, lo que permite una extracción completa de las prolaminas (Esquer, 2010).

El ELISA sándwich R5 consiste en la unión del anticuerpo primario al antígeno sobre una superficie a la que previamente el anticuerpo se ha unido. El anticuerpo secundario se encuentra ligado a una enzima que catalizará la formación de un cromóforo, que puede cuantificarse por espectrofotometría. En este ensayo se establece la unión directa del gluten a los dos anticuerpos, quedando el antígeno “atrapado” entre ambos (Esquer, 2010; Mena et al., 2012).

La principal limitación de esta técnica es que es esencial que al menos dos epítopos de las secuencias reconocidas por el anticuerpo monoclonal R5 se presenten simultáneamente en una proteína o péptido. Otra limitación es que no es capaz de cuantificar adecuadamente prolaminas hidrolizadas debido a que las proteínas del gluten están fragmentadas durante el procesamiento del alimento, identificando un solo péptido tóxico por lo que la cuantificación de gluten estaría por debajo del valor real. Para este tipo de productos se usa el ELISA competitivo (Mena et al., 2012; Tranquet et al., 2012).

En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo para después añadir esta preparación sobre una superficie recubierta de antígeno (por ejemplo, gliadinas

de trigo) de tal forma que se une a la superficie el anticuerpo libre no unido al gluten de la muestra. Finalmente se detecta la cantidad de anticuerpo libre; cuanto más anticuerpo libre es detectado, menos cantidad de gluten contiene la muestra (González et al., 2007).

**1.4.3 PCR Cuantitativa:** la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) consiste en la obtención de múltiples copias de un fragmento específico de ácido desoxirribonucleico (ADN) situado entre regiones de secuencia conocida a partir de una muestra compleja de ADN. La amplificación de ese fragmento elegido permite realizar su detección y estudio posterior. Mediante PCR se puede detectar gluten de manera indirecta. Esta técnica detecta el ADN responsable de la síntesis de las proteínas del gluten, proceso conocido como expresión génica. Si en el diseño del ensayo PCR se utiliza un fragmento presente en gliadinas, secalinas, hordeínas y aveninas, puede detectarse el ADN de todos los cereales con prolaminas tóxicas para los celíacos (González et al., 2007).

Algunas de las ventajas con las que cuenta el método PCR es que tiene una sensibilidad alta en la detección del ADN, aproximadamente 5-50 picogramos (pg) de ADN. Además permite identificar la especie de la que proviene el gluten presente. Sin embargo, una de sus limitaciones es que el ADN puede fragmentarse durante el procesamiento de los alimentos. Además, es una técnica indirecta para detectar gluten a diferencia de los ELISA, ya que no cuantifica la presencia de gluten, sino la del ADN que codifica para gluten (González et al., 2007).

**1.4.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF:** es una técnica analítica utilizada para medir la masa molecular de compuestos químicos o biológicos, deducir datos estructurales e identificarlos. Para el análisis de gluten se utiliza la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización en matriz inducida por láser acoplada a un detector de tiempo de vuelo) (González et al., 2007).

Este método se basa en la observación directa de los perfiles de las prolaminas. Los espectros de masas de las diferentes prolaminas del trigo, la cebada y el centeno presentan perfiles distintos. Las gliadinas tienen masas moleculares entre 30 y 55 kDa, con picos característicos entre 30 -35 kDa; las hordeínas tienen masas moleculares entre 30 y 45 kDa; y las secalinas tienen dos picos característicos en 32 y 39 kDa. Este método permite determinar si las proteínas del gluten se encuentran nativas, hidrolizadas o si fueron sometidas a algún tratamiento térmico. Es un método sensible, teniendo límites de detección para gliadinas y aveninas de 40 – 50 ppm (Esquer, 2010).

**1.4.5 Técnica Western Blot:** la técnica Western Blot es, al igual que los ELISA, un inmunoensayo diseñado para detectar proteínas específicas en una muestra o extracto. En una primera etapa se separan las proteínas, en función de su tamaño, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (dodecilsulfato sódico). Luego las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (polifluoruro de vinilideno) para después incubarlas con los anticuerpos específicos, en este caso el R5 conjugado con peroxidasa, para finalmente llevar a cabo la detección por quimioluminiscencia. Es una técnica sensible que permite detectar prolaminas a niveles de 1.5 ppm (Esquer, 2010; González et al., 2007).

**1.4.6 Técnicas cromatográficas:** la cromatografía es un método físico de separación. El análisis de muestras alimentarias puede realizarse mediante cromatografía líquida, en la que la fase móvil es un líquido y por lo tanto los componentes de la muestra deben ser solubles en ese líquido. Mediante este método pueden detectarse péptidos y proteínas en general, en este caso el gluten y se puede cuantificar su concentración. Sin embargo, se requiere mucho tiempo para el análisis y es difícil de automatizar para muchas muestras (González et al., 2007).

**1.4.7 Tiras inmunocromatográficas:** es un método sencillo y rápido, similar a las pruebas de embarazo. El gluten debe extraerse de la muestra utilizando una disolución de extracción. Luego, la muestra se aplica sobre la tira, donde se encuentran los anticuerpos que reconocen el gluten unidos a esferas coloreadas de látex. El gluten unido a estos anticuerpos se desplaza a través de la tira en un proceso cromatográfico de separación. Finalmente, el gluten y el anticuerpo unido se inmovilizan en una región de la tira, donde se puede detectar la presencia del gluten como una banda coloreada. La detección ofrece un resultado positivo o negativo para el gluten pero no permite conocer su concentración (González et al., 2007).

## **2. GERMINACIÓN COMO ESTRATEGIA DE MEJORAMIENTO NUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS**

---

### **2.1 Introducción**

Existe una amplia variedad de productos disponibles para las personas que se adhieren a una dieta libre de gluten. Sin embargo, se han planteado dudas acerca de la calidad nutricional de estos y de la dieta en general, debido a que los productos sin gluten normalmente no son enriquecidos y son elaborados con harinas refinadas y/o almidón, aportando menor valor nutricional que sus homólogos a base de trigo (Gallagher, 2009). Además al excluir el trigo y sus derivados de la dieta, una importante fuente de hierro, tiamina, riboflavina y ácido fólico se pierde, por ser la harina de trigo usada en muchos países como vehículo de fortificación (Thompson, 1999).

Diferentes estudios se han desarrollado con el propósito de determinar si los productos libres de gluten que se ofrecen en el mercado contienen cantidades de vitaminas y minerales similares a los productos elaborados con harina de trigo fortificada. Thompson (1999, 2000), evaluó el contenido de tiamina, riboflavina, niacina, folatos, hierro y fibra dietaria en más de 368 productos libres de gluten comercializados en Estados Unidos, encontrando que la mayoría proveen menor cantidad de al menos uno de estos nutrientes, lo que podría ocasionar deficiencia nutricional en las personas que rutinariamente incluyen estos productos en su dieta.

En otro estudio, Wild et al., (2010), encontraron que los individuos que se adhieren estrictamente a esta dieta presentan una ingesta de macronutrientes adecuada, similar a la de la población control que lleva una dieta con gluten, pero la ingesta de micronutriente es menor; especialmente el consumo de magnesio, hierro, zinc, manganeso, selenio y ácido fólico en las mujeres y de magnesio y selenio en los hombres, lo que sugiere que se deben mejorar nutricionalmente los productos libres de gluten para suplir estas necesidades.

Por otra parte, la malnutrición no solo afecta a quienes sufren enteropatías asociadas al consumo de gluten. En la actualidad, es reconocido que gran segmento de la población mundial, consume alimentos deficientes en hierro, yodo, riboflavina, ácido fólico, entre otros (Preedy et al., 2011). La deficiencia de micronutrientes es un factor agravante en el estado de salud, ya que estos son responsables de la regulación de diversas vías metabólicas; función que los hace indispensables para el ser humano (Fennema, 1996).

Una forma de combatir el problema es mediante el mejoramiento nutricional o fortificación de alimentos de origen vegetal, lo que permite que las personas obtengan de su dieta todos los macro y micronutrientes que necesitan para mejorar el bienestar y la calidad de vida (Preedy et al., 2011). Una opción viable, sencilla y económica es la germinación, proceso mediante el cual la semilla recupera su actividad biológica. Este proceso está soportado en cambios químicos y bioquímicos que generan cambios favorables en las semillas como el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes, la degradación de compuestos antinutricionales y cambios en las características funcionales y tecnológicas (Gil, 2011a).

Acorde a la norma del Codex, los alimentos exentos de gluten, que se empleen en sustitución de alimentos básicos, como harina o pan, deberán suministrar aproximadamente la misma cantidad de vitaminas y minerales que los alimentos originales conforme a la legislación del país en que se venda el alimento (CODEX, 2008). Sin embargo, esto en la práctica no se cumple, porque no existen normas gubernamentales que obliguen el enriquecimiento de los alimentos sin gluten (Gallagher, 2009).

Siguiendo la recomendación del Codex y con el fin de mejorar la calidad nutricional de los productos libres de gluten se ha contemplado la posibilidad de incorporar leguminosas germinadas en la formulación de estos alimentos. La germinación de leguminosas es una práctica común en los países orientales mientras que en los occidentales se ha aceptado sólo en los últimos años, gracias a que su sabor y sus cualidades nutricionales han mejorado (Prodanov et al., 1997).

Las leguminosas son una buena y económica fuente de proteínas, son ricas en hidratos de carbono, algunas vitaminas, especialmente tiamina, riboflavina y niacina y ciertos minerales como fósforo, potasio y sodio (Prodanov et al., 1997); características nutricionales que las hacen un material potencial para ser incluido en la formulación de alimentos para regímenes especiales y para la población en general.

## **2.2 Germinación**

La germinación es un proceso biológico natural de las plantas superiores mediante el cual la semilla sale de su fase de latencia, una vez que se dan las condiciones mínimas ambientales como: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y el desarrollo de la plántula. Este proceso está constituido por tres fases principales: imbibición, movilización de nutrientes y emergencia de la radícula (Prodanov et al., 1997; Sangronis & Machado, 2007).

La **imbibición** es la fase en la cual la semilla seca absorbe agua a través de los distintos tejidos que la conforman, provocando el hinchamiento de la misma y el aumento de su peso fresco (Goyoaga, 2005). Esta absorción conlleva a cambios metabólicos, que incluyen la respiración y la síntesis proteica (Kigel & Galili, 1995; Melgarejo, 2010).

La **movilización de nutrientes** representa el verdadero proceso de germinación. Es un momento de intensa actividad metabólica, que implica cambios estructurales subcelulares y síntesis de macromoléculas en donde el almidón y los cuerpos proteicos son convertidos en azúcares simples y aminoácidos que son transportados y oxidados para suplir el crecimiento y la elongación del embrión. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse (Melgarejo, 2010; Zieliński et al., 2006).

La última fase es la **emergencia de la radícula** asociada a un cambio morfológico visible en el cual se produce la elongación del embrión y la ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula. Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria. La duración de cada fase dependerá de las características de la semilla como su contenido de compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Además en estas fases, también intervienen las condiciones del medio, el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. (Gil, 2011a; Melgarejo, 2010).

### 2.3 Leguminosas

Las leguminosas son especies pertenecientes a la familia Fabaceae, que se caracterizan por la presencia de semillas contenidas en una vaina constituyendo el fruto (Goyoaga, 2005). El término leguminosa abarca especies muy diferentes entre sí, la mayoría pertenecientes a la subfamilia Papilionoiceae, en la que se encuentran las más consumidas por los seres humanos como son los garbanzos, las lentejas, los frijoles y las arvejas (León & Rosell, 2007).

Están clasificadas en dos grupos en función de su contenido lipídico, diferenciándose así las leguminosas oleaginosas como la soya y los cacahuates, con alto contenido lipídico que varía entre 20 y 50% y las legumbres secas como garbanzos, lentejas, frijoles y arvejas con un contenido de lípidos inferior al 7% (Goyoaga, 2005; Tiwari, 2011).

Existe evidencia demostrada de que las legumbres poseen un alto valor nutritivo. Sin embargo, presentan gran cantidad de sustancias antinutricionales, cuya eliminación

es necesaria si se quieren utilizar como alimento. En general, las leguminosas están asociadas con la salud y la seguridad alimentaria, pero además presentan dos grandes ventajas: bajo precio y facilidad de almacenamiento (León & Rosell, 2007).

**2.3.1 Composición química y valor nutricional:** las leguminosas son de gran interés desde el punto de vista nutricional, debido al contenido de proteína y almidón en proporciones adecuadas, así como por la presencia de vitaminas y microelementos (Goyoaga, 2005). Su composición química varía por factores ambientales como el tipo de cultivo, la localización geográfica y las condiciones de crecimiento (Tiwari, 2011).

**Proteínas:** el contenido proteico de las leguminosas varía desde 15 hasta 45%, siendo dos veces superior al de los cereales (Goyoaga, 2005). Estas contienen tres principales clases de proteínas de almacenamiento que en conjunto, constituyen más del 80% del total de proteínas presentes en la semilla y por lo tanto, son las responsables de la calidad nutricional de la leguminosa y de las propiedades funcionales de los productos derivados de estas (Kigel & Galili, 1995).

La clase más abundante son las globulinas, descritas por Osborne como proteínas solubles en soluciones de sal. Comúnmente están clasificadas en dos tipos, vicilinas y leguminas, distinguidas por su tamaño y contenido de azúcar y una tercera clase denominadas lectinas o proteínas unidas a carbohidratos (Kigel & Galili, 1995; Tiwari, 2011). Según el fraccionamiento de Osborne, las leguminosas contienen un 70% de globulinas, 10-20% de albúminas, 10-20% de glutelinas y una muy pequeña fracción de prolaminas (León & Rosell, 2007).

En el garbanzo y la lenteja, el contenido proteico varía de 17,9 a 30,8% y de 21,3 a 30,2% respectivamente (Wang & Daun, 2004). Su proteína es rica en lisina y arginina pero deficiente en aminoácidos que contienen sulfuro. Por lo tanto, la inclusión de estas legumbres en una dieta a base de cereales puede equilibrar el contenido de aminoácidos y mejorar su valor nutricional. Las globulinas en el garbanzo y la lenteja, representan casi el 60% de las proteínas totales (Canadá Pulse, 2013; Tiwari, 2011).

**Lípidos:** el contenido graso en las leguminosas es bajo, alrededor del 1-2%, excepto en el garbanzo que es algo superior (6%) (León & Rosell, 2007). Los lípidos de las leguminosas se caracterizan por ser ricos en ácidos grasos esenciales como el linoleico (21-53%) y linolénico (4-22%) (Tiwari, 2011). En menor cantidad algunas leguminosas también contienen ácidos grasos saturados como el ácido esteárico o el palmítico, siendo este último el más abundante (Goyoaga, 2005). El contenido lipídico en el garbanzo varía entre 5 y 6% mientras que en la lenteja esta alrededor de 1% (Canadá Pulse, 2013).

**Carbohidratos:** las leguminosas contienen aproximadamente 60-65% de carbohidratos, de los que el principal constituyente es el almidón conformado por 30% de amilosa y 70% de amilopectina (Canadá Pulse, 2013; Tiwari, 2011). A este se le han atribuido beneficios para la salud ya que contribuye a disminuir la liberación de glucosa, induciendo a una disminución del índice glicémico mientras que la fibra dietaria está involucrada en la salud gastrointestinal (León & Rosell, 2007).

Los carbohidratos totales están entre 52 y 70% para los garbanzos y 61 y 67% para las lentejas. El almidón en los garbanzos representa aproximadamente el 46%, con un contenido de amilosa entre 20,5 y 29,2%; el granulo es ovalado con un tamaño entre 20 y 35  $\mu\text{m}$ . En la lenteja el granulo de almidón tiene forma elipsoidal y su tamaño esta entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ ; este representa el 51% del total de carbohidratos y su contenido de amilosa está entre 22,5 y 28,3% (Canadá Pulse, 2013).

La cantidad de fibra se sitúa alrededor del 25%, aunque las lentejas poseen un porcentaje ligeramente superior (30,5%) y los garbanzos inferior (17,4%) (Canadá Pulse, 2013). La fibra se encuentra presente fundamentalmente en la capa externa de la semilla denominada testa, pero también existe cierta cantidad en las paredes de las células de los cotiledones (León & Rosell, 2007).

**Vitaminas:** las leguminosas son una buena fuente de vitaminas hidrosolubles, particularmente de las del complejo B. Sin embargo, su biodisponibilidad puede ser afectada por las interacciones con fibra, almidón, lípidos o fenoles; incluso el almacenamiento y el procesamiento pueden reducir su contenido. Es el caso de la vitamina C, que además de estar presente en baja cantidad, desaparece durante el almacenamiento y la cocción. Las lentejas son buena fuente de riboflavina y niacina mientras que los garbanzos tienen alto contenido de folatos y tiamina (Goyoaga, 2005; Tiwari, 2011).

**Minerales:** El contenido de minerales de las leguminosas esta entre 2,5 y 4,2%. El potasio es el más abundante, seguido de fósforo, magnesio, calcio y hierro. Sin embargo, el hierro presente sólo se absorbe en un 10%, debido a la presencia del ácido fítico que dificulta la absorción tanto del ion ferroso como del férrico (León & Rosell, 2007). En general, los minerales acumulados en las leguminosas tienen una baja biodisponibilidad debido a la presencia de macrocompuestos que forman complejos con ellos comprometiendo su utilización (Goyoaga, 2005). Las lentejas son buena fuente de hierro y zinc y los garbanzos de calcio y zinc (Tiwari, 2011).

**2.3.2 Factores antinutricionales:** en los últimos años, la incorporación de leguminosas en la formulación de alimentos se ha convertido en una práctica común, gracias a que sus propiedades físico-químicas generan un impacto positivo, tanto en

el valor nutricional como en las propiedades del alimento. Sin embargo, su utilización se ve limitada por la presencia de compuestos antimetabólicos/antifisiológicos que pueden reducir su aprovechamiento y que producen efectos adversos en la salud humana (Benítez et al., 2013).

Los factores antinutricionales se definen como aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, ya que durante el proceso de digestión dificultan o inhiben la asimilación de los nutrientes que provienen de estos (Elizalde, 2009). Desde un punto de vista bioquímico son compuestos de naturaleza muy variada en los que se incluyen aminoácidos no proteicos, polifenoles (taninos), glúcidos (saponinas), proteínas (inhibidores de proteasas, lectinas), fitatos, etc. (Goyoaga, 2005; Muzquiz et al., 2004; Tiwari, 2011).

Por ejemplo, las saponinas no se absorben en el intestino y por lo tanto afectan la absorción del zinc y el hierro. Los taninos tienen la capacidad de unirse a enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, entre otros y formar complejos con el hierro del alimento, dificultando la digestión de los nutrientes. Por su parte, los inhibidores de proteasas alteran la digestión de las proteínas, impidiendo que las enzimas digestivas las hidrolicen (Elizalde et al., 2009; Muzquiz et al., 2004).

Además estos compuestos causan sensaciones desagradables como vómitos, flatulencias, distensión abdominal, entre otros síntomas; particularmente cuando las leguminosas se consumen sin ningún tratamiento previo (Tiwari, 2011), por lo que es una práctica común eliminar estas sustancias mediante el remojo, la germinación y la cocción (León & Rosell, 2007). Sin embargo, datos recientes apoyan la idea de que en pequeñas cantidades, estos compuestos pueden ser muy beneficiosos en la prevención de enfermedades y están siendo considerados como compuestos activos capaces de ejercer un efecto biológico una vez son absorbidos (Goyoaga, 2005; Muzquiz et al., 2004).

De hecho, actualmente se les denomina “factores nutricionalmente activos” ya que son mejoradores de la respuesta inmune, protectores del sistema circulatorio, reguladores del colesterol, reductores de la presión sanguínea, actúan como prebióticos y anticancerígenos, etc. (Goyoaga, 2005; Muzquiz et al., 2004). Un ejemplo bien conocido es el ácido fítico que puede reducir la biodisponibilidad de algunos minerales, particularmente el hierro; pero también es conocido que tiene propiedades antioxidantes. Por consiguiente, este compuesto tiene doble rol, uno que puede ser perjudicial y otro que puede ser benéfico para la salud (Tiwari, 2011).

**2.3.3 Efecto de la germinación sobre la calidad nutricional de las leguminosas:** la germinación ha sido identificada como una tecnología económica y eficaz que

genera cambios positivos en la calidad nutricional y en las cualidades organolépticas de las semillas; gracias a que favorece la descomposición de polímeros de alto peso molecular, contribuyendo a la generación de sustancias bio-funcionales que afectan de forma variable la composición proximal, además las hace más digeribles, más blandas y con mayor sabor (Maneemegalai & Nandakumar, 2011). Estos cambios pueden variar en función del tipo de vegetal, la variedad de la semilla y las condiciones de germinación (Sangronis & Machado, 2007).

Varios estudios se han desarrollado con el objetivo de identificar el efecto de la germinación en las leguminosas, encontrando que este proceso puede aumentar el contenido de proteína y fibra dietética, reducir el contenido de factores antinutricionales como taninos y ácido fítico y aumentar la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (Megat et al., 2011; Muzquiz et al., 2004). Las semillas germinadas son por lo general buena fuente de ácido ascórbico, riboflavina, niacina, tiamina, tocoferol, ácido pantoténico, calcio, cobre, manganeso y zinc. Generalmente, estos factores suelen formar parte de las sustancias de reserva de la semilla y durante el proceso de germinación van siendo degradados y utilizados en el desarrollo de la plántula (Maneemegalai, 2011; Sangronis & Machado, 2007).

**2.3.4 Uso de leguminosas en productos libres de gluten:** la incorporación de harinas obtenidas a partir de leguminosas en los productos panificados mejora su calidad nutricional, ya que aumenta su calidad y cantidad proteica. Además, por su contenido de almidón resistente, pueden utilizarse en formulaciones con cantidades reducidas de grasa y azúcar y como fuente de fibra. Sin embargo, la presencia de estas harinas no siempre favorece las características reológicas de las masas y las características físicas y sensoriales de los productos finales (León & Rosell, 2007).

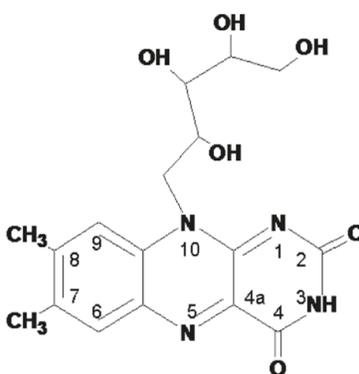
Miñarro et al., (2012), evaluaron el efecto de las harinas de leguminosas en las características de cocción del pan sin gluten encontrando que el producto final presentaba buenas características físico-químicas y un perfil sensorial adecuado. Petitot et al., (2010), concluyeron que las pastas fortificadas con harinas de leguminosas son una buena alternativa para las personas que desean mejorar la calidad nutricional de su dieta. En otros estudios, los investigadores observaron que los panes elaborados con harinas de leguminosas presentan menor volumen, corteza más oscura y miga más amarilla, pero los análisis sensoriales realizados indicaron que los panes presentan textura, sabor y color apetecibles (León & Rosell, 2007).

Por todo lo anterior el uso de leguminosas en la elaboración de dichos productos parece tener buenas expectativas en el mercado ya que permite la obtención de alimentos con buena calidad nutricional, organolépticamente aceptables y a bajo costo, lo que permite ofrecer al consumidor una mayor variedad, especialmente en

sectores de la población con deficiencias o requerimientos nutricionales especiales (León & Rosell, 2007).

## 2.4 Micronutrientes de interés

**2.4.1 Riboflavina (Rbf):** es una vitamina hidrosoluble de color amarillo perteneciente al complejo B (vitamina B2) con un peso molecular de 376,3 g/mol. Su fórmula química es  $C_{17}H_{20}N_4O_6$  (EVM, 2002) y está constituida por un anillo de isoaloxazina dimetilado al que se une una molécula del azúcar-alcohol ribitol, derivado de la ribosa. Los tres anillos forman la isoaloxacina y el ribitol es la cadena de 5 carbonos en la parte superior (**Figura 3**) (Fennema, 1996; Yang Wang et al., 2011).



**Figura 3.** Estructura química de la riboflavina con átomos numerados.  
Tomado de Guzmán (2008).

Esta vitamina normalmente se encuentra fosforilada integrando el FMN (Flavin-Mono-Nucleótido) y FAD (Flavin-Adenin-Dinucleótido); que funcionan como coenzimas de las flavoproteínas, estas últimas responsables de regular los procesos de transferencia de hidrógenos en los procesos metabólicos de óxido-reducción (Lim, Choi, & Park, 2001; Yonezawa & Inui, 2013).

En los seres humanos, la Rbf apoya el crecimiento óptimo del cuerpo, se requiere para la descomposición de la grasa y la producción de glóbulos rojos, ayuda a mantener la integridad de las membranas mucosas, la piel, los ojos, el sistema nervioso, participa además en los procesos de respiración celular, desintoxicación hepática y desarrollo del embrión. Su deficiencia puede ocurrir como resultado de una nutrición inadecuada o mala absorción intestinal (EVM, 2002; Gil, 2011b).

Debido a su solubilidad, esta vitamina se puede perder durante el remojo, lavado o cocción de granos, frutas y hortalizas. Su estabilidad a altas temperaturas y pH menores a 7 es muy buena en la mayoría de los alimentos, pero a medida que se acerca a la neutralidad, se vuelve sensible, y en condiciones alcalinas se

descompone rápidamente, acelerándose aún más en presencia de la luz (Badui, 1996; Fennema, 1996). En Colombia el consumo de Rbf, según los valores diarios de referencia de nutrientes, se tiene determinado así: niños mayores de 6 meses y menores de 4 años 0,45 mg y niños mayores de 4 años y adultos 1,7 mg (Resolución 333, 2011).

**2.4.2 Hierro (Fe):** este mineral participa en la síntesis de hemoglobina y mioglobina, en la formación de huesos, es constituyente del tejido cerebral y es cofactor de las enzimas flavina, peroxidasa, catalasa e hidroxilasa, lo que lo hace un micronutriente esencial (Belitz et al., 2009).

La necesidad diaria de hierro esta entre 1,5 y 2,2 mg, aunque depende de la edad y el sexo del individuo. Según los valores diarios de referencia de nutrientes en Colombia, para dar cumplimiento a este requerimiento, el hierro ingerido en la dieta para niños mayores de 6 meses y menores de 4 años debe ser 12 mg y para niños mayores de 4 años y adultos 18 mg (Resolución 333, 2011).

La biodisponibilidad de este mineral se determina por el grado de absorción del hierro dietario cuando llega al intestino. El hierro en los alimentos puede estar en forma orgánica contenido en los grupos hemo o inorgánica conformado por las sales férricas ( $Fe^{3+}$ ) y ferrosas ( $Fe^{2+}$ ) (Fennema, 1996).

El hierro orgánico participa en la estructura del grupo hemo (hierro unido a una porfirina) que forma parte de la hemoglobina, mioglobina y diversas enzimas, por lo que se encuentra exclusivamente en alimentos de origen animal. Gracias a su estructura molecular, esta clase de hierro es más disponible ya que en la mucosa intestinal, el grupo hemo se destruye y el hierro contenido en éste se libera permitiendo entre un 20 y 30% de absorción (Belitz et al., 2009; Fennema, 1996).

Por su parte, el hierro inorgánico contenido en alimentos de origen vegetal presenta menor disponibilidad porque este se une principalmente a proteínas, fitatos u otros ligandos, dificultando su absorción, entre 1,0 y 1,5% (Belitz et al., 2009). Solamente en estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) el intestino es capaz de absorber el hierro, por lo que en el estómago gracias al ácido estomacal, parte de las sales férricas se reducen a ferrosas y en esta forma atraviesan la mucosa gastrointestinal (Badui, 1996).

**2.4.3 Zinc:** es un elemento químico esencial para los seres humanos ya que es necesario para que el sistema inmunitario funcione apropiadamente, además interviene en el metabolismo de proteínas y carbohidratos, en las percepciones del gusto y el olfato, en la cicatrización de las heridas y es cofactor de enzimas implicadas en la síntesis de ADN (Fennema, 1996).

El contenido total de zinc en el cuerpo humano adulto es de 2-4 g/Kg y el requerimiento diario es de 5-10 mg, cantidad proporcionada por una dieta normal (6-22 mg de zinc/día). La deficiencia de zinc provoca trastornos graves, mientras que la alta ingesta resulta tóxica (Belitz et al., 2009).

## **2.5 Trabajo experimental**

### **2.5.1 Materiales**

Se utilizaron granos secos de lenteja (*Lens culinaris*) variedad verde y garbanzo (*Cicer arietinum*) variedad kabuli, con una humedad de  $9,27 \pm 0,11\%$  y  $9,91 \pm 0,06\%$  respectivamente; ambos envasados en polietileno transparente y adquiridos en supermercados de cadena de la ciudad de Medellín, Colombia, siendo seleccionados por su integridad, homogeneidad y sanidad aparente. Para el proceso germinativo se utilizó agua destilada y para el método HPLC se utilizó agua Milli Q. Los solventes utilizados (ácido clorhídrico, metanol, acetato de amonio, ácido acético) fueron grado HPLC marca Merck.

### **2.5.2 Métodos**

**2.5.2.1 Prueba germinativa:** permite estimar el porcentaje de semillas viables para germinar. Dos réplicas de 10 semillas lavadas y desinfectadas se ubicaron en cajas de petri con papel filtro y 7 mL de agua destilada. Las semillas se dejaron germinar a temperatura ambiente ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ), en ausencia de luz durante 4 días. Por último, se determina el porcentaje de germinación ( $\text{Semillas germinadas} / \text{Total de semillas} \times 100$ ). La prueba exige que el 90% de las semillas germinen (Miceli & Miceli, 2012; Wei et al., 2012).

**2.5.2.2 Proceso de germinación:** la germinación de las leguminosas se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la **Figura 4**.

**2.5.2.3 Curva de imbibición:** esta se construyó según el método reportado por Pablo-Pérez et al., (2013). Para ello se tomaron 30 granos de lenteja y garbanzo lavados y desinfectados previamente con hipoclorito de sodio a 50ppm, se tomaron 6 cajas de petri con papel filtro y en cada una se colocaron 5 granos y 7 mL de agua destilada, sin cubrir totalmente las semillas. Las cajas se llevaron a una estufa a  $27^\circ\text{C} \pm 1$  con una humedad relativa de 70%, durante 72 horas. Se tomaron tres granos de cada caja en los intervalos de tiempo: 0, 24, 48 y 72 horas y se midió la humedad (%) en cada periodo según el método AOAC 997.10; con los datos obtenidos se construyó la curva de imbibición Humedad vs Tiempo.

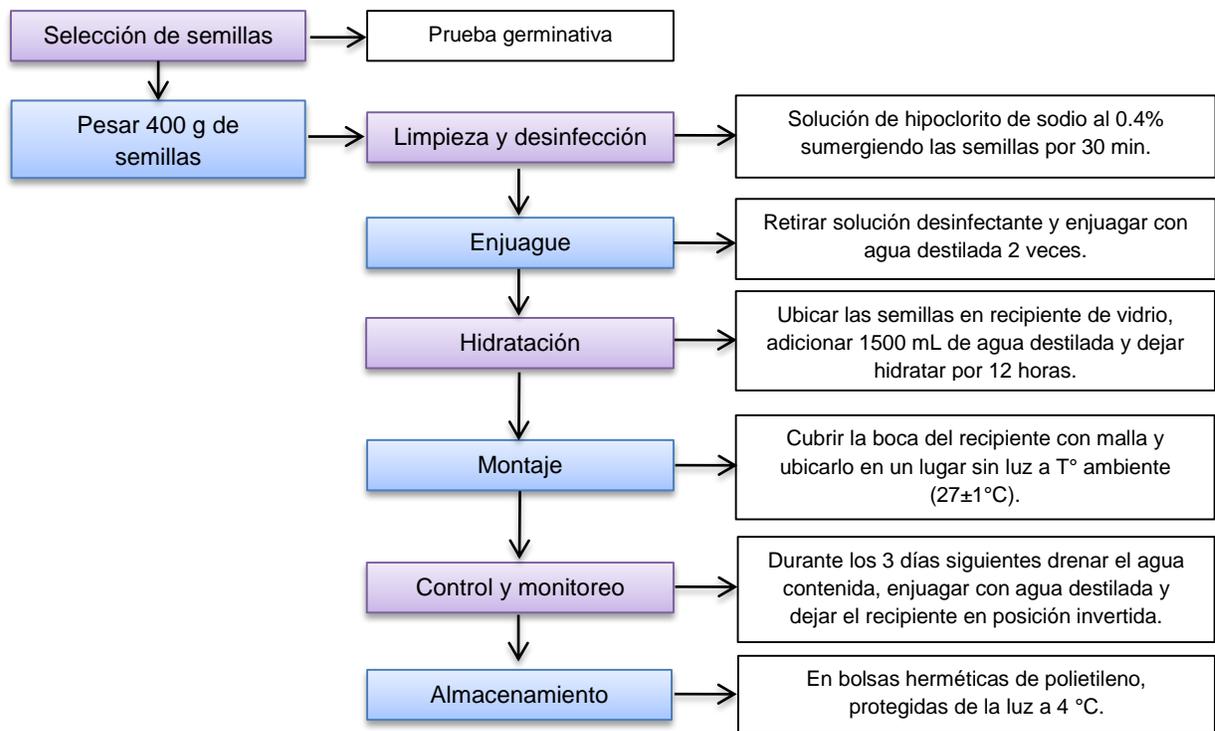


Figura 4. Proceso de germinación para las leguminosas.

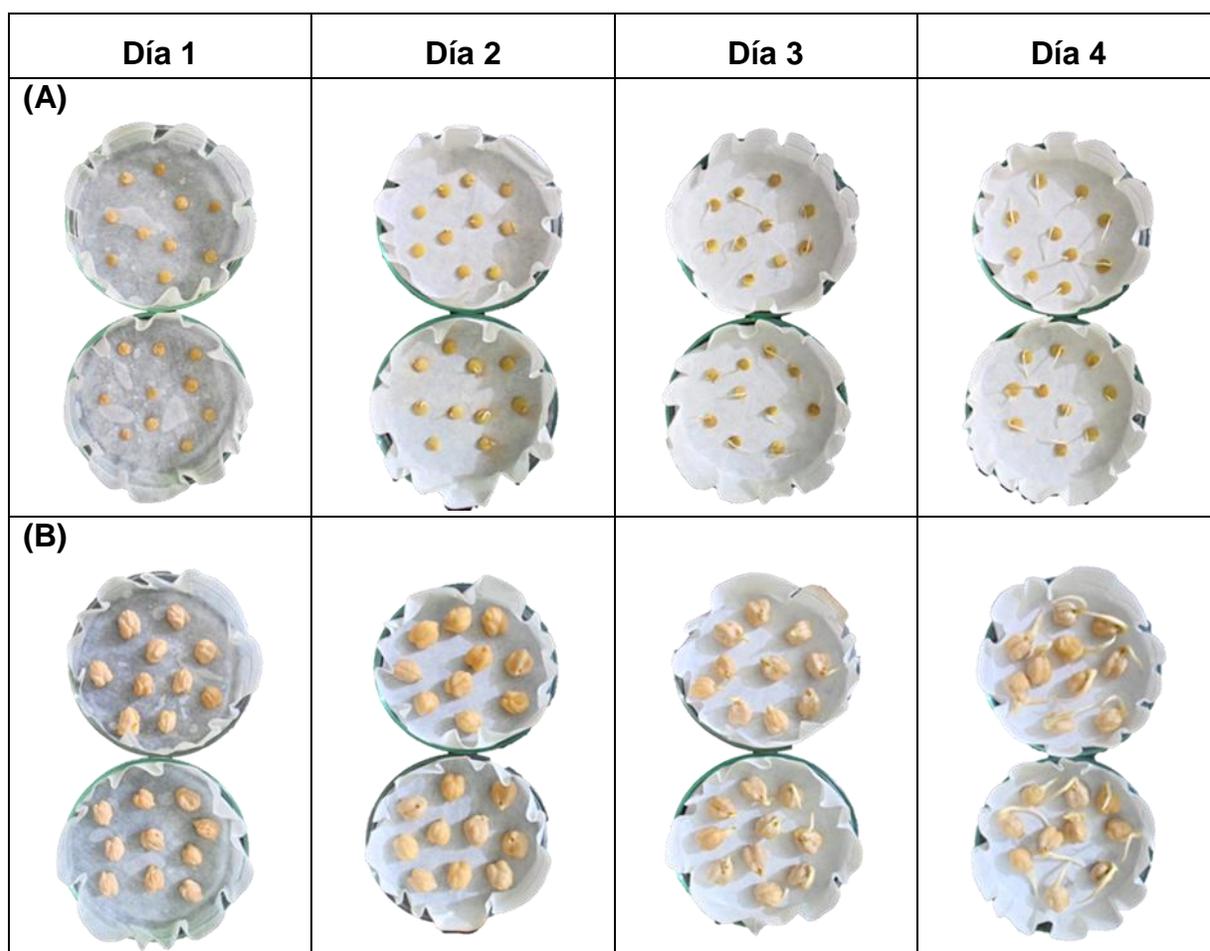
**2.5.2.4 Obtención de harinas:** los granos fueron secados en horno convectivo Kwik – co Salva con fuente de calor eléctrica a una temperatura de  $55 \pm 2$  °C, los granos germinados por 6 horas y los granos sin germinar por 1 hora, debido a las diferencias de humedad inicial; luego se sometieron a reducción de tamaño con un molino de cuchillas Wiley Mill N° 3 y posteriormente se tamizaron por malla ASTM 60 (250  $\mu$ m) para homogenizar el tamaño de partícula. Las harinas fueron almacenadas en bolsas herméticas de polietileno de alta densidad, protegidas de la luz, en un lugar fresco a temperatura ambiente. Los procesos de obtención y molienda se realizaron en el laboratorio de vegetales de la Universidad de Antioquia.

**2.5.2.5 Cuantificación de Rbf por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** la extracción se realizó con HCL 0,1N y ácido acético 0,02 N como solvente, con estándar secundario validado, fase móvil de acetato de Amonio 0,005M:MeOH (72:28), en un equipo Merck-Hitachi Modelo D-7000IF con detector de fluorescencia, longitud de onda: Ex: 450nm Em: 525nm, temperatura de 30°C, Columna C18, 150 cm x 3,9  $\mu$ m, Flujo de 1,0 mL/min y volumen de inyección de 50  $\mu$ L.

**2.5.2.6 Cuantificación de Fe y Zn por espectrofotometría de absorción atómica:** se realizó según el método oficial AOAC 999.10 (AOAC, 1997).

## 2.6 Resultados y Discusión

**2.6.1 Prueba germinativa:** se seleccionó como parámetro de prueba la extensión radicular igual a  $3,0 \pm 0,3$  cm, obteniendo 10 semillas germinadas de lenteja con una humedad final de  $66,18 \pm 0,31\%$  y 9 semillas germinadas de garbanzo con una humedad final de  $57,02 \pm 1,00\%$ . La prueba exige que mínimo el 90% de las semillas germinen, en ambas leguminosas, bajo las condiciones de trabajo establecidas se cumplió este parámetro, con un 100% para las semillas de lenteja y un 90% para las semillas de garbanzo, mostrando granos con alta potencialidad y vitalidad (**Figura 5**).

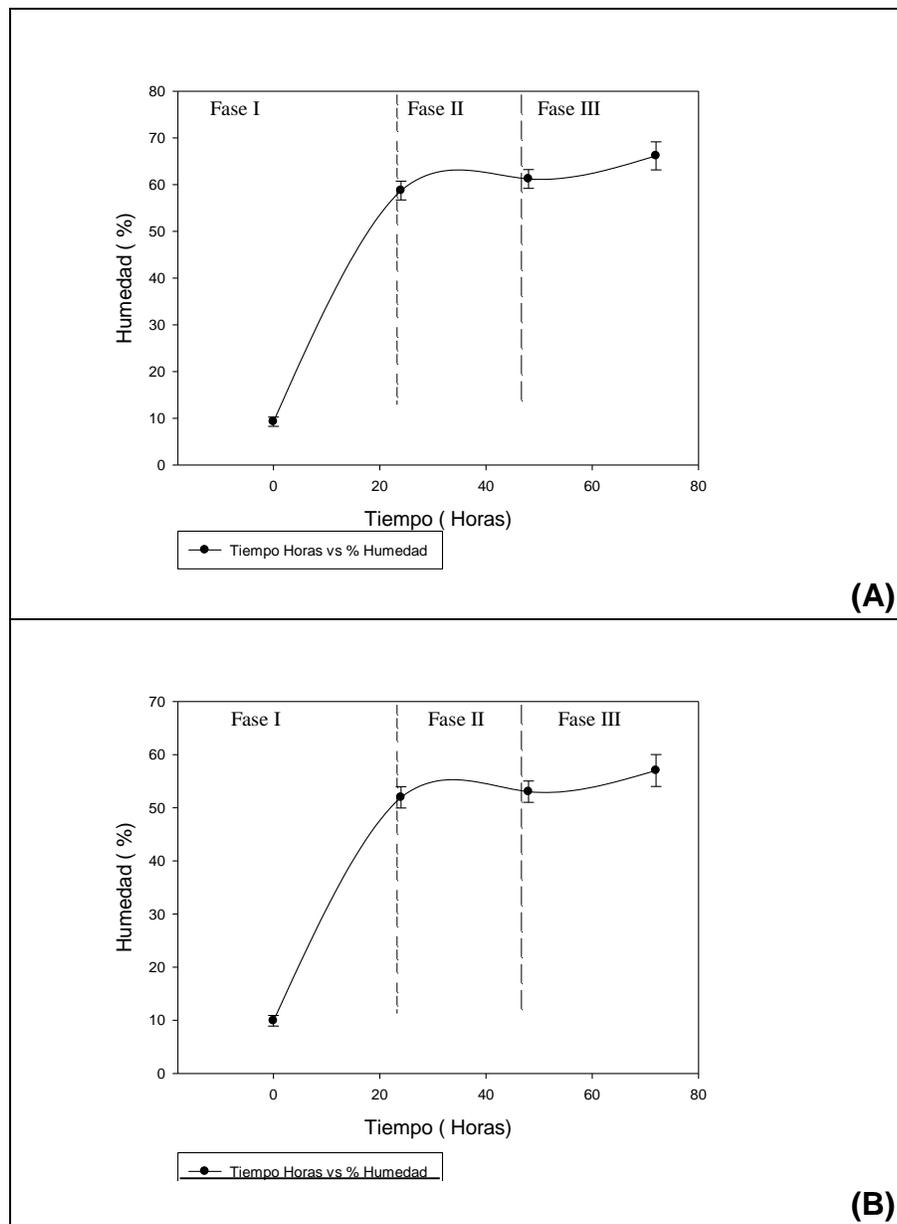


**Figura 5.** Prueba germinativa para (A) Lenteja y (B) Garbanzo.

Imágenes obtenidas por el autor del trabajo de investigación en el grupo GEMCA de la Universidad de Antioquia.

**2.6.2 Germinación y curvas de imbibición:** al iniciar el proceso germinativo la humedad para ambas semillas fue baja,  $9,27 \pm 0,11\%$  para la lenteja y  $9,91 \pm 0,06\%$  para el garbanzo, indicando que se encontraban en estado basal, con sus cinéticas de metabolismo, minimizadas. Nonogaki et al., (2010), informaron que las semillas con un bajo contenido de agua, entre 7 y 14%, son metabólicamente inactivas,

encontrándose en un estado seco de madurez, y por lo tanto los eventos fisiológicos y químicos son mínimos. Con los datos obtenidos bajo las condiciones de trabajo especificadas, se construyeron las curvas de imbibición (**Figura 6**); y según los puntos de inflexión se distinguen las tres fases de la germinación bien diferenciadas.



**Figura 6.** Curva de imbibición para los granos de (A) Lenteja y (B) Garbanzo.

La germinación de semillas se presenta en un ambiente biológico complejo y es regulado por un gran número de mecanismos y factores como actividad hormonal, genética, enzimática y sus interacciones. Las principales hormonas que actúan en los proceso vegetales son: ácido abscísico (ABA), etileno, giberelina, auxinas (AIA),

citoquininas y brasinoesteroides. La hormona ABA actúa en el proceso de latencia, inactivando la germinación mientras que las giberelinas, auxinas y brasinoesteroides inducen a esta, iniciando la ruptura del endospermo y las capas externas, siendo antagonistas de la hormona ABA. Las giberelinas promueven la germinación, activando las enzimas catabólicas e inhibiendo las rutas biosintéticas de la ABA (Miransari & Smith, 2014).

Durante la germinación, los principales procesos metabólicos son la respiración y la movilización de sustancias de reserva. En la **Figura 6** se pueden observar tres puntos de inflexión, indicando posiblemente las tres fases, que evidencian la presencia de cubiertas permeables y un aumento del potencial osmótico de las células del tejido del grano (Kigel & Galili, 1995). La fase I se presentó entre las 0 y 24 horas, con alto gradiente de absorción de agua, por lo que la humedad de los granos de lenteja aumento de  $9,27\pm 0,11\%$  a  $58,74\pm 0,25\%$  y en el garbanzo de  $9,91\pm 0,06\%$  a  $51,96\pm 0,26\%$ . La semilla se observó turgente y con aumento aparente de su volumen.

Esta fase es conocida como imbibición y es el resultado de la hidratación de matrices, como paredes celulares y polímeros de pared, en la cual se incrementa la absorción de agua con el tiempo debido a la hidratación uniforme de las células. La cinética de absorción es influenciada por la estructura de la semilla y está asociada a las rutas de migración del agua en los diferentes tejidos (Melgarejo, 2010). Esta absorción genera el microambiente interno en la semilla para activar las reacciones químicas y enzimáticas que caracterizan la germinación, además se da un rápido incremento de la respiración, que se produce antes de transcurridas 12 horas desde el inicio de la imbibición y puede atribuirse en parte a la activación e hidratación de enzimas mitocondriales (Goyoaga, 2005).

La fase II, reconocida como fase de activación y germinación, se presentó entre las 24 y 48 horas, en esta se hizo visible la ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de los primeros tejidos en crecimiento del embrión, con decrecimiento del gradiente de absorción de agua; la humedad de los granos aumentó de  $58,74\pm 0,25\%$  a  $61,22\pm 0,21\%$  en la lenteja y de  $51,96\pm 0,26\%$  a  $53,03\pm 0,48\%$  en el garbanzo.

En esta fase ocurren varios cambios: se da la movilización de nutrientes, con intensa actividad metabólica, que implica cambios estructurales subcelulares y síntesis de macromoléculas en donde el almidón y los cuerpos proteicos son convertidos en azúcares simples y aminoácidos que son transportados y oxidados para suplir el crecimiento y la elongación del embrión. También se da inicio a la germinación, una vez que el agua atraviesa las envueltas seminales y llega al embrión en cantidad

suficiente, éste se activa y comienzan los procesos metabólicos necesarios para su crecimiento y transformación en una planta autónoma (Kigel & Galili, 1995).

Por último, la toma de agua y de oxígeno se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse. La actividad respiratoria se estabiliza entre las 12 y 24 h desde el inicio de la imbibición, debido en parte a que las cubiertas seminales, que todavía permanecen intactas, limitan la entrada de O<sub>2</sub>. Durante esta fase, la hidratación de la semilla se ha completado y todas las enzimas presentes se activan (Goyoaga, 2005).

En la fase III, se completó el crecimiento del tejido, con color blanco y textura firme, asociado a la continuación del crecimiento del embrión; también hay un aumento en el gradiente de humedad entre las 48 y 72 horas, de 61,22±0,21% a 66,18±0,31% en la lenteja y de 53,03±0,48% a 57,02 ±1,00% en el garbanzo. Esta fase está asociada a un cambio morfológico visible en el cual se produce la elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula y se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria, esta última asociada a una mayor disponibilidad de O<sub>2</sub> como consecuencia de la ruptura de la testa y a la actividad de las mitocondrias y enzimas respiratorias, recientemente sintetizadas en las células del eje embrionario en desarrollo (Goyoaga, 2005; Melgarejo, 2010).

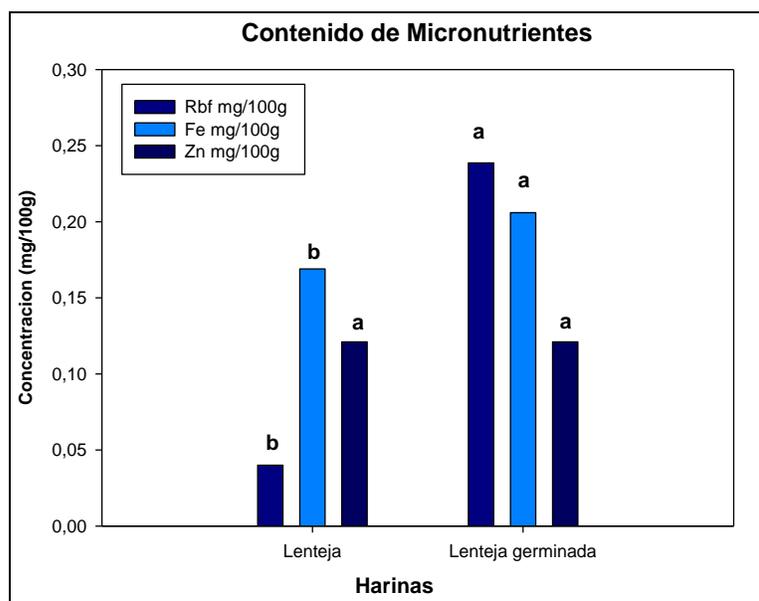
Los granos germinados (**Figura 7**) se obtuvieron en un tiempo de 4 días y a partir de estos se obtuvieron las harinas de leguminosas germinadas, sin embargo la cuantificación de micronutrientes solo se le realizó a la harina de lenteja germinada por ser de mayor interés para fines del estudio y porque la germinación de los granos de garbanzo fue más compleja y susceptible a presentar rancidez, posiblemente por el alto contenido lipídico de esta leguminosa.



**Figura 7.** Granos germinados de lenteja. Imagen obtenida por el autor del trabajo de investigación en el grupo GEMCA de la Universidad de Antioquia.

**2.6.3 Cuantificación de micronutrientes:** diversos estudios reportan que en la germinación aumenta el contenido de proteína, minerales y vitaminas y elementos traza, así como su biodisponibilidad y se reduce el contenido de taninos y fitatos (Megat Rusydi et al., 2011). Estos cambios en la composición de los granos germinados, están asociados a la activación de múltiples enzimas y a los procesos metabólicos que requieren energía y generan productos.

Al comparar la harina de lenteja germinada con la harina de lenteja sin germinar, se observa que la germinación mejoró el contenido de hierro y Rbf y presentó una variación neta en el zinc (**Figura 8**); con  $1,20 \pm 1,2$  y  $1,21 \pm 1,6$  mg/100g en harina de granos sin germinar y granos germinados, respectivamente. Es posible que el Zn utilizado metabólicamente sea similar al contenido de Zn producido durante la germinación, obteniendo una diferencia no significativa, ya que durante este proceso todos los componentes están cambiando.



**Figura 8.** Contenido de micronutrientes en la harina de lenteja germinada y sin germinar. Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%; DS 0,0039.

El contenido de hierro en ambas harinas presentó diferencia significativa ( $P > 0,05$ ), siendo la harina de granos germinados la de mayor contenido de este mineral con  $2,06 \pm 0,5$  mg/100g, mientras que la harina de granos sin germinar contenía  $1,69 \pm 0,2$  mg/100g. Este incremento puede estar asociado al proceso de síntesis de proteínas, en el cual se forman enzimas ferritinas como peroxidases, lipooxigenasas y catalasas, y hormonas que contiene hierro como cofactor, haciendo que aumente la concentración de este mineral (Belitz et al., 2009).

Otra posible explicación es que durante la germinación, se incrementa la actividad de las fitasas y como consecuencia el ácido fítico disminuye. Es conocido que este compuesto tiende a ligar cationes, tales como calcio, hierro y zinc reduciendo su biodisponibilidad. Una vez que el ácido fítico se degrada, estos elementos están más biodisponibles y por lo tanto su concentración aumenta, convirtiendo a las leguminosas en buena fuente de minerales (Sangronis & Machado, 2007).

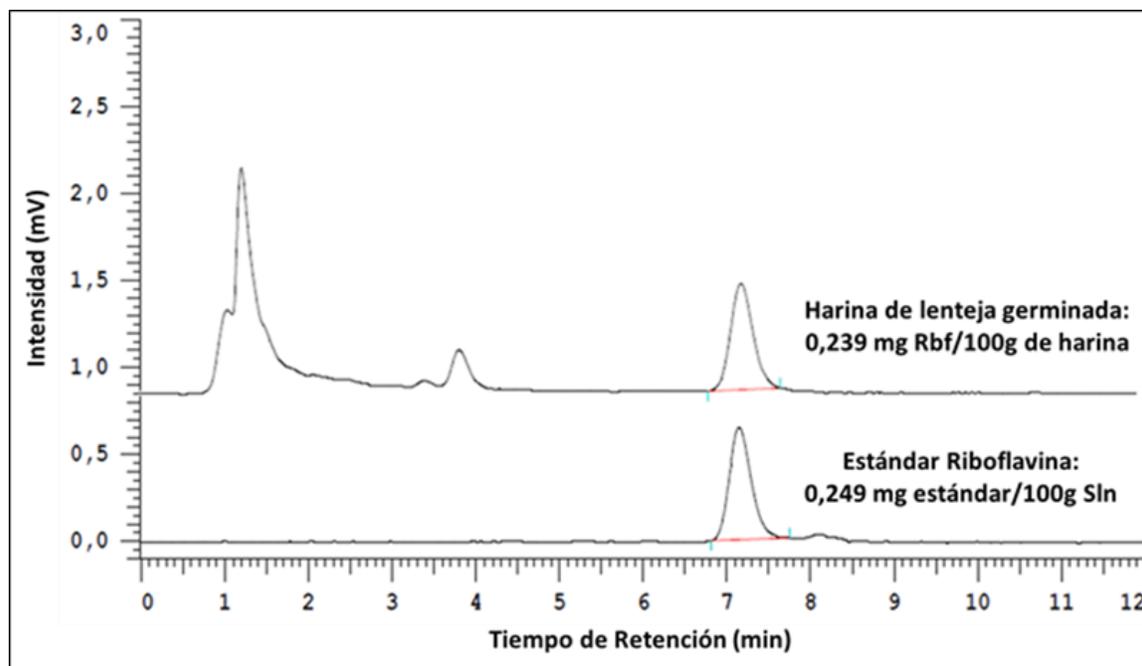
Por otra parte, estos minerales también se pueden convertir en quelatos por reacciones de complejación con pequeños ligandos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido ascórbico y diversos aminoácidos, aumentando su biodisponibilidad. La germinación aumenta las cantidades de aminoácidos y de ácido ascórbico, favoreciendo la quelación y por consiguiente una mejor biodisponibilidad de los cationes (Lintschinger et al., 1997)

Respecto al comportamiento de la Rbf, ha sido demostrado que la germinación tiene un efecto importante en la concentración de las vitaminas solubles en agua, especialmente en las pertenecientes al complejo B, que se encuentran en las leguminosas y se ha observado que con la germinación los niveles se incrementan del 100 al 300% (Goyoaga, 2005; Prodanov et al., 1997).

La Rbf solo es biosintetizada por bacterias, hongos y plantas, siendo para el hombre y los animales un compuesto esencial que han de adquirir a través de la dieta. Los humanos pueden sintetizar flavín mono nucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD), que son coenzimas y grupos prostéticos de flavoenzimas y flavoproteínas, pero no sintetizan Rbf como tal. Durante la germinación se presenta la síntesis de coenzimas flavin, que actúan como promotores de esta vitamina, las plantas tienen la capacidad de formar Rbf, a partir de las dos coenzimas aumentando su concentración (Roje, 2007). El contenido de Rbf hallado en las harinas se observa en la **Figura 8**. El cromatograma (**Figura 9**) muestra la Rbf con un tiempo de retención de 6,864 min.

El contenido de Rbf encontrado fue de  $0,040 \pm 0,00$  y  $0,239 \pm 0,01$  mg/100g para harinas de granos sin germinar y germinados, respectivamente; esta última con un valor 5 veces mayor al de la harina sin germinar. Se ha reportado que el contenido de vitaminas del complejo B y tocoferoles, se incrementan entre 1,5 y 3,8 veces, cuando los granos son germinados (Preedy et al., 2011). En estudios revisados, en germinados de 5 días, se muestra una correlación positiva entre la enzima superóxido-reductasa – SOD y el contenido de Rbf, así como aumento de Fe en un 18% y la presencia de otros minerales (Roje, 2007).

En otro estudio revisado, explican el aumento de Rbf como resultado de la biosíntesis durante la germinación, asociada a la actividad microbiana, como flora natural de la semilla. Este fenómeno fue observado por Prodanov, Sierra, & Vidal-Valverde, (2004) en sus investigaciones sobre la germinación y fermentación de lentejas, donde el remojo es una parte inicial de este tratamiento; ellos atribuyeron el aumento de esta vitamina a la existencia de algunos microorganismos, principalmente *Lactobacillus*, en la cubierta de estas leguminosas, capaces de sintetizar Rbf inmediatamente después de la humidificación de las semillas.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico del contenido de riboflavina en la harina de lenteja germinada.

Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación.

Los bioprocesos de germinación y generación de brotes, en granos y semillas, en la actualidad están siendo aplicados como estrategia de transformación bioquímica a nivel nutricional, disminución de factores antinutricionales y aumento de biodisponibilidad, aunque muchos fenómenos químicos, bioquímicos y enzimáticos aún no están explicados completamente, por la biodiversidad y complejidad de los organismos vegetales, sus tejidos y sus mecanismos biológicos (Nonogaki et al., 2010; Preedy et al., 2011).

Actualmente se investiga la germinación desde la significancia de las principales hormonas vegetales, como ácido abscísico, etileno, giberelinas, auxinas, citoquininas y brasinoesteroides, con referencia a la proteómica y la biología molecular, lo que dimensiona la complejidad ya mencionada (Miransari & Smith, 2014). En este trabajo de investigación se incursionó en el estudio del proceso de germinación, generando

nuevo conocimiento y nuevas perspectivas de estudio y aplicación en la industria agroalimentaria.

## 2.7 Conclusiones

- Las condiciones de trabajo aplicadas (4 días, ausencia de luz,  $27^{\circ}\text{C}\pm 1$ , 70% HR) permiten la obtención de granos con alta potencialidad y vitalidad; con tamaño de radícula en promedio de  $3,0\pm 0,3$  cm y una humedad final de 66% para los granos de lenteja y 57% para los de garbanzo.
- La germinación permite el mejoramiento nutricional de lentejas evidenciado en el aumento de hierro y riboflavina y en el cambio neto en el contenido de zinc.

HARINA	Micronutriente (mg/100g)		
	Rbf	Fe	Zn
Lenteja	0,040	0,169	0,121
Lenteja germinada	0,239	0,206	0,121

### **3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HARINAS LIBRES DE GLUTEN**

---

#### **3.1 Introducción**

Los alimentos son sistemas complejos en los que las interacciones moleculares entre los diferentes componentes dictan las propiedades estructurales, texturales y organolépticas de estos. Algunas interacciones son deseables favoreciendo la calidad del alimento mientras que otras son indeseables afectándolo negativamente. Por lo tanto, conocer el comportamiento y las propiedades de las materias primas utilizadas en una formulación es de gran importancia, ya que permite visualizar las interacciones entre los macro y microcomponentes y sus efectos en la calidad del producto final (Gaonkar & McPherson, 2006).

Entre las principales materias primas utilizadas en la industria alimentaria se encuentran las harinas, definidas como el producto resultante de la molienda de materiales vegetales secos, sometido a una reducción del tamaño de partícula para obtener un polvo fino con una granularidad característica que permita su aplicación en diversos procesos alimentarios (Kulp & Ponte, 2000). Durante la obtención de la harina se debe llevar un control estricto de las variables involucradas en el proceso ya que estas generan gran impacto en las propiedades nutricionales y funcionales, afectando rendimientos, costos y características de calidad propias del producto.

En el caso de las harinas libres de gluten, determinar su composición nutricional y conocer su funcionalidad tecnológica permite establecer su potencial para ser incorporadas como materias primas innovadoras en el desarrollo de alimentos, constituyendo una alternativa para la formulación de productos para regímenes especiales y alimentos con valor nutricional agregado. Los cereales libres de gluten disponibles para la elaboración de harinas son arroz, maíz, trigo sarraceno, teff, sorgo y mijo. Además se cuenta con una amplia gama de materiales de origen vegetal como granos andinos, hortalizas, leguminosas, musáceas, raíces y tubérculos, los cuales se perciben como ingredientes potenciales en el desarrollo de numerosos productos a nivel mundial (Rosell, 2013).

#### **3.2 Generalidades de los materiales vegetales seleccionados**

Los materiales fueron seleccionados bajo los siguientes parámetros:

- Ausencia de proteínas formadoras de gluten según literatura científica revisada.
- Material promisorio e innovador.
- Reportes científicos de aplicación.
- Composición bromatológica teórica.



**Trigo (*Triticum spp*):** es un cereal perteneciente a la familia de las Gramíneas. Sus granos son cariósides formados por tres partes principales: el salvado, el germen o embrión y el endospermo. El salvado está formado por numerosas capas ricas en vitaminas y minerales y sus células tienen un alto contenido de celulosa y hemicelulosa. El germen es la parte donde se origina una nueva planta; es buena fuente de vitaminas del complejo B y E y es rico en grasas no saturadas, razón por la cual es eliminado de la harina para evitar el enranciamiento. Por último, el endospermo, cuyas células almacenan proteínas de reserva y energía en forma de almidón (Steffolani, 2012).

El trigo constituye la base de la alimentación de la sociedad occidental; donde sus productos derivados proveen aproximadamente una quinta parte del total de calorías de la dieta. Los cereales en general, son una buena fuente de carbohidratos de lenta asimilación y una fuente importante, aunque incompleta, de proteínas; además, aportan fibra, vitaminas y minerales. Sin embargo, el trigo sólo, al igual que el resto de los cereales, no provee todos los aminoácidos esenciales necesarios para un apropiado desarrollo, ya que es deficiente en lisina (León & Rosell, 2007).

Mayoritariamente, los componentes nutricionales del trigo se encuentran en el salvado y el germen de donde se obtiene la harina integral; la harina blanca se obtiene del endospermo y por lo tanto presenta menor valor nutricional. Por esto, es común que en algunos países las harinas blancas sean enriquecidas con vitaminas y minerales para compensar las pérdidas sufridas al eliminar el salvado y el germen. El enriquecimiento suele estar regulado por ley y se basa en la incorporación de hierro y vitaminas del grupo B (León & Rosell, 2007). En este estudio el trigo fue utilizado como control.



**Arroz (*Oryza sativa*):** es una planta anual, perteneciente a la familia de las Gramíneas. El arroz es rico en carbohidratos complejos, es fuente de minerales (hierro, fósforo, potasio y magnesio), vitaminas del complejo B y no contiene colesterol; pero es uno de los cereales más pobres en proteínas, con valores entre 6,3-7,9%. En los países en los que el arroz constituye un alimento básico, la población está expuesta a sufrir problemas de malnutrición, debido a su incompleto perfil en aminoácidos. Por ello, se han desarrollado distintas técnicas de fortificación que permiten añadir vitaminas esenciales y minerales al grano (Arendt & Dal Bello, 2008).

Un aspecto a favor de la inclusión de arroz y sus derivados en la dieta, es que el almidón contenido en estos presenta respuestas metabólicas de glicemia menores que el resto de los cereales, debido a la diferencia entre la relación amilosa/amilopectina (León & Rosell, 2007). Un aspecto en contra, es la presencia

de arsénico. La FDA monitorea continuamente la presencia de agentes perjudiciales en los alimentos y en los últimos años este ha sido tema de estudio, particularmente en el arroz, encontrando que los niveles de arsénico inorgánico actuales son demasiado bajos como para causar daños a la salud inmediata pero que a largo plazo pueden ser tóxicos, generando gran preocupación ya que el arroz es un alimento que se consume durante toda la vida (FDA, 2012, 2013b).

En la elaboración de productos libres de gluten, la harina de arroz es la más utilizada gracias a su bajo contenido de prolaminas, su carácter hipoalergénico, sabor suave, bajo contenido en sodio y alto contenido de carbohidratos de fácil digestión. Sin embargo, es incapaz de desarrollar una red con propiedades similares al gluten, debido a que sus proteínas de reserva son extremadamente insolubles, son muy hidrofóbicas y su relación es diferente a la del trigo. En el arroz, las principales proteínas de almacenamiento son las glutelinas (65-85%), mientras que las prolaminas son la fracción de menor importancia (Marco & Rosell, 2008). En este estudio el arroz fue utilizado como control.



**Plátano (*Musa paradisiaca*):** es un tipo de banana perteneciente a la familia Musaceae. Es considerado uno de los cultivos alimentarios más importantes en muchos países en desarrollo, en donde constituyen una importante fuente de carbohidratos y fibra dietaria para su población. El plátano verde presenta mayor contenido de hemicelulosa (aproximadamente 6%) que otras frutas y vegetales, es rico en potasio (400 mg/100 g pulpa) y es buena fuente de vitaminas A, C y las pertenecientes al complejo B (Preedy et al., 2011).

El almidón es el principal carbohidrato de los plátanos verdes. Este, se gelatiniza durante la cocción y preparación de los alimentos y se ha demostrado que tras su ingestión, una fracción escapa de la digestión y absorción en el intestino delgado de las personas sanas y continúa al intestino grueso en donde se fermenta con la producción de ácidos grasos de cadena corta. Esta fracción se denomina almidón resistente (AR) y su consumo ha sido asociado a la reducción del índice glicémico, la baja absorción del colesterol y la prevención del cáncer de colon. Se considera que el plátano tanto verde como maduro tiene el más alto contenido de AR de todos los productos naturales (Preedy et al., 2011).

Gracias a los altos valores de energía, a la baja cantidad de lípidos, a que son buena fuente de micronutrientes y a la ausencia de proteínas formadoras de gluten, el plátano se está convirtiendo en una muy buena alternativa para elaborar alimentos para regímenes especiales, más comúnmente en las dietas de personas que presentan úlceras pépticas, enfermedad celiaca y obesidad (Preedy et al., 2011).



**Ahuyama (*Cucúrbita máxima*):** es una planta anual originaria de América, perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas. Su principal componente nutricional son los carotenos que varían entre 2 y 10 mg /100 g de pulpa. También se considera una valiosa fuente de vitamina C, E, tiamina y riboflavina, así como de minerales, entre los que se encuentran potasio, fósforo, magnesio, hierro y selenio. Es rica en pectina, que actúa como fibra soluble en el intestino (Adams et al., 2011), presenta alto contenido de agua, un contenido relativamente bajo de calorías y sólidos totales menores al 10%, lo que permite su inclusión en dietas bajas en calorías (Henriques, 2011; Rakcejeva et al., 2011).

Esta composición química, le permite a la ahuyama tener un importante efecto protector en la salud. De hecho, las sustancias lipófilas como los carotenoides que contiene, contribuyen significativamente a la absorción de la provitamina A, especialmente, la luteína, un carotenoide con funciones fisiológicas especiales. Su color, que varía desde amarillo pálido hasta anaranjado surge de este grupo de sustancias (Guiné, 2011).

La ahuyama es un material muy interesante por su versatilidad, ya que puede ser utilizada para el desarrollo de productos alimenticios salados o dulces como jugos, conservas, encurtidos y productos secos. Incluso en estudios recientes se ha investigado acerca de la aplicación de ahuyama en polvo para mejorar el volumen y la aceptabilidad organoléptica del pan de trigo. Además, la fibra contenida muestra un buen desempeño respecto a las propiedades de hidratación y la retención de glucosa, estableciendo la posibilidad de su utilización como ingrediente en la formulación de alimentos, para aplicaciones nutricionales y tecnológicas (de Escalada Pla et al., 2007).



**Quinoa (*Chenopodium quinoa W*):** es una planta perteneciente a la subfamilia Chenopodioideae de las amarantáceas, originaria de los Andes Sudamericanos. Desde el punto de vista botánico, la quinoa es una planta dicotiledónea y por lo tanto no es considerada como cereal; pero gracias a que sus semillas son ricas en almidón es común que se emplee como tal (Arendt & Dal Bello, 2008). La quinoa es buena fuente de proteína (13-14%), en donde predominan las globulinas y albúminas; y debido a que su perfil de aminoácidos es bien balanceado, con alto contenido de lisina en comparación con los cereales, esta puede remplazar la proteína animal en la dieta (Preedy et al., 2011).

El contenido de minerales en las semillas de quinoa es dos veces mayor que el de los cereales principalmente en calcio, magnesio, hierro, potasio, y zinc. Respecto a

las vitaminas, el contenido es similar a los cereales convencionales, siendo buena fuente de riboflavina, tiamina, ácido fólico, vitamina C y E. Además, es rica en ácidos grasos poliinsaturados y compuestos bioactivos como los flavonoides (Arendt & Dal Bello, 2008). Cada día se amplía más el horizonte de la utilización de la quinua para la elaboración de alimentos de alta calidad. Las semillas de quinua se consumen tradicionalmente cocidas como el arroz o en hojuela y su harina se usa como espesante, papilla o para hacer pastas y productos libres de gluten.



**Leguminosas:** son plantas pertenecientes a la familia de las Leguminosae. Son consideradas la segunda fuente de alimento más importante del mundo después de los cereales, aunque son más ricas en proteínas que estos y generalmente con un mejor perfil de aminoácidos por su contenido de lisina (Preedy et al., 2011). Investigaciones han demostrado que el consumo frecuente de leguminosas puede prevenir enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y contribuir a la salud y bienestar general (Canadá Pulse, 2013; Tiwari, 2011).

Los términos leguminosa y legumbre se usan indistintamente porque todas las legumbres son consideradas leguminosas pero no todas las leguminosas son consideradas legumbres. El término "leguminosa" hacer referencia a las plantas cuyo fruto está encerrado en una vaina; mientras que "legumbre" se refiere sólo a la semilla seca de las leguminosas que se distinguen por su bajo contenido de grasa. A esta última pertenecen la lenteja (*Lens culinaris*) y el garbanzo (*Cicer arietinum*) (Canadá Pulse, 2013).

Las legumbres contienen carbohidratos complejos (fibra dietaría, almidón resistente y oligosacáridos), son buena fuente de proteínas, vitaminas del complejo B y minerales (hierro, zinc y fósforo). Adicionalmente, contienen sustancias bioactivas que incluyen enzimas inhibidoras, lectinas, fitatos y compuestos fenólicos que cumplen un papel metabólico en el ser humano. Sin embargo, algunas de estas sustancias han sido consideradas como factores antinutricionales debido a su efecto sobre la calidad de la dieta (Tiwari, 2011).

### 3.3 Métodos para la caracterización de harinas

La caracterización de un material hace referencia a la identificación de este mediante la aplicación de métodos específicos que permiten estudiar sus propiedades reológicas, estructurales, funcionales, térmicas, entre otras; estableciendo la naturaleza del material y sus posibles aplicaciones.

**3.3.1 Propiedades funcionales:** se definen como las características fisicoquímicas de los alimentos que afectan favorable o desfavorablemente el comportamiento del producto durante y después del procesamiento, influenciando la calidad general y la percepción sensorial (Tiwari, 2011). Están asociadas principalmente a proteínas, almidones y fibras y dependen de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, hidrofobicidad, forma, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, etc.) (Badui, 1996).

Comprender los factores que son influenciados por las propiedades funcionales permite conocer las interacciones idóneas entre ingredientes, predecir la incorporación correcta de nuevos materiales e identificar las condiciones ideales del proceso (pH, T°, concentración) (Tiwari, 2011). Sin embargo, para su aplicación se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Son métodos empíricos desarrollados bajo una técnica experimental.
- Su aplicación depende del tipo de material a evaluar.
- Los parámetros establecidos están condicionados por la aplicación la final y el objetivo del ensayo.
- Se desarrollan bajo 3 condiciones básicas: hidratación en exceso, aplicación de fuerzas externas/internas (Centrifugación/Gravedad) y granulometría obtenida por molienda (Tamaño de partícula).

Las propiedades funcionales más importantes de las harinas incluyen hidratación, formación de gel, emulsificación, formación de espuma y cambios en la viscosidad.

**3.3.1.1 Capacidad de absorción de agua (CAA):** expresa la máxima cantidad de agua que puede ser atrapada por gramo de material seco, en presencia de un exceso de agua bajo la acción de una fuerza patrón. Está asociada al tipo y al tamaño de partícula del material. La CAA en las harinas aumenta cuando el tamaño de partícula promedio está alrededor de 300  $\mu\text{m}$ ; este fenómeno se atribuye a un aumento del área superficial y al volumen de los poros después de la molienda (Tiwari, 2011). La CAA permite evaluar la idoneidad tecnológica de los macrocomponentes respecto a la hidratación al ser utilizados en un alimento.

**3.3.1.2 Capacidad de hinchamiento (CH):** es la capacidad de un material para aumentar el volumen ocupado cuando este es inmerso en un exceso de agua. Esta propiedad se considera un fenómeno de difusión propiciado por la afinidad de las moléculas del material con las moléculas del líquido adicionado. La CH de la harina depende principalmente del almidón (Belitz et al., 2009; Tiwari, 2011).

Cuando las moléculas de almidón se calientan en exceso de agua, la estructura cristalina se interrumpe y las moléculas de agua se unen mediante puentes de hidrogeno a los grupos hidroxilo expuestos de la amilosa y la amilopectina, provocando el hinchamiento del grano. Por consiguiente, la CH provee evidencia de las interacciones entre las cadenas del almidón; influenciadas por la cantidad de amilosa y amilopectina en el granulo, además permite predecir la capacidad de gelatinización de un material. Una harina con alta CH incrementa la viscosidad en un sistema alimentario (Tiwari, 2011; Vaclavik, 2002).

**3.3.1.3 Concentración mínima de gelificación (CMG):** esta propiedad determina la concentración mínima requerida para que una dispersión de harina forme un gel estable. Una baja CMG (entre 2 y 4%) indica que el material tiene una mejor capacidad para formar gel. La gelificación ocurre cuando las proteínas y los almidones forman una red tridimensional resistente a fluir cuando un esfuerzo es aplicado (Fennema, 1996; Tiwari, 2011).

La presencia de almidón y proteína en los sistemas alimentarios resulta en interacciones moleculares que favorecen la formación de gel por calentamiento y posterior enfriamiento. El calentamiento provoca la ruptura de puentes de hidrogeno ocasionando la perdida de la estructura ordenada. El enfriamiento a temperaturas de refrigeración reduce la movilidad de las moléculas propiciando la formación de enlaces intra e intermoleculares en los polímeros; esto favorece la reorganización de las moléculas y da lugar a la formación del gel (Fennema, 1996; Tiwari, 2011). El proceso de gelificación es afectado no solo por la concentración de los macrocomponentes sino también por el tipo, además el peso molecular es fundamental porque si es muy bajo se solubilizan completamente antes de gelificar (Badui, 1996).

**3.3.1.4 Capacidad Emulsificante (CEm):** una emulsión se define como un sistema heterogéneo compuesto por dos fases liquidas inmiscibles entre sí, donde una de ellas está dispersa en otra en forma de gotas (Kuhn & Cunha, 2012). Este sistema puede ser de tipo w/o (agua en aceite) y o/w (aceite en agua) siendo el primer medio la fase dispersa y el segundo la fase continua. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, por lo que es común incluir un emulsificante y/o estabilizante, que favorezca la formación y estabilidad de la emulsión (Pal, 2011).

Las proteínas actúan como emulsificante en los sistemas o/w, al formar una película alrededor de las gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, evitando cambios estructurales como coalescencia, cremado, floculación o sedimentación (Tiwari, 2011). El mecanismo de emulsificación en este caso consiste en la orientación de los aminoácidos apolares hacia la fase lipídica y la de los polares hacia la fase acuosa.

Por esta razón, para lograr mejores resultados se requiere cierta hidrofobicidad que permita que las moléculas de proteína migren a la interfase o/w de la emulsión y se mantengan allí para darle mayor rigidez y estabilidad al sistema (Badui, 1996; Fennema, 1996).

La CEm se define entonces como la cantidad de aceite que puede ser emulsificado por unidad de proteína. Esta propiedad, por lo tanto se ve afectada por la relación hidrofóbica/hidrofílica de las proteínas y por las limitaciones estructurales que determinan el grado en el que las proteínas pueden formar una película alrededor de las gotas de aceite dispersadas (Tiwari, 2011).

**3.3.1.5 Capacidad Espumante (CEs):** las proteínas también exhiben propiedades espumantes. Las espumas se pueden definir como dispersiones de burbujas de gas (generalmente aire) en una fase continua que puede ser líquida o semisólida. La función de las proteínas es reducir la tensión interfacial orientando sus grupos hidrófilos hacia el exterior de la burbuja en contacto con el agua y los hidrófobos hacia el interior, con el aire, para formar una película superficial alrededor de las burbujas de aire y así evitar la fusión de las burbujas (Badui, 1996; Tiwari, 2011).

La CEs representa el aumento en el volumen de una suspensión de harina, resultante de la incorporación de aire. La estabilidad de la espuma (EEs) es la capacidad del sistema para retener el aire en forma de burbujas durante un tiempo determinado. En esta propiedad influyen muchos factores como el pH, sales, azúcares, lípidos, temperaturas elevadas, viscosidad, etc., que al modificar las proteínas alteran la capacidad espumante (Badui, 1996; Tiwari, 2011).

**3.3.2 Propiedades de empastado (RVA):** permiten analizar el comportamiento de una pasta formada por harina y agua en un ciclo de enfriamiento/calentamiento. Esta propiedad puede ser evaluada utilizando un analizador rápido de viscosidad (RVA), que determina el efecto de la gelatinización del almidón en la viscosidad de la harina durante el proceso de cocción. Aunque se pueden programar distintos ciclos; lo más habitual es calentar la mezcla hasta 95 °C, y mantenerla un tiempo a esta temperatura, para luego enfriar a 50 °C (Gallagher, 2009).

Los gránulos de almidón presentes en la harina comienzan a absorber agua iniciando el ciclo. A una temperatura determinada se da la gelatinización del almidón y por consiguiente un incremento de la viscosidad de la pasta. Sin embargo, los gránulos de almidón también comienzan a romperse, por lo que una vez alcanzado un máximo de viscosidad esta tiende a disminuir. Cuando la pasta vuelve a enfriarse el almidón se reorganiza, y como consecuencia de este fenómeno, llamado retrogradación, la viscosidad vuelve a incrementarse (**Figura 10**) (León & Rosell, 2007). Los

parámetros que se obtienen de esta técnica se describen a continuación (Mínguez, 2013; Newport Scientific, 2001):

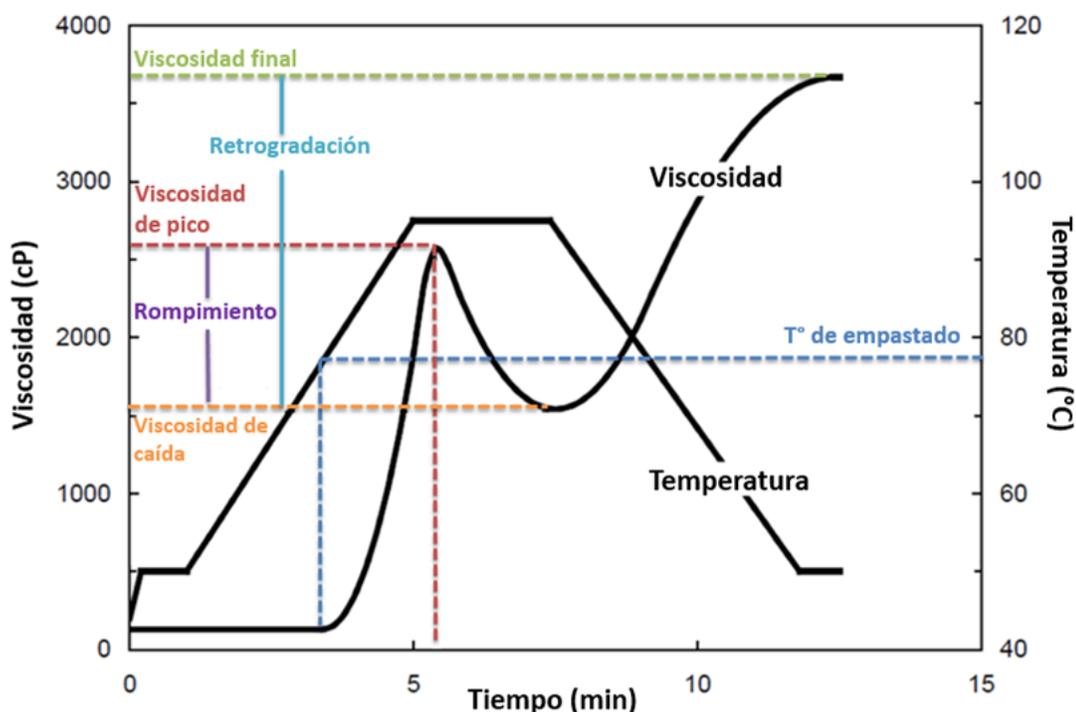


Figura 10. Curva RVA, adaptada de León & Rosell, (2007).

- Temperatura de empastado (Pasting temperature) (°C): indica la temperatura mínima necesaria para la cocción de un almidón.
- Viscosidad de pico (Peak viscosity) (cP): es la viscosidad máxima durante el calentamiento y mantenimiento a 95 ° C. Indica la capacidad de retención de agua del almidón; en este punto se rompe el granulo de almidón.
- Viscosidad de caída (Trough) (cP): es el menor valor de viscosidad antes de iniciar la retrogradación. Se produce al final del tramo de temperatura constante, antes de comenzar el enfriamiento.
- Rompimiento (Breakdown) (cP): es la diferencia entre la viscosidad de pico y la viscosidad de caída que se produce a una temperatura constante. Se debe al rompimiento del granulo de almidón y a la caída de la viscosidad.
- Viscosidad final (Final viscosity) (cP): es la viscosidad máxima durante la retención a 50 °C después del enfriamiento. Cuando la pasta se enfría, el almidón se reorganiza y la consistencia aumenta nuevamente.
- Retrogradación (Setback) (cP): es la diferencia entre la viscosidad final y la de caída.

Conocer el comportamiento del almidón en los ciclos de calentamiento y enfriamiento es fundamental para aquellas aplicaciones basadas en el poder espesante de las harinas. Además, la temperatura de gelatinización afecta la expansión de las masas panarias durante el horneado, mientras que la retrogradación es una de las causas principales del endurecimiento del pan (León & Rosell, 2007).

### **3.4 Trabajo experimental**

#### **3.4.1 Materiales**

Los materiales vegetales utilizados fueron en fresco: ahuyama (*Cucúrbita máxima*) y plátano verde (*Musa acuminata*) variedad hartón, adquiridos en la plaza mayorista de la ciudad de Medellín, Colombia; granos germinados: de garbanzo (*Cicer arietinum*) variedad kabuli y lenteja (*Lens culinaris*) variedad verde seca; y en harina: arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum spp*) y quinua (*Chenopodium quinoa W*) suministradas por empresas locales.

#### **3.4.2. Obtención de harinas**

La ahuyama y el plátano se sometieron a limpieza y desinfección con una solución de amonio cuaternario a 400 ppm, en agua potable, con posterior enjuague y pelado. El plátano pelado se escaldó a 70°C por 5 minutos, con posterior enfriamiento en baño de hielo y agua potable. Ambos vegetales se porcionaron en láminas. El garbanzo y la lenteja fueron germinados siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2, numeral 2.5.2.2 y las harinas fueron obtenidas según el numeral 2.5.2.4.

#### **3.4.3 Métodos**

**3.4.3.1 Distribución de tamaño de partícula:** la distribución de tamaño de partícula de las harinas se realizó en el laboratorio de Coloides de la Universidad de Antioquia, en un Mastersizer 2000, Malvern (Inglaterra) mediante dispersión de luz estática, usando agua como agente dispersante para la preparación de la muestra.

**3.4.3.2 Composición proximal:** se realizó siguiendo métodos oficiales AOAC (1997). Proteína método AOAC 991.20 usando un factor de conversión de Nitrógeno de 6.25, extracto etéreo método AOAC 954.02, cenizas método AOAC 954.46, humedad método AOAC 997.10 y contenido de almidón por hidrólisis ácida – Lane Eynon (UNAM, 2008).

**3.4.3.3 pH:** se determinó preparando una suspensión con 10 g de harina en 100 mL de agua desionizada, acorde al método potenciométrico AOAC 943.02 (1997).

**3.4.3.4 Caracterización funcional:** se realizó según métodos reportados por Capitani et al., (2012); Lajolo & Wenzel, (2002) y Sridaran, (2012) con modificaciones mínimas. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

**Capacidad de absorción de agua (CAA):** en un tubo para centrifuga se pesó 1 g de muestra y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Se agitó y se dejó hidratar durante 30 minutos a temperatura ambiente ( $27\pm 1$  °C), luego se centrifugó a 3000 rpm (centrifuga Hettich universal 320r) durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se pesó el sedimento. Los resultados se obtuvieron mediante la siguiente ecuación (1) y se expresaron como gramos de agua atrapados por gramo de harina.

$$CAA = \frac{\text{Peso sedimento (g)} - \text{Peso muestra(g)}}{\text{Peso muestra (g)}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

**Capacidad de hinchamiento (CH):** se pesaron 2.5 g de muestra en una probeta graduada, se adicionaron 20 mL de agua destilada y se agitó. Se dejó en reposo durante 24 horas y se midió el volumen final de la muestra. Los resultados se obtuvieron mediante la ecuación (2) y se expresaron como el volumen ocupado por la muestra en mL / peso de la muestra original en g.

$$CH = \frac{Vf(ml)}{\text{Peso muestra (g)}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

**Concentración mínima de gelificación (CMG):** se prepararon suspensiones de harina y agua destilada a diferentes concentraciones 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% y 20% (p/v). Se adicionaron 10 mL de cada suspensión en tubos de ensayo y se llevaron a un baño de agua en ebullición durante 1 hora. Las muestras se enfriaron en un baño de agua fría y se dejaron en refrigeración por 2 horas. Se realizó la lectura invirtiendo los tubos para comprobar la formación de gel. Los parámetros utilizados para la clasificación fueron ausencia de gel, gel firme y gel muy firme.

**Capacidad Emulsificante (CEm):** se pesó 1 g de harina en un tubo para centrifuga, se adicionaron 15 mL de agua destilada y se homogenizo con Ultra-Turrax (IKA T18 Basic) durante 2 min a 7000 rpm. Luego se agregaron 15 mL de aceite de girasol y se homogenizo en iguales condiciones. Por último, se centrifugo la muestra a 1700 rpm durante 10 min. La CEm se estimó con la ecuación (3), midiendo el volumen de la emulsión respecto al volumen total del contenido.

$$\%CEm = \frac{\text{Volumen emulsion}(ml)}{\text{Volumen total } (ml)} * 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

**Capacidad Espumante (CEs):** se prepararon suspensiones de harina y agua destilada al 1% (p/v). En una bureta se adicionaron 50 mL de la suspensión y se midió el volumen antes de homogenizar. Luego, la muestra se homogenizó con Ultra-Turrax (IKA T18 Basic) durante 2 min en velocidad 4 (15.500 rpm) y el volumen (después de la homogenización) se midió de nuevo. Para determinar la estabilidad de la espuma las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente (27±1 °C) y se realizaron lecturas cada 15 min después de la homogenización durante 90 min. La CEs y la estabilidad de la espuma (EEs) se calcularon con las ecuaciones (4) y (5):

$$\%CEs = \frac{V1 (ml) - Vo(ml)}{Vo (ml)} * 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

$$\%EEs = \frac{V2 (ml) - Vo(ml)}{Vo (ml)} * 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

Dónde:

**Vo** = Volumen antes de la homogenización

**V1** = Volumen después de la homogenización

**V2** = Volumen después del reposo

**3.4.3.4 Propiedades de empastado (RVA):** las propiedades de empastado fueron obtenidas usando un analizador de viscosidad rápido (RVA) (Newport Scientific, modelo 4-SA, Australia) siguiendo el método aprobado AACC (1995) N° 61-02. El perfil RVA se realizó en 13 min utilizando 3,0 g de muestra (ajustada al 14% de humedad) y 25 mL de agua destilada. La viscosidad fue registrada durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento: calentamiento de 50 a 95 °C en 282 s, mantenimiento a 95 °C durante 150 s y enfriamiento a 50 °C. El software ThermoCline W3, se utilizó para obtener los datos. Cada muestra se analizó por duplicado en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Cereales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.

#### 3.4.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el Software Minitab Statistical versión 16.0 (Minitab Inc. State College PA, EE.UU.). Los análisis de Componentes Principales (PCA) y coeficientes de correlación de Pearson (r) se utilizaron para encontrar las relaciones entre las diferentes harinas. Los datos fueron

analizados mediante ANOVA de una vía (análisis de varianza). La media de separación se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey.

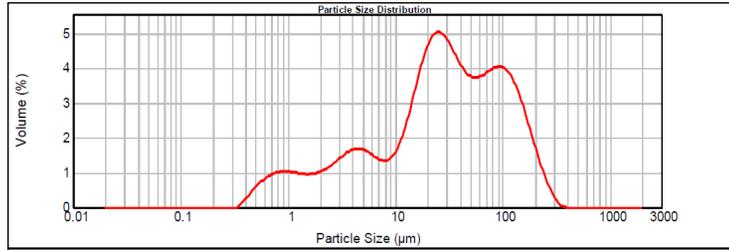
### 3.5 Resultados y Discusión

**3.5.1 Obtención de harinas:** Las harinas obtenidas (**Figura 11**) mostraron características típicas de cada material, conservando su color y olor propio. Al tacto se perciben como un sólido suave, fluido y sin aglomerados, propiedades que mantienen relación con el tamaño de partícula, porcentaje de humedad y forma de conservación. Estas características son importantes al incorporar las harinas en una matriz alimentaria ya que influyen en la funcionalidad tecnológica y en los aspectos sensoriales del producto final.

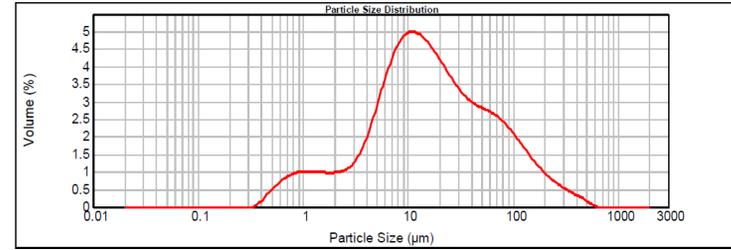


**Figura. 11.** Harinas obtenidas. Figura del autor del trabajo de investigación.

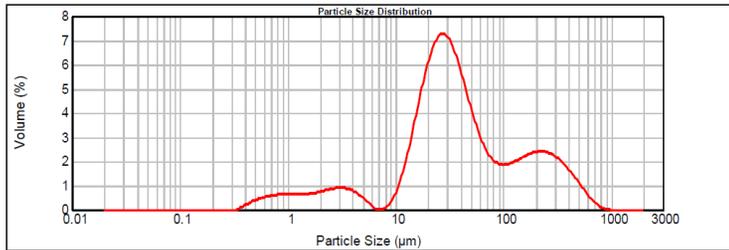
**3.5.2 Distribución de tamaño de partícula:** De acuerdo a los resultados obtenidos (**Figura 12**) la distribución de tamaño de partícula de todas las harinas presenta un perfil polidisperso amplio. Todas las harinas presentan distribución de tamaño del tipo trimodal, en los rangos de 0,2 a 10  $\mu\text{m}$ , de 10 a 100  $\mu\text{m}$  y mayores de 100  $\mu\text{m}$ . Como era de esperar, el 90% de las partículas en todas las harinas, a excepción de la ahuyama, presentaron un tamaño menor a 250  $\mu\text{m}$ , con un predominio de partículas finas menores a 50  $\mu\text{m}$ . La harina de ahuyama mostró partículas de mayor tamaño; alrededor de 306  $\mu\text{m}$ .



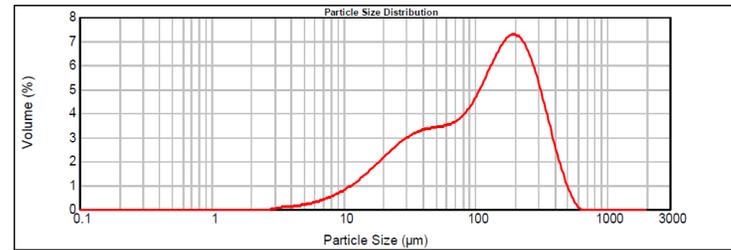
**Trigo**



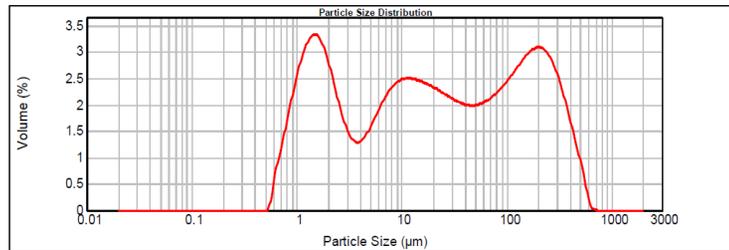
**Arroz**



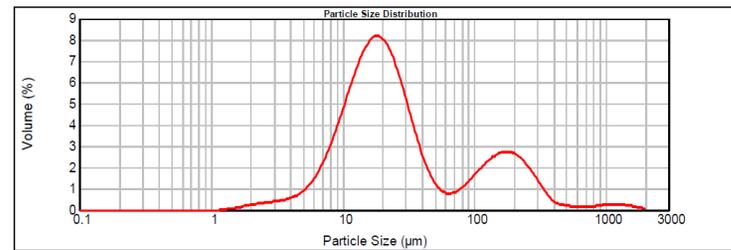
**Plátano**



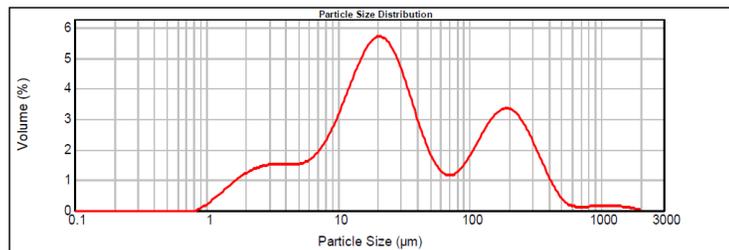
**Ahuyama**



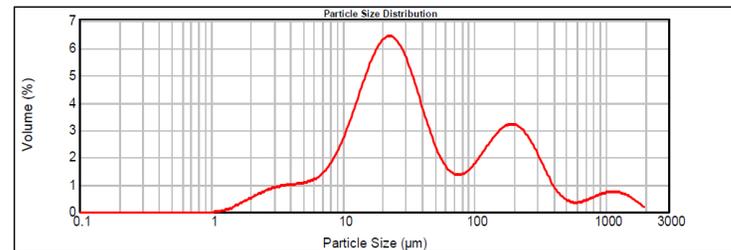
**Quinoa**



**Garbanzo germinado**



**Lenteja**



**Lenteja germinada**

**Figura 12.** Distribución de tamaño de partícula de las harinas.  
Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el grupo de Coloides de la Universidad de Antioquia

Garantizar un tamaño de partícula máximo de 250  $\mu\text{m}$  en harinas permite que se conserven sus propiedades funcionales al ser incorporada como materia prima, ya que durante la elaboración del pan este factor influye en la absorción de agua durante el mezclado, en la velocidad de hinchamiento, en la velocidad con la que los componentes solubles son extraídos de las partículas a la fase líquida que las rodea (Gallagher, 2009), en las propiedades viscoelásticas durante la elaboración de la masa; por ejemplo partículas de gran tamaño pueden perturbar la uniformidad de las burbujas de gas determinando la estructura; además influye en la humedad del producto final (Ángeles et al., 2013; Cappa, 2013).

**3.5.3 Composición proximal:** La composición de las diferentes harinas se presenta en la **Tabla 1 y la Figura 13**. El contenido de humedad en todas las harinas esta entre 1,82 y 12,43%, valores que se encuentran dentro del rango permitido si se toma como referencia la Norma CODEX STAN 152 (1985) para la harina de trigo; en donde el contenido máximo de humedad es de 15,5%. La humedad es un factor importante que debe ser controlado, porque este tiene un impacto significativo en la calidad, estabilidad y conservación de las harinas. Un exceso de humedad las hace susceptibles a los hongos y al crecimiento de moho, da lugar a la formación de grumos o aglomerados condicionando su uso final y además afecta negativamente su valor comercial (Greenfield & Southgate, 2003; Sridaran et al., 2012).

**Tabla 1.** Composición proximal de las harinas obtenidas.

HARINA	COMPONENTE (%)				
	Proteína	Extracto etéreo	Cenizas	Almidón	Humedad
Trigo ( <i>Triticum spp</i> )	12,05 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	0,46 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	0,71 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	69,82 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	12,44 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
Ahuyama ( <i>Cucúrbita máxima</i> )	5,75 $\pm$ 0,00 <sup>g</sup>	0,84 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	7,72 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	22,73 $\pm$ 0,81 <sup>e</sup>	8,80 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	6,68 $\pm$ 0,03 <sup>f</sup>	1,38 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	0,89 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	71,44 $\pm$ 2,93 <sup>b</sup>	10,81 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> )	1,29 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>g</sup>	1,73 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	69,56 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup>	3,48 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> )	23,79 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>	2,88 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	64,13 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>	8,05 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
Lenteja Germinada ( <i>Lens culinaris</i> )	26,08 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	2,34 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	63,52 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	5,29 $\pm$ 0,20 <sup>f</sup>
Garbanzo Germinado ( <i>Cicer arietinum</i> )	22,51 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	3,76 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	2,94 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	54,92 $\pm$ 3,07 <sup>d</sup>	1,82 $\pm$ 0,15 <sup>h</sup>
Quinua ( <i>Chenopodium quinoa W</i> )	10,28 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	4,56 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	77,30 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	6,01 $\pm$ 0,12 <sup>e</sup>

Los CHOS constituyen la diferencia con el 100% de materia seca.

Todos los datos representan la media de triplicados  $\pm$  desviación estándar.

Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%.

El contenido de proteína varió significativamente entre las harinas. El valor más alto se obtuvo para la lenteja germinada (26,08%) y el más bajo para el plátano (1,28%). Esta variación se debe a la diversidad taxonómica de los vegetales que se tomaron

como materia prima para la obtención de las harinas, además de otros factores como el grado de madurez y las condiciones de crecimiento (ubicación geográfica, clima, suelo, etc.) (Du et al., 2014).

El grupo de las leguminosas presentó el mayor contenido de proteína, entre 22 y 26%, valores acorde con los obtenidos por Rodríguez et al., (2008), Du et al., (2014) y Tiwari, (2011). Estos resultados sugieren que el consumo de estas semillas puede ser benéfico, especialmente si se consumen en combinación con la quinua o cereales como el arroz para complementar el perfil de aminoácidos (Preedy et al., 2011). Para la ahuyama, el contenido de proteína fue significativamente bajo (5,75%), incluso menor al reportado por See et al., (2007) (9.65%).

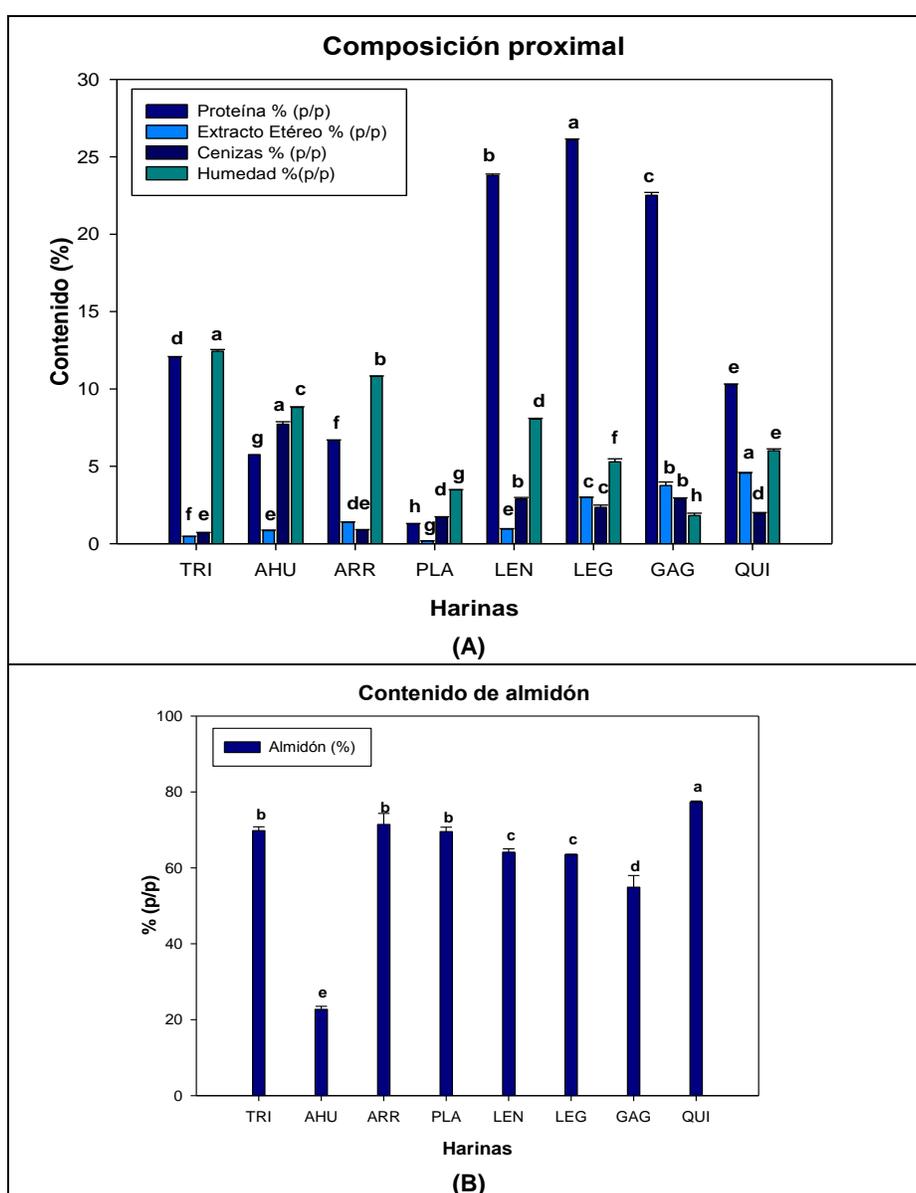


Figura 13. Composición proximal de las harinas obtenidas.

Urbano et al., (2005), Ghavidel & Prakash (2007) y Kaushik et al., (2010), encontraron que la proteína total en diferentes tipos de leguminosas se incrementó después del proceso de germinación. Este aumento puede estar asociado a la síntesis de proteínas enzimáticas durante la imbibición o a un cambio en la composición después de la degradación de otros componentes (Megat et al., 2011).

Respecto al extracto etéreo, la harina de quinua contiene el mayor porcentaje de todos los materiales analizados con un 4,56%, seguida de las leguminosas germinadas (Garbanzo 3,76% y lenteja 3,00%). Para las demás harinas el contenido lipídico fue relativamente más bajo (<2%).

En estudios realizados se encontró que la germinación reduce significativamente el extracto etéreo de las semillas. Por ejemplo, el contenido lipídico en la harina de garbanzo sin germinar reportado por Boye et al., (2010) es 7,34% mientras que en la harina de garbanzo germinado es 3,76%. Esta disminución ocurre porque la grasa es utilizada como la principal fuente de carbono para el crecimiento de la semilla, además los ácidos grasos se oxidan a dióxido de carbono y agua para generar energía durante la germinación (Megat et al., 2011). Sin embargo, en la harina de lenteja germinada no se dio este fenómeno ya que el contenido de extracto etéreo aumento.

En general, el contenido de lípidos en todas las harinas es bajo en comparación con otras fuentes alimentarias, lo que permite su incorporación en la formulación de alimentos bajos en grasa (Sridaran et al., 2012).

El contenido de cenizas fue otro componente que vario significativamente, aunque presentó algunas similitudes entre materiales. La ahuyama tiene el mayor contenido con un 7,72%, valor superior a los reportados por Ahmed et al., (2014) y See et al., (2007) 5,60 y 5,37% respectivamente. Esta diferencia puede atribuirse a las condiciones de crecimiento del cultivo y al método utilizado para la preparación de la muestra.

Las leguminosas tienen un contenido de cenizas entre 2 y 3%, con una diferencia estadísticamente significativa entre la lenteja sin germinar (2,88%) y la lenteja germinada (2,34%). Esta disminución está acorde con los resultados obtenidos por Megat et al., (2011) y Sangronis & Machado (2007); quienes reportan que la disminución en el contenido de cenizas está asociada a una pérdida significativa de algunos minerales por lixiviación durante la inmersión en agua que debe realizarse antes y durante la germinación.

El porcentaje de cenizas en todas las harinas fue relativamente alto, a excepción de los cereales que presentaron un contenido inferior al 1%, esto significa un alto contenido de minerales que pueden ser importantes en la nutrición humana. El análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 18–B**) reveló una correlación negativa entre las cenizas y el contenido de almidón.

El último parámetro evaluado fue el almidón, un componente importante en las harinas ya que las hace buena fuente de energía metabolizable (Kaushal, 2012). Los niveles más altos los presentan las harinas de quinua (77,30%), arroz (71,44%), trigo (69,82%) y plátano (69,55%). Estos porcentajes están cercanos a los reportados por Zuleta et al., (2006) para la de arroz (76%), León & Rosell, (2007) para la de trigo (65-70%) y Bezerra et al., (2013) para la de plátano (70%). En esta última el alto contenido es relevante porque más del 42% está como almidón resistente, lo que permite su utilización como alimento funcional con el fin de prevenir o reducir el colesterol, estreñimiento, e incluso el cáncer de colon (Bezerra et al., 2013; Preedy et al., 2011).

En cuanto a las leguminosas, el porcentaje de almidón presentó disminución, aunque sin diferencia significativa ( $P < 0,05$ ), cuando la semilla fue germinada (harina de lenteja sin germinar 64,13% y harina de lenteja germinada 63,52%). Vidal-Valverde et al., (2002) explican que durante la germinación, los carbohidratos son utilizados como fuente de energía para el crecimiento embrionario, lo que podría explicar los cambios en el contenido de almidón después de la germinación.

Los resultados obtenidos de la composición proximal de todas las harinas sugieren que son materias primas con potencial para ser incorporadas en la elaboración de harinas compuestas o multimezclas con posterior aplicación en diferentes productos alimentarios ya que pueden complementarse unas a otras y así lograr un producto con alto valor nutricional.

**3.5.4 pH:** No se encontraron diferencias significativas en el pH de las harinas analizadas (**Tabla 2**), todas ellas mostraron valores entre 6.3 y 6.6. La importancia de este parámetro en una suspensión de harina se debe a la influencia que tienen los cambios de pH en algunas propiedades fisicoquímicas, principalmente las relacionadas con el contenido de proteína como la capacidad emulsificante, gelificante y la formación de espuma (Benítez et al., 2013).

**3.5.5 Caracterización funcional:** Los resultados obtenidos de la caracterización funcional de las harinas se presentan en las **Tablas 2 y 3**.

**Tabla 2.** Propiedades funcionales de las harinas obtenidas

HARINA	PROPIEDAD				
	pH	CH (mL/g)	CAA (g/g)	CEm (%)	CEs (%)
Trigo ( <i>Triticum spp</i> )	6,3	2,06 ± 0,11 <sup>f</sup>	2,02 ± 0,03 <sup>d</sup>	46,67 ± 0,00 <sup>d</sup>	7,67 ± 0,58 <sup>ef</sup>
Ahuyama ( <i>Cucúrbita máxima</i> )	6,4	18,39 ± 0,52 <sup>a</sup>	7,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	38,89 ± 1,92 <sup>e</sup>	10,67 ± 0,58 <sup>de</sup>
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	6,6	10,58 ± 0,34 <sup>c</sup>	2,77 ± 0,03 <sup>c</sup>	72,06 ± 2,21 <sup>a</sup>	12,35 ± 0,15 <sup>cd</sup>
Plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> )	6,4	10,39 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,69 ± 0,04 <sup>c</sup>	57,78 ± 1,92 <sup>b</sup>	4,67 ± 0,58 <sup>f</sup>
Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> )	6,4	2,22 ± 0,00 <sup>f</sup>	1,69 ± 0,02 <sup>d</sup>	50,57 ± 1,00 <sup>cd</sup>	37,33 ± 2,31 <sup>a</sup>
Lenteja Germinada ( <i>Lens culinaris</i> )	6,5	4,67 ± 0,12 <sup>d</sup>	3,42 ± 0,05 <sup>b</sup>	48,96 ± 1,80 <sup>d</sup>	30,00 ± 2,00 <sup>b</sup>
Garbanzo Germinado ( <i>Cicer arietinum</i> )	6,4	3,87 ± 0,12 <sup>e</sup>	2,69 ± 0,06 <sup>c</sup>	54,44 ± 1,92 <sup>bc</sup>	15,33 ± 1,15 <sup>c</sup>
Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa W</i> )	6,5	11,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,10 <sup>c</sup>	74,79 ± 0,37 <sup>a</sup>	10,26 ± 0,00 <sup>de</sup>

Todos los datos representan la media de triplicados ± desviación estándar.

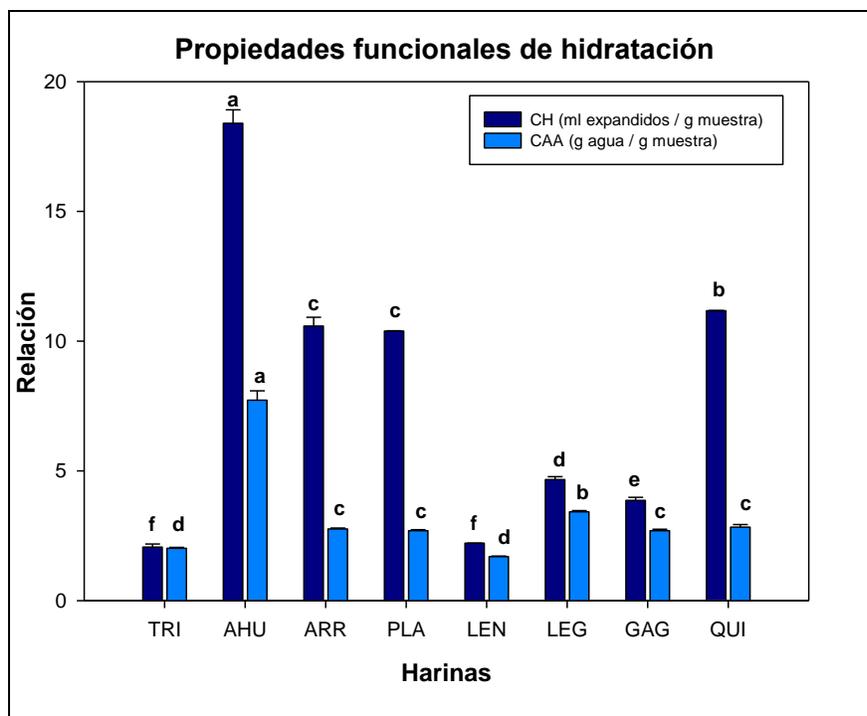
Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes (P>0,05) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%. CH: capacidad de hinchamiento, CAA: capacidad de absorción de agua, CEm: capacidad emulsificante y CEs: capacidad espumante

**Propiedades funcionales de hidratación:** La harina de ahuyama presentó los mayores valores en las pruebas de hidratación respecto a las demás harinas: CH 18,39 mL/g y CAA 7,72 g/g. Las harinas con alta absorción de agua pueden tener más componentes hidrófilos, tales como polisacáridos. Es el caso de la ahuyama; su contenido de fibra le confiere alta afinidad por el agua y buena capacidad para mantenerla unida, permitiendo que esta harina pueda ser utilizada como agente espesante cuando se requieren sistemas viscosos (de Escalada Pla et al., 2007; Kaushal et al., 2012). Los valores más bajos para ambas propiedades los presentaron las harinas de lenteja (CH 2,22 mL/g y CAA 1,69 g/g) y trigo (CH 2,06 mL/g y CAA 2,02 g/g) (**Figura 14**).

Las harinas de quinoa, arroz y plátano mostraron valores significativos para la CH, entre 10 y 12 mL/g y para la CAA cercanos a 3 g/g. Esto puede asociarse al alto contenido de polisacáridos, especialmente al almidón, ya que las propiedades de hidratación están asociadas al aumento de la lixiviación de la amilosa y a la solubilidad y pérdida de la estructura cristalina del almidón (Kaushal et al., 2012). Otro aspecto a considerar es la presencia de proteínas y sus características conformacionales y más aún el contenido de residuos de aminoácidos polares, ya que su afinidad por las moléculas de agua hace que estos interactúen tanto con el agua propia del alimento como con la adicionada durante el procesamiento, afectando la CH y la CAA (Benítez et al., 2013).

Los valores obtenidos en estas harinas resultan útiles cuando estas se incorporan en productos donde se requiere una buena viscosidad, tales como sopas y salsas y en

la formulación de productos panificados libres de gluten, donde es necesaria una buena hidratación para mejorar las propiedades reológicas de las masas y las características sensoriales en el producto final (Akubor et al., 2003).



**Figura 14.** Propiedades funcionales de hidratación de las harinas obtenidas. CH: capacidad de hinchamiento y CAA: capacidad de absorción de agua. Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%.

Respecto al grupo de las leguminosas, en la literatura reportan que los valores mínimos para la CAA están alrededor de 0,6 g/g y los máximos cercanos a 4,9 g/g (Tiwari, 2011), indicando que tanto el tipo como la variedad de leguminosa y los procesos a los que han sido sometidas pueden afectar la capacidad de hidratación de la semilla y sus productos derivados. Los resultados obtenidos para estas harinas están dentro de este parámetro, además concuerdan con los reportados por Aguilera et al., (2009) para la harina de lenteja (CH 2,30 mL/g y CAA 1,80 g/g) y por Benítez et al., (2013) para la de garbanzo germinado (CH 4,0 mL/g y CAA 2,20 g/g).

Al comparar la CH y la CAA de la harina de lenteja germinada y sin germinar se puede afirmar que el proceso de germinación aumenta significativamente las propiedades de hidratación; afirmación soportada con los resultados encontrados por Ghavidel & Prakash (2006), Benítez et al., (2013) y Elkhalifa & Bernhardt (2010). Este incremento puede atribuirse a varios factores; entre los asociados a las proteínas están el cambio en la calidad de esta tras la germinación y la desnaturalización y desplegado que expone enlaces peptídicos previamente ocultos

y cadenas laterales polares, que atrapan más moléculas de agua (Aguilera et al., 2009; Vaclavik, 2002); y entre los asociados al almidón se incluyen las diferencias en la estructura morfológica de los gránulos y la ruptura de las moléculas de los polisacáridos, por lo que los sitios para la interacción con el agua y su absorción aumentarían (Ghavidel & Prakash, 2006).

La CH para las leguminosas es relativamente baja y esto puede estar asociado a su contenido proteico. El alto contenido de proteína en las harinas puede causar que los gránulos de almidón se vean envueltos dentro de una matriz rígida de proteínas, limitando el acceso del almidón al agua y por consiguiente restringiendo el hinchamiento del granulo, mientras que en harinas con bajo contenido de proteínas y alto contenido de carbohidratos, como la harina de arroz y plátano por ejemplo, la CH es mayor (Kaushal et al., 2012).

Se puede concluir entonces que las propiedades de hidratación en las harinas están asociadas tanto al contenido de almidón como de proteína. El PCA (**Figura 18–B**) arrojó una correlación directa entre la capacidad de absorción de agua (CAA) y la capacidad de hinchamiento (CH) y una relación indirecta entre esta última y el contenido de proteína.

**Propiedades funcionales tecnológicas:** La concentración mínima de gelificación (CMG) para todas las harinas estuvo entre 4 y 8%, a excepción de la harina de ahuyama que no formó gel en ninguna de las concentraciones evaluadas (**Tabla 3**); comportamiento que puede estar asociado a su bajo contenido de proteína y almidón (5,75 y 22,73% respectivamente), ya que en los sistemas alimentarios, la red molecular que forma el gel está conformada principalmente por proteínas, polisacáridos o una mezcla de ambos (Sridaran et al., 2012).

**Tabla 3.** Concentración mínima de gelificación de las harinas obtenidas

HARINA	CONCENTRACION DE LA HARINA % (p/v)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Trigo ( <i>Triticum spp</i> )	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+
Ahuyama ( <i>Cucúrbita máxima</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
Plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> )	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+
Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> )	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
Lenteja Germinada ( <i>Lens culinaris</i> )	-	±	±	±	±	+	+	+	+	+
Garbanzo Germinado ( <i>Cicer arietinum</i> )	-	±	±	±	±	+	+	+	+	+
Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa W</i> )	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+

Ausencia de gel (-) Gel firme (±) Gel muy firme (+)

Las harinas de leguminosas germinadas formaron gel en la concentración más baja (4%), al igual que la de trigo, lo que sugiere que de todos los materiales evaluados estas son las que mejores propiedades gelificantes presentan (cuanto menor sea la CMG, mejor es la capacidad del material para formar gel). La harina de lenteja formó gel a una concentración más alta (8%). Estos resultados difieren significativamente en cuanto a las concentraciones mínimas obtenidas por otros investigadores (entre 10 y 16%) (Benítez et al., 2013; Kaushal et al., 2012; Ma et al., 2011). Sin embargo, los resultados presentan la misma tendencia, la CMG disminuye con la germinación (Benítez et al., 2013; Elkhalfa & Bernhardt, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, este proceso genera cambios en las características de las proteínas, carbohidratos y lípidos, influenciando así la formación del gel (Benítez et al., 2013). La gelificación es una agregación de moléculas desnaturalizadas y la germinación puede haber desnaturalizado las proteínas de la lenteja y, por lo tanto, causar más agregación que en la harina de lenteja sin germinar (Elkhalfa & Bernhardt, 2010). Estos resultados sugieren que las harinas germinadas serían útiles en los sistemas alimentarios que requieren espesamiento y gelificación.

En cuanto a las demás harinas; la de quinua formó gel al 8% y la de arroz y plátano al 6%; las dos últimas estuvieron acorde a los resultados reportados por Kaushal et al., (2012) y Akubor et al., (2003), respectivamente. Estas tres harinas, en particular tienen el contenido más alto de almidón, por lo que su capacidad de gelificación podría verse influenciada por una competición física entre la gelificación de las proteínas y la gelatinización del almidón por el agua presente.

Las variaciones observadas en la capacidad de gelificación de todas las muestras analizadas pueden atribuirse a las proporciones de los diferentes componentes tales como proteínas, carbohidratos y lípidos, a las interacciones entre estos y a los tratamientos térmicos aplicados durante la obtención de las harinas ya que estos pueden tener un papel significativo en las propiedades funcionales (Kaushal et al., 2012; Ma et al., 2011).

La capacidad emulsificante (CEm) refleja la habilidad de las proteínas para contribuir en la formación de una emulsión y se relaciona con su capacidad estabilizante gracias a su carácter anfifílico que les permite ser adsorbidas fuertemente sobre la interfase, logrando una reducción significativa de la tensión interfacial del sistema y a su capacidad para formar barreras electrostáticas y estéricas que previenen o retardan la floculación o coalescencia de las gotas (Casanova & Cardona, 2004; Kuhn & Cunha, 2012).

La CEm de todas las muestras oscila entre 38 y 74% (**Figura 15**). Los mayores valores los presentaron las harinas de quinua (74%) y arroz (72%), esta última superior a lo reportado por Kaushal et al., (2012) (61%); el valor más bajo fue para la harina de ahuyama (38%). Las harinas de trigo, plátano y leguminosas estuvieron entre 46 y 57%. Las diferencias encontradas pueden estar asociadas al contenido y a las características moleculares de las proteínas presentes en cada material como tamaño, solubilidad, hidrofobicidad de la superficie y flexibilidad estructural, ya que estas características determinan las propiedades de adsorción de la proteína; además otros factores como el contenido de lípidos y la relación de amilosa y amilopectina en el almidón pueden influir (Du et al., 2014; Ma et al., 2011; Tiwari, 2011).

En la harina de quinua, las fracciones proteicas predominantes son las globulinas y albúminas; estas fracciones presentan un mayor grado de solubilidad y por lo tanto favorece la capacidad emulsificante de esta harina. Es conocido que esta propiedad está influenciada por la calidad y la cantidad de proteínas solubles, ya que estas tienen una superficie más activa, por lo que son utilizadas en la obtención de emulsiones tipo o/w (aceite en agua). La alta CEm de la harina de quinua y arroz sugiere su posible uso en sistemas alimentarios que requieran una emulsión coloidal (Ghavidel & Prakash, 2006).

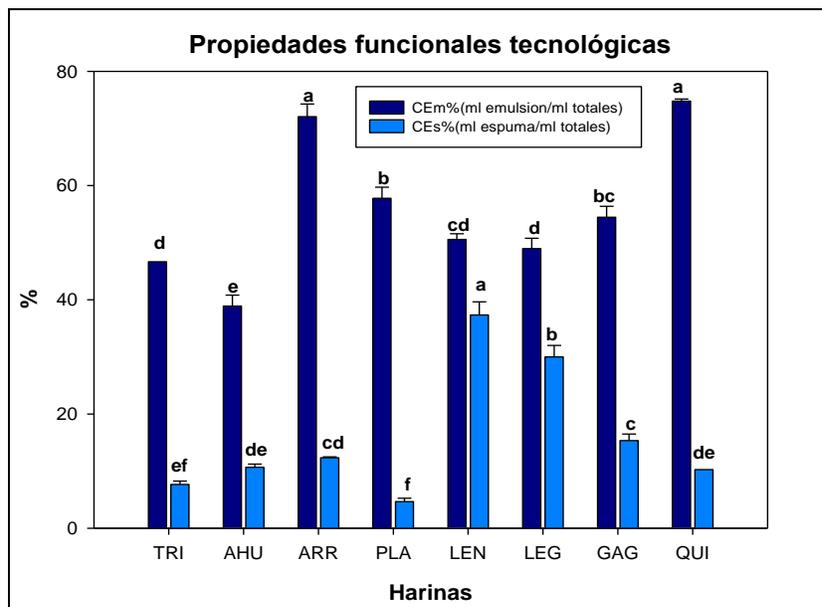
La harina de plátano tuvo una CEm de 57%, un valor relativamente alto si se tiene en cuenta su bajo contenido de proteína (1,29%). Es posible que este material contenga numerosas cadenas laterales no polares que se asocian con las gotas de aceite, mejorando la capacidad de los polipéptidos para desarrollarse en la interfase aceite-agua; propiedad esencial para la formación de la emulsión (Akubor et al., 2003). La harina de trigo por su parte, exhibió una CEm de 46%, similar a la reportada por Ahn et al., (2005) (49%) pero inferior a las obtenidas en las leguminosas. Esto podría estar relacionado con la diferencia en el contenido de proteína y con las concentraciones de las diferentes fracciones presentes en cada material (Badui, 1996).

La mayor proporción de las proteínas que conforman el trigo son insolubles e hidrofóbicas (prolaminas y glutelinas), siendo esto un factor importante cuando se requiere formar la emulsión, pues son estas proteínas las que generan una respuesta negativa respecto a las moléculas de agua, mientras que las leguminosas tienen alto contenido de globulinas (50-72%), principalmente vicilinas, y ha sido reportado que estas tienen mejores propiedades emulsificantes y mayor actividad en la superficie (Kigel & Galili, 1995; Tiwari, 2011).

Los resultados de la CEm para las leguminosas fueron: harina de garbanzo germinado 54%, harina de lenteja 50% y harina de lenteja germinada 48%; estos valores se encuentran dentro del rango reportado por diferentes autores, entre 32 y 92% (Aguilera et al., 2009; Benítez et al., 2013; Du et al., 2014; Ghavidel & Prakash, 2006). La harina de lenteja germinada mostró una reducción de la actividad emulsificante aunque sin diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ), acorde al comportamiento presentado por Benítez et al., (2013). La disminución observada se puede atribuir a la desnaturalización parcial de la proteína durante el proceso de germinación que puede afectar la relación hidrófila/hidrófoba y a las limitaciones estructurales de las proteínas que determinan la facilidad con la que pueden desarrollarse para formar una película alrededor de las gotas de aceite dispersadas (Boye, Zare, & Pletch, 2010).

Sin embargo, Ghavidel & Prakash (2006), reportan un aumento en la CEm de las harinas de leguminosas germinadas, sustentando que la germinación pudo causar la disociación y el despliegue parcial de algunos polipéptidos, exponiendo los sitios hidrófobos de los aminoácidos, lo que favorece la asociación hidrofóbica entre las cadenas de péptidos y las gotas de aceite, aumentando el área superficial de la proteína y por consiguiente mejorando la capacidad de emulsificación.

En general, la CEm de todas las harinas fue buena, lo que sugiere que son buenos agentes emulsificantes y podrían emplearse para promover la emulsificación durante la elaboración de diferentes productos.



**Figura 15.** Propiedades funcionales tecnológicas de las harinas obtenidas. CEm: capacidad emulsificante y CEs: capacidad espumante. Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%.

La formación de espuma y su estabilidad, dependen generalmente de la película interfacial formada por las proteínas que mantiene las burbujas de aire en suspensión y disminuye la coalescencia (Ma et al., 2011); aunque también dependen de otros factores como la interacción entre proteínas y almidón, la disolución de las grasas y las condiciones en las que se forman los complejos de biopolímeros (Tiwari, 2011).

El PCA (**Figura 18–B**) confirmó que existe una correlación positiva entre el contenido de proteína y la capacidad espumante (CEs). Esta propiedad varió significativamente entre las harinas; los mayores valores los presentaron las harinas de leguminosas, aunque con amplia diferencia entre variedades; la lenteja sin germinar mostró una CEs del 37,33%, la germinada del 30% y el garbanzo germinado del 15,33%.

Al igual que en las propiedades emulsificantes, la germinación produjo una disminución en la CEs; resultado que difiere de los obtenidos por Ghavidel & Prakash (2006) y Elkhalfa & Bernhardt (2010), quienes reportan un aumento de esta propiedad para el caupí, frijol mungo, lentejas y sorgo después de la germinación. Esta variación podría ser el resultado de los cambios conformacionales de las proteínas y de las interacciones entre los diferentes macrocomponentes de las harinas que influyen en sus propiedades físico-químicas (Benítez et al., 2013).

Además, la germinación altera el contenido proteico y posiblemente la relación entre sus fracciones, pudo aumentar la tensión superficial entre las moléculas, disminuir la solubilidad y causar la desnaturalización superficial de las proteínas provocando la agregación desordenada de estas, reduciendo así la concentración de las especies adsorbentes más eficaces viéndose afectada la formación de espuma (Elkhalfa & Bernhardt, 2010; Ma et al., 2011).

Las harinas de lenteja germinada y sin germinar, exhiben una excelente estabilidad de la espuma (**Figura 16**), lo que probablemente está relacionado con la alta actividad de la superficie de las proteínas solubles en la fase continua, permitiendo su aplicación en productos de panadería y pastelería. La harina de garbanzo presentó los contenidos más bajos de proteína y los más altos de lípidos, así como la CEs y estabilidad más baja de las leguminosas; estos resultados indican que el contenido de proteína y la formación de complejos proteína-grasa pueden afectar su capacidad de formación de espuma y su estabilidad (Du et al., 2014).

La CEs de la harina de arroz (12,35%) estuvo cercana a lo reportado por Kaushal et al., (2012) (10%), la harina de ahuyama, quinua y trigo mostraron valores entre 7 y 12% y la harina de plátano presentó el valor más bajo (4,67%), similar al obtenido por Fagbemi (1999) (5%). La variación entre todo el grupo de harinas analizadas puede

estar asociada a las diferencias físicas entre las principales proteínas y a su flexibilidad molecular, ya que la espuma en las harinas se origina a partir de las proteínas, gracias a que estas forman una película cohesiva continua alrededor de las burbujas de aire en la espuma (Kaushal et al., 2012).

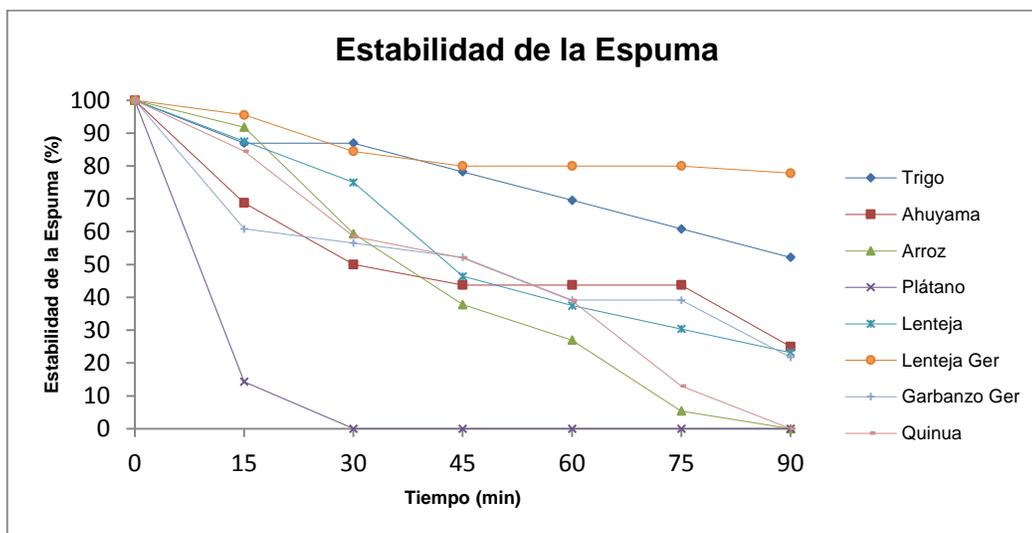


Figura 16. Estabilidad de la espuma de las harinas obtenidas.

Aunque estas harinas presentaron menor CEs que las harinas de leguminosas, su estabilidad es buena, a excepción de la harina de plátano, sugiriendo que las proteínas nativas que son solubles en la fase continua (agua) tienen una superficie activa (Kaushal et al., 2012). También el contenido de almidón puede tener un efecto estabilizante gracias a su naturaleza hidrófila, lo que podría aumentar la viscosidad en la superficie de la suspensión, evitando de este modo el colapso de las burbujas de gas (Tiwari, 2011).

La baja CEs de la harina de plátano, indica que no es un buen agente para la formación de espuma y puede no ser útil en los alimentos aireados. Es posible que el escaldado al que fue sometido el plátano antes de la obtención de la harina afectara negativamente esta propiedad, iniciando la desnaturalización de la proteína y propiciando la disminución de la solubilidad por efectos de la temperatura (Fagbemi, 1999).

Un factor importante que afecta la formación de espuma es el tratamiento térmico que se aplicó durante la obtención de las harinas, ya que durante este, pueden darse cambios conformacionales inducidos por interacciones tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrófobas, que son factores muy importantes para la estabilización de la espuma o puede ocurrir una desnaturalización parcial de las proteínas aumentando la viscosidad, lo que a su vez

podría impartir rigidez a la película interfacial, afectando la estabilidad de la espuma (Ma et al., 2011).

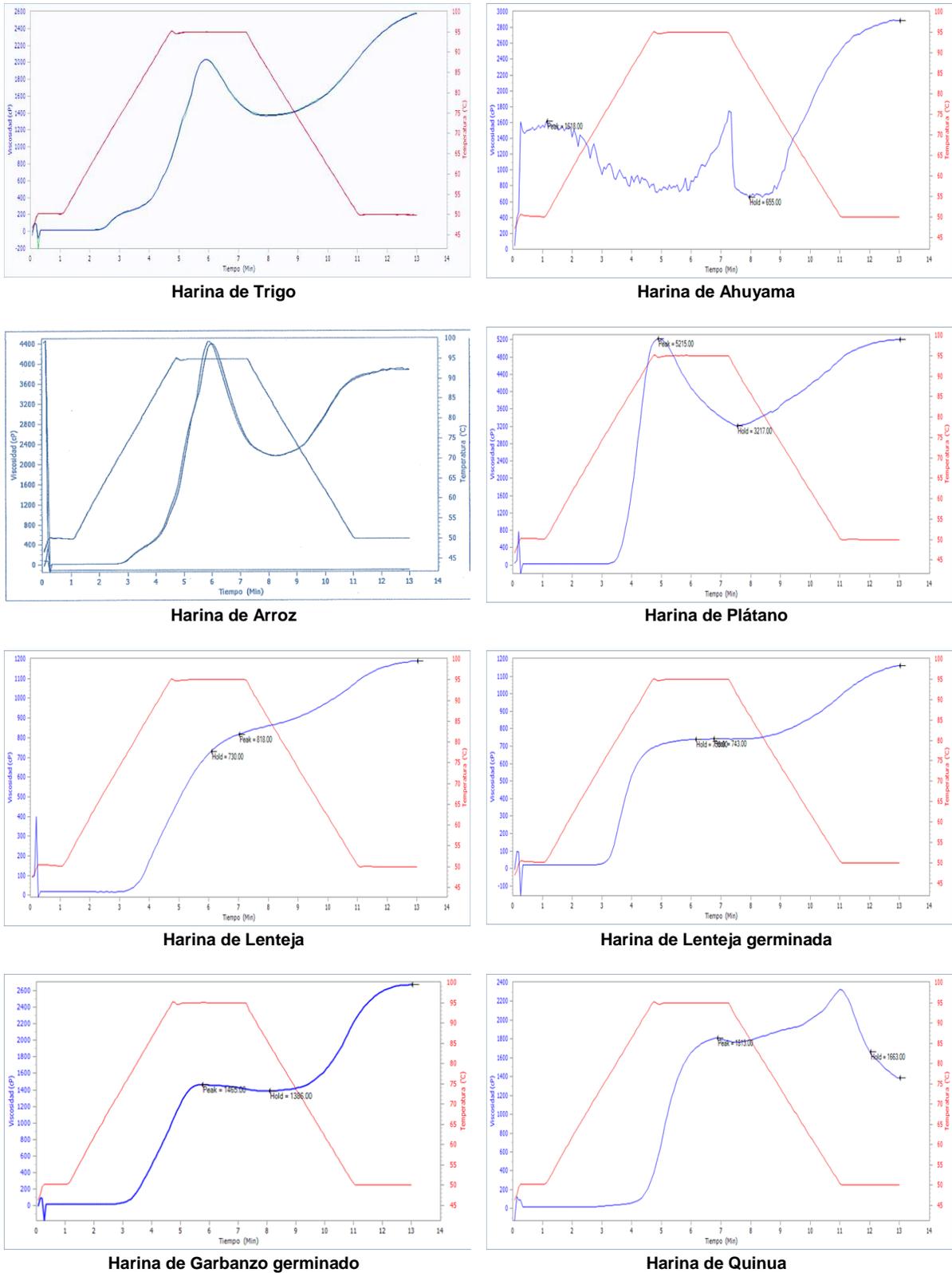
Sin embargo, debido a las diferencias en los tipos de proteínas y las moléculas de almidón en los diferentes tipos y variedades de materiales vegetales empleados, se puede esperar que las propiedades viscoelásticas de las harinas después del tratamiento térmico difieran, explicando así la variación observada en las propiedades espumantes. Esta variación podría ser aprovechada en los diferentes sistemas alimentarios si se tiene en cuenta que las espumas son utilizadas para mejorar la textura, la consistencia y la apariencia de los alimentos, especialmente merengues, tortas, nata batida, postres y pan (Ghavidel & Prakash, 2006; Ma et al., 2011).

**3.5.6 Propiedades de empastado (RVA):** Las propiedades de empastado están relacionadas con los cambios en la viscosidad aparente del almidón o la harina durante su cocción en exceso de agua. Estas, dependen de las técnicas de procesamiento empleadas para la obtención de las harinas o los almidones, del contenido de amilosa en la harina junto con la cantidad de componentes no amiláceos como proteínas y lípidos y de la rigidez de los gránulos de almidón, que a su vez afecta la capacidad de hinchamiento del granulo y la cantidad de amilosa lixiviada en la solución (Devi & Haripriya, 2012; Kaushal et al., 2012). Los resultados obtenidos para todas las harinas se resumen en la **Tabla 4** y las gráficas representativas de cada material se presentan en la **Figura 17**.

**Tabla 4.** Propiedades de empastado (RVA) de las harinas obtenidas

HARINAS	PARAMETRO					
	Temperatura de empastado (°C)	Viscosidad de pico (cP)	Viscosidad de caída (cP)	Rompimiento (cP)	Viscosidad final (cP)	Retrogradación (cP)
<b>Trigo</b> ( <i>Triticum spp</i> )	68,5±0,04 <sup>g</sup>	2037,0±0,00 <sup>c</sup>	1374,0±7,07 <sup>d</sup>	663,0±7,07 <sup>d</sup>	2581,0±5,66 <sup>e</sup>	1207,0±1,41 <sup>e</sup>
<b>Ahuyama</b> ( <i>Cucúrbita máxima</i> )	50,1±0,04 <sup>h</sup>	1619,0±1,41 <sup>e</sup>	656,5±2,12 <sup>f</sup>	962,5±0,71 <sup>c</sup>	2890,0±1,41 <sup>c</sup>	2233,5±0,71 <sup>a</sup>
<b>Arroz</b> ( <i>Oryza sativa</i> )	72,6±0,07 <sup>f</sup>	4413,5±6,36 <sup>b</sup>	2153,5±2,12 <sup>b</sup>	2260,0±8,49 <sup>a</sup>	3872,5±7,78 <sup>b</sup>	1719,0±5,66 <sup>c</sup>
<b>Plátano</b> ( <i>Musa paradisiaca</i> )	78,3±0,04 <sup>c</sup>	5214,5±0,71 <sup>a</sup>	3216,0±1,41 <sup>a</sup>	1998,5±0,71 <sup>b</sup>	5204,5±0,71 <sup>a</sup>	1988,5±2,12 <sup>b</sup>
<b>Lenteja</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	83,2±0,02 <sup>b</sup>	819,0±1,41 <sup>g</sup>	731,0±1,41 <sup>e</sup>	88,0±0,00 <sup>f</sup>	1191,0±1,41 <sup>g</sup>	460,0±0,00 <sup>f</sup>
<b>Lenteja G*</b> ( <i>Lens culinaris</i> )	76,7±0,01 <sup>e</sup>	744,0±1,41 <sup>h</sup>	740,0±1,41 <sup>e</sup>	4,0±0,00 <sup>g</sup>	1162,0±1,41 <sup>h</sup>	422,0±0,00 <sup>g</sup>
<b>Garbanzo G*</b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	77,5±0,04 <sup>d</sup>	1464,0±1,41 <sup>f</sup>	1384,5±2,12 <sup>d</sup>	79,5±0,71 <sup>f</sup>	2670,0±1,41 <sup>d</sup>	1285,5±0,71 <sup>d</sup>
<b>Quinoa</b> ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	89,7±0,01 <sup>a</sup>	1814,5±2,12 <sup>d</sup>	1663,5±0,71 <sup>c</sup>	151,0±1,41 <sup>e</sup>	1388,5±0,71 <sup>f</sup>	-275,0±0,00 <sup>h</sup>

G\*: germinados. Todos los datos representan la media de duplicados ± desviación estándar. Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes (P>0,05) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%.



**Figura 17.** Propiedades de empastado (RVA) de las harinas.  
 Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Cereales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.

La temperatura en la cual la viscosidad aparente comienza a desarrollarse se denomina temperatura de empastado. En la mayoría de los productos que contienen almidón, la gelatinización ocurre entre 60 y 65°C (Siddiq et al., 2013); en las muestras analizadas la temperatura de empastado fue mayor, entre 68 y 89°C a excepción de la harina de ahuyama que mostró una temperatura de 50°C. Las temperaturas obtenidas para las harinas de arroz y trigo fueron similares a las reportadas por Cappa et al., (2013) (74,1 °C) y Devi & Haripriya, (2012) (66,6 °C) respectivamente.

La baja temperatura en la harina de ahuyama podría estar asociada al proceso de molienda. Durante su elaboración fue necesario someter la ahuyama a un mayor tiempo de molienda para obtener harina con un tamaño de partícula más pequeño, lo que podría haber debilitado o alterado las estructuras de las proteínas y los almidones, afectando las propiedades de empastado de la harina (Hasjim, 2013). Li et al., (2013), reportaron que la temperatura de empastado se reduce con el aumento del tiempo de molienda. Sin embargo, no se conoce bien si la reducción en la temperatura es debido a los daños o fragmentación de los gránulos de almidón, a la degradación de sus moléculas y/o a la interrupción de la estructura cristalina.

Además, el tipo de curva que presentó la harina de ahuyama, con altibajos consecutivos, está asociado a las barreras del material al flujo de calor, que está relacionado a componentes mayoritarios, como las cenizas, que se caracterizan por ser partículas fibrosas amorfas minerales, en sinergismo con el bajo contenido de almidón, cercano a 20%, asociado además con la polidispersión en el tamaño de partícula, como se presentó en los resultados anteriores.

En cuanto a la temperatura de empastado para las harinas de leguminosas, diferentes estudios han reportado que esta varía desde 73 hasta 85 °C (Acevedo et al., 2013; Du et al., 2014; Kaur et al., 2010); los resultados obtenidos se encuentran en ese rango: la lenteja sin germinar alcanzó la mayor temperatura entre las leguminosas (83,2°C), seguida por el garbanzo germinado (77,5°C) y la lenteja germinada (76,7°C).

Altas temperaturas de empastado sugieren gran resistencia térmica por parte del almidón al hinchamiento y ruptura. Esta condición podría afectar la iniciación de la gelatinización; como consecuencia el gránulo de almidón comienza a hincharse a temperaturas elevadas, ocurriendo el rompimiento a temperaturas aún mayores, por lo que la gelatinización completa podría darse a temperaturas tan altas como 95° C (Acevedo et al., 2013; Siddiq et al., 2013). Otro factor que puede afectar esta propiedad, principalmente en las leguminosas, es que su alto contenido de proteína podría inducir a una mayor interacción entre estas y el almidón, retardando el

hinchamiento de los gránulos lo que conlleva a un aumento de la temperatura de empastado (Ahmed et al., 2013).

La viscosidad de pico representa el valor máximo de la viscosidad cuando se alcanza el punto de equilibrio entre el hinchamiento y la ruptura de los gránulos de almidón. Cuando un número suficiente de gránulos se hinchan, ocurre un rápido aumento de la viscosidad; este cambio durante el periodo de cocción da indicios de la estabilidad del material evaluado (Kaur et al., 2010). La viscosidad de pico o el hinchamiento de los gránulos de almidón son propiedad de la amilopectina, mientras que el complejo que se forma entre los lípidos y la amilosa puede inhibir el hinchamiento del gránulo y reducir esta propiedad (Li et al., 2013; Tiwari, 2011; Wu et al., 2013).

Las harinas de plátano, arroz y trigo presentaron alta estabilidad y los mayores valores de viscosidad (5214.5, 4413.5 y 2037.0 cP respectivamente). Este comportamiento puede estar asociado a su alto contenido de almidón, dando un indicio de la capacidad de estas harinas para formar geles fuertes, condición que sería útil en productos que requieran consistencia, donde pueden ser utilizados como agentes espesantes o gelificantes (Kaushal et al., 2012). La harina de quinua, ahuyama y garbanzo germinado estuvieron entre 1464.0 y 1814.5 cP y la viscosidad de pico más baja se obtuvo para las harinas de lenteja germinada (744.0 cP) y sin germinar (819.0 cP).

Todas las harinas mostraron un aumento gradual de la viscosidad con el aumento de la temperatura, exceptuando la harina de ahuyama (**Figura 17**). El aumento de la viscosidad con el aumento de la temperatura puede atribuirse a la unión del agua con la amilosa exudada de los gránulos durante el hinchamiento y a la absorción adicional de agua por los gránulos debido al incremento de la porosidad (Ahmed et al., 2013).

El comportamiento de la harina de ahuyama podría estar influenciado principalmente por su bajo contenido de almidón, además por su alto contenido de fibra es posible que bajo las condiciones experimentales adoptadas durante la prueba no se formara gel (Cappa et al., 2013) o que estos polisacáridos no amiláceos interactuaran con el almidón formando complejos de macropolímeros afectando las propiedades de empastado en esta harina (Hasjim et al., 2013).

La viscosidad de caída es influenciada por la tasa de exudación de la amilosa, el hinchamiento del granulo y la formación de complejos entre la amilosa y los lípidos (Kaushal et al., 2012). La viscosidad de caída de las diferentes harinas presentó una variación significativa, entre 656,5 y 3216,0 cP. Esta propiedad se relacionó directamente con la viscosidad de pico, según el PCA (**Figura 18–D**).

El rompimiento permite conocer el grado de desintegración de los gránulos de almidón hinchados. Los valores más bajos los presentaron las harinas de lenteja germinada (4,0 cP), garbanzo germinado (79,5 cP) y lenteja (88,0 cP); en la literatura se encontraron valores entre 32 y 123 cP para estas harinas (Tiwari, 2011), lo que indica que tienen mayor estabilidad térmica, fuerte resistencia al cizallamiento y una retrogradación del almidón reducida después del enfriamiento (Acevedo et al., 2013).

Los bajos valores en este parámetro pueden ser atribuidos a una menor desintegración de los gránulos de almidón hinchados en presencia de un alto contenido de amilosa, ya que está en conjunto con los lípidos ayudan a mantener la integridad de los gránulos durante el calentamiento (Tiwari, 2011). Altos valores de rompimiento están asociados con altas viscosidades de pico, que a su vez, está relacionado con el grado de hinchamiento de los gránulos de almidón durante el calentamiento (Devi & Haripriya, 2012), es el caso de las harinas de plátano, arroz y trigo. El PCA (**Figura 18–D**) confirmó que existe una correlación positiva entre rompimiento, viscosidad de pico y viscosidad de caída.

La viscosidad final, que indica la capacidad del material para formar una pasta viscosa, se debe a la retrogradación de las moléculas de amilosa que se produce durante el enfriamiento, formando una red que aumenta la viscosidad de la harina y/o pasta de almidón. Normalmente, esta viscosidad aumenta tras el enfriamiento debido a la agregación de las moléculas de almidón (Li et al., 2013).

La mayor viscosidad final la presentó la harina de plátano (5204,5 cP), seguida por la harina de arroz (3872,5 cP), ahuyama (2890,0 cP), garbanzo germinado (2670,0 cP), trigo (2581,0 cP), quinua (1388,5 cP), lenteja (1191,0 cP) y lenteja germinada (1162,0 cP). La viscosidad final es un indicador fundamental de la fuerza del gel formado tras el enfriamiento y por lo tanto representa un parámetro de calidad importante (Hasjim et al., 2013). El análisis estadístico (**Figura 18–D**) arrojó una correlación directa entre la viscosidad final, la viscosidad de pico, la viscosidad de caída y el rompimiento.

La retrogradación refleja la tendencia a la retrogradación del almidón, que inhibe el aumento de la viscosidad tras el enfriamiento. Este fenómeno se define como la insolubilización y la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente e interactúan entre sí por puentes de hidrogeno a través de sus múltiples hidroxilos (Ahmed et al., 2013; Badui, 1996). Altos valores de retrogradación se asocian con la sinéresis del gel generando defectos de calidad en los productos mientras que valores bajos indican una reducción en la retrogradación del almidón después del enfriamiento, condición deseada en los alimentos (Devi & Haripriya, 2012).

Se observó que las harinas de ahuyama, plátano, arroz, garbanzo germinado y trigo presentaron alta tendencia a la retrogradación, pues sus valores estuvieron entre 1207,0 y 2233,5 cP, mientras que la quinua, la lenteja germinada y sin germinar presentaron menor tendencia. Las tendencias inferiores a retrogradar son deseables en productos alimenticios tales como sopas y salsas, que se ven afectados por la pérdida de viscosidad y la precipitación y en productos horneados ya que la retrogradación está directamente relacionada con el envejecimiento del pan (Kaushal et al., 2012).

Los bajos valores de retrogradación y rompimiento presentados por las harinas de quinua, lenteja germinada y sin germinar sugieren que tienen una alta resistencia a la retrogradación y por lo tanto formarían pastas estables. El PCA (**Figura 18–D**) arrojó una correlación directa entre retrogradación, viscosidad de pico, rompimiento y viscosidad final y una correlación indirecta con la temperatura de empastado.

Respecto a los germinados se puede decir que la temperatura de empastado, la viscosidad de pico, el rompimiento, la viscosidad final y la retrogradación disminuyeron significativamente durante el proceso de germinación mientras que la viscosidad de caída aumento aunque sin diferencia estadística significativa. En la literatura se encontraron resultados similares reportados por Wu et al., (2013) y Chung (2012) para la harina de arroz integral y por Juhász et al., (2005) para las semillas de trigo.

Como se sugirió anteriormente, las propiedades de empastado de la harina podrían verse afectadas por el contenido de almidón, la actividad de la amilasa, la relación amilosa/amilopectina y el contenido de proteína y lípidos (Devi & Haripriya, 2012; Kaushal et al., 2012). Dado que el almidón es el componente principal de la harina de lenteja, la disminución en el contenido de almidón durante la germinación contribuiría a la reducción de las propiedades de empastado (Wu et al., 2013).

Durante el proceso germinativo se activan las enzimas presentes en la semilla tales como  $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, carboxipeptidasas, proteínasas, entre otras; que se encargan de hidrolizar las sustancias de reserva, por ejemplo el almidón para proveer glucosa, las proteínas para formar pequeños péptidos y aminoácidos y los lípidos para dar ácidos grasos y glicerol y generar aminoácidos, dando lugar a las rutas metabólicas de la semilla que posteriormente permitirán el crecimiento de las mismas (Chung et al., 2012; Gil Ruiz, 2011a).

Wu et al., (2013) informaron que la germinación genera un aumento en la actividad de la amilasa y reduce el contenido de almidón y que la amilasa presente en las harinas reduce la viscosidad de pico, lo que podría explicar la reducción de la

viscosidad de la harina después de la germinación. Por otra parte, la proteína hidrolizada durante la germinación puede afectar la formación de la red de proteínas y, por consiguiente aumenta la fragilidad de los gránulos de almidón hinchados, lo que resulta en viscosidades bajas, por debajo de 300 cP (Chung et al., 2012).

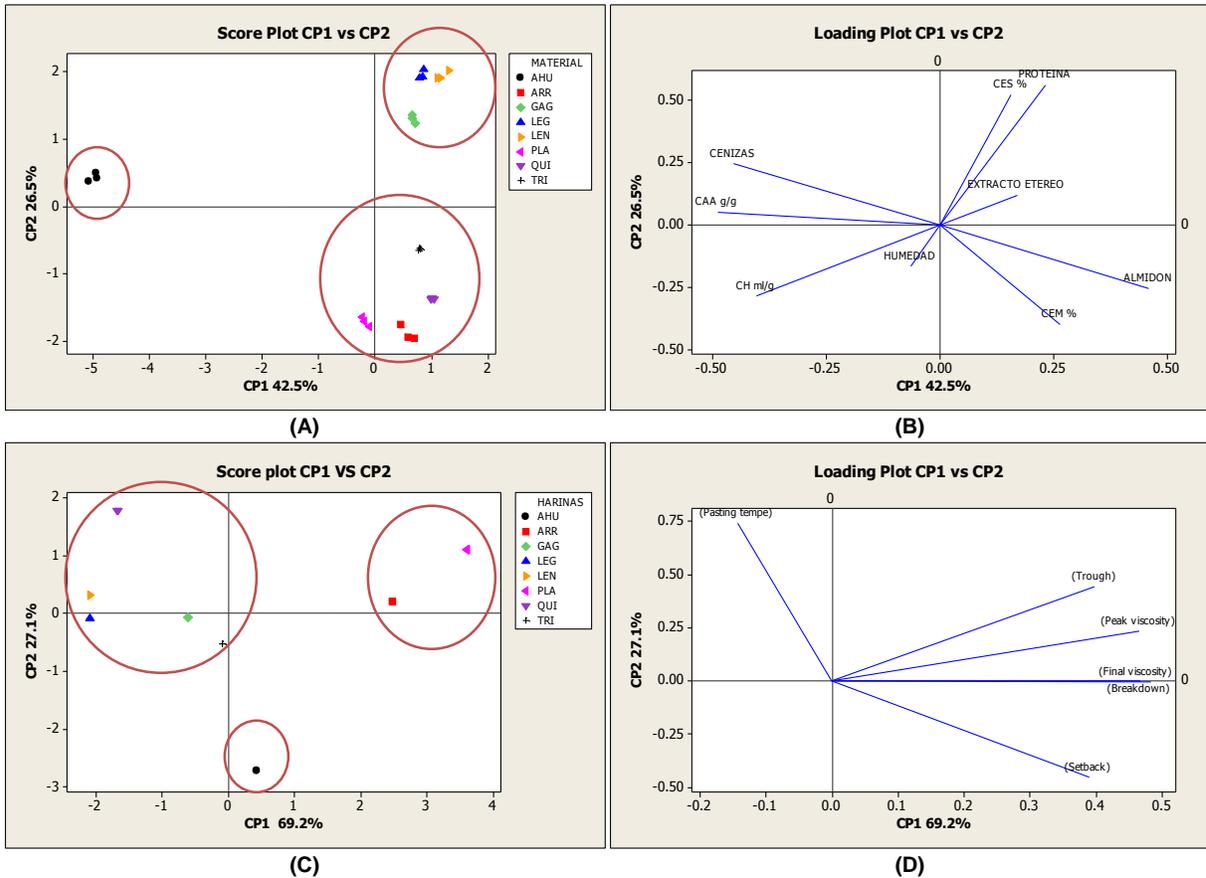
La viscosidad final y la retrogradación, que se atribuyen a la agregación de moléculas de amilosa, disminuyeron significativamente durante la germinación. Xu et al., (2012) informaron que el contenido de amilosa se redujo significativamente de 17,4% a 12,1% debido a la germinación. Por consiguiente, la estructura de amilosa degradada durante la germinación dio lugar a una baja recristalización de moléculas de almidón gelatinizado durante el enfriamiento.

### 3.6 Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para visualizar la variación de todas las propiedades entre las diferentes harinas. Los resultados del análisis se muestran en la **Figura 18**. Con este método estadístico, un gran número de variables se reduce a unas pocas denominadas componentes principales, las cuales describen la mayor varianza en los datos analizados. Los gráficos del PCA proporcionan una visión general de las similitudes y diferencias entre las harinas y de las interrelaciones entre las propiedades medidas.

El análisis permitió categorizar las harinas respecto a su composición proximal y a sus propiedades funcionales en tres grupos claramente definidos (**Figura 18–A**). El primer componente explica el 42,5% de la varianza y el segundo el 26,5%, para un 69% de la varianza total. Los demás componentes (tercero y cuarto), que fueron descartados, explican el 18,1% y 7,3% de la varianza total, respectivamente.

La proyección de las variables en el plano del primer y segundo componente se presenta en la **Figura 18–B**, en donde se observa que la CE<sub>s</sub> y la proteína influyeron en el comportamiento de las leguminosas germinadas y sin germinar formando el primer grupo. Las propiedades de hidratación (CH y CAA) y el contenido de cenizas sobresalieron en la harina de ahuyama; está sola conforma el segundo grupo y el contenido de almidón y la CE<sub>m</sub> permitieron agrupar las harinas de plátano, trigo, quinua y arroz en un solo conjunto. El contenido de humedad y el extracto etéreo no influyeron en la formación de los grupos en el primer componente; esto se explica por el tamaño del vector, ya que este indica la importancia y la influencia de la propiedad analizada.



**Figura 18.** Análisis de componentes principales: las gráficas relacionan los componentes principales 1 y 2 (CP1 y CP2). **(A)** Describe los grupos de harinas formados respecto a la composición proximal y las propiedades funcionales, **(B)** Describe la variación entre las diferentes propiedades de las harinas. CES: capacidad espumante, CEM: capacidad emulsificante, CH: capacidad de hinchamiento, CAA: capacidad de absorción de agua, **(C)** Describe los grupos de harinas formados respecto a las propiedades de empastado y **(D)** describe la variación entre las propiedades de empastado.

En cuanto a las propiedades de empastado (**Figura 18–C, D**), el primer componente explica el 69,2% de la varianza y el segundo el 27,1%, para un total del 96,3%. Se observa la asociación de las harinas en tres grupos, el primero influenciado por la temperatura de empastado y conformado por las harinas de quinua, lenteja germinada y sin germinar, garbanzo germinado y trigo. La viscosidad de pico, la viscosidad de caída, el rompimiento, la viscosidad final y la retrogradación favorecieron la formación del segundo grupo que incluye la harina de arroz y plátano y en el último grupo se encuentra la harina de ahuyama por su alto valor de retrogradación.

Según estos resultados, se puede afirmar que las harinas de plátano, quinua y arroz son las más similares a la harina de trigo respecto a las propiedades funcionales y a la composición proximal, mientras que las harinas de leguminosas germinadas y sin germinar y nuevamente la quinua se asemejan al trigo en sus propiedades de empastado.

### 3.7 Conclusiones

- La composición proximal evidenció que las leguminosas tienen alto contenido protéico (entre 22 y 26%), la ahuyama alto contenido de cenizas (7,72%), el plátano, el arroz, el trigo y la quinua valores importantes de almidón (entre 69 y 77%) y esta última además alto contenido de extracto etéreo (4,56%).
- La caracterización funcional mostró que todas las harinas presentan buena CEm (entre 38 y 74%), las leguminosas germinadas forman gel firme a una concentración mínima del 4% al igual que el trigo, las harinas de lenteja germinada y sin germinar presentaron además alta CEs superior al 30%, mientras que la ahuyama presentó un comportamiento relevante respecto a las propiedades de hidratación (CH 18,39 mL/g y CAA 7,72 g/g).
- Las propiedades de empastado en las harinas de plátano y arroz están influenciadas por sus altos valores de viscosidad y su alta tendencia a la retrogradación. La harina de ahuyama presentó la más baja T° de empastado (50°C) y la mayor retrogradación (2233cP), mientras que las harinas de quinua y leguminosas presentaron baja retrogradación y valores intermedios de viscosidad.
- El análisis de componentes principales permitió categorizar las harinas respecto a su composición proximal y a sus propiedades funcionales así:

PCA	PARÁMETRO	GRUPOS DE HARINAS	INFLUENCIADOS POR
	Composición proximal y Propiedades funcionales	Leguminosas	Capacidad espumante y proteína
		Ahuyama	Capacidad de hinchamiento, absorción de agua y cenizas
		Plátano, trigo, quinua, arroz	Capacidad emulsificante y almidón
	Propiedades de empastado (RVA)	Quinua, leguminosas, trigo	Temperatura de empastado
		Arroz y plátano	Viscosidad de pico, de caída y final, rompimiento y retrogradación
		Ahuyama	Retrogradación

## 4. FORMULACION Y APLICACIÓN DE UNA MATERIA PRIMA LIBRE DE GLUTEN CON VALOR NUTRICIONAL MEJORADO

---

### 4.1 Introducción

La sustitución del gluten en el pan es uno de los mayores retos tecnológicos en el desarrollo de productos a base de cereales y otros vegetales que no lo contienen. Las propiedades únicas del gluten en productos de panadería se deben a su capacidad para formar una película delgada que retiene el gas durante la fermentación y a su capacidad para agregarse en una matriz de proteína y almidón con propiedades viscoelásticas que le permite determinar el aspecto general y la textura de los productos que lo contienen (Zannini et al., 2012).

Diferentes estudios han demostrado que los productos libres de gluten usualmente están caracterizados por su calidad inferior al ser comparados con los panes de trigo (Arendt & Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009; Hui, 2006; Rosell, 2013). Afortunadamente en los últimos años ha habido un aumento significativo en la investigación y desarrollo (I+D) de estos productos; lo que ha permitido incorporar gran variedad de materiales como almidones, derivados lácteos, gomas e hidrocoloides, proteínas no formadoras de gluten y sus combinaciones, como alternativa para la sustitución del gluten, con el fin de mejorar los problemas nutricionales y de calidad y ofrecer un alimento seguro (Gallagher et al., 2004).

Un aspecto muy importante que ayuda a mejorar la calidad de estos productos, es la caracterización reológica de las masas no convencionales, dado que estas se someten a estrés riguroso durante todo el procesamiento y el volumen final del pan y la textura de la miga se correlaciona directamente con la capacidad de manipulación de la masa (Crockett et al., 2011). Los ensayos reológicos dinámicos, especialmente en la región viscoelástica lineal (RVL), se han utilizado para conocer las propiedades de las masas sometidas a pequeñas deformaciones y para estudiar las funciones de sus ingredientes (Lamacchia et al., 2010).

Esta prueba mide simultáneamente los parámetros viscoelásticos de la masa expresados en los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ), relacionados con la componente elástica y viscosa respectivamente, y la tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ) que es la relación energía disipada/energía almacenada (Steffe, 1992). El barrido de deformación se realiza para determinar la RVL, en la que los módulos  $G'$  y  $G''$  y la  $\tan \delta$  son independientes de la tensión o esfuerzo aplicado. Por lo tanto, las pruebas dinámicas son una buena forma de conocer los cambios en las características del producto debido a la formulación y al procesamiento.

Otro importante factor a considerar cuando se elabora un producto libre de gluten, es asegurarle al consumidor que el producto no contiene esta proteína. Para esto es necesario que la obtención de las harinas sin gluten se realice a partir de fuentes confiables y protegerlas junto con los demás ingredientes de la contaminación con trigo, centeno y cebada. La contaminación puede ocurrir en todas las etapas, desde el cultivo hasta el procesamiento, y por lo tanto, se requiere la verificación periódica de la ausencia de gluten, por ejemplo, mediante técnicas inmunoenzimáticas como la ELISA (Arendt & Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009).

## **4.2 Elaboración de pan**

La elaboración del pan puede dividirse en dos etapas principales: antes y después de la gelatinización del almidón. En la primera etapa se encuentra almidón ligeramente hinchado, células de levadura y componentes menores como sal y azúcar disueltos formando una suspensión. Durante el mezclado, la proteína y el almidón forman una red bicontinua elástica y extensible en la que las burbujas de gas se suspenden, aumentando de volumen durante la fermentación, provocando así el crecimiento de la masa (Gallagher, 2009; Tejero, 1992).

La cocción del pan se origina paulatinamente desde el exterior hasta el interior ocasionando varias transformaciones. Al introducir la masa en el horno, el vapor se deposita sobre la superficie de la masa y se condensa; la masa sigue fermentando y por consiguiente el volumen continúa aumentando hasta llegar a una temperatura interna de 55°C donde mueren las levaduras (Tejero, 1992). Debido a la combinación de calor, humedad y tiempo durante el horneado, los gránulos de almidón se hinchan y se solubilizan parcialmente, es decir se gelatinizan. Esta etapa repercutirá enormemente en la estructura de la miga y en la conservación del pan (Arendt & Dal Bello, 2008).

Entre los 70 y 100°C el gluten se va coagulando, los alveolos se dilatan por el efecto del calor y comienza la formación de la corteza. El almidón proporciona tanta viscosidad que el sedimento de los gránulos de almidón no gelatinizados y las burbujas de gas forman la miga. La miga de los panes de trigo es por lo tanto una matriz sólida formada por almidón gelatinizado y una red de gluten que encierra gránulos de almidón y fragmentos de fibras. A los 95°C comienza a evaporarse el agua de la masa produciendo vapor, lo que permitirá mantener al pan en un grado de humedad suficiente para que no se deseque excesivamente (Tejero, 1992; Gallagher, 2009; Zannini et al., 2012).

Alcanzados los 130°C continua la formación de la corteza y aparece el color debido a la caramelización de los azúcares (reacción de Maillard). Durante esta fase el calor

ira produciendo un desecado del pan, provocando un ligero encogimiento de la corteza y un tostado progresivo de la miga más próxima a esta. La cocción estará completa cuando el pan alcanza en el interior 99°C, temperatura que estará en función del tamaño del pan y de la temperatura de horneado (Tejero, 1992).

### **4.3 Agentes estructurantes**

Los panes sin gluten carecen de una red de proteínas que atrape el agua y forme la matriz para insertar el almidón; el resultado es una pasta en lugar de una masa y un pan con numerosos defectos de calidad, por lo que se hace necesario incorporar sustancias poliméricas que ayuden a formar la red estructural y mejoren las propiedades funcionales de las pastas obtenidas (Zannini et al., 2012). A continuación se describen los coadyuvantes utilizados en este estudio.

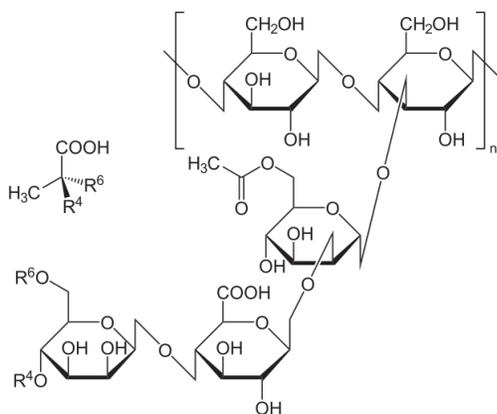
**4.3.1 Albumina de huevo:** es la proteína más abundante del huevo, se clasifica como fosfoglicoproteína por que contiene hidratos de carbono y fósforo. Una de sus principales características es que es rica en cisteína y metionina y tiene cuatro grupos sulfhidrilo que la hacen muy reactiva y fácilmente desnaturizable (Badui, 1996). Estudios han demostrado que es muy susceptible al pH, a los tratamientos térmicos y a las sales; por ejemplo a medida que aumenta la acidez se vuelve más inestable a las altas temperaturas (Campbell, 2003).

En la industria alimentaria la albumina de huevo es muy utilizada, principalmente por su alta capacidad espumante; es conocido que esta proteína forma películas viscoelásticas cohesivas fuertes, esenciales para la estabilidad de la espuma y para mejorar la retención de gas (Zannini et al., 2012). También actúa como emulsificante y estabilizante de la grasa en la masa y tiene buena capacidad para asociarse y formar geles con distintas propiedades reológicas, además aumenta el valor nutricional de los alimentos gracias a que es una proteína con alto valor biológico; atributos que resultan muy útiles al incorporarla en la formulación de productos libres de gluten para mejorar las deficiencias de calidad anteriormente mencionadas (Arendt & Dal Bello, 2008; Campbell et al., 2003).

Se ha reportado que la inclusión de albumina de huevo en la formulación de panes libres de gluten aumenta la capacidad de absorción de agua de la mezcla, permite una dispersión más homogénea de las proteínas y los gránulos de almidón y forma una red continua de proteínas tipo film similar a la que se encuentra en el pan de trigo (Gallagher, 2009). El pan resultante muestra menores pérdidas por horneado favoreciendo el volumen específico, un aumento en el número de alveolos/cm<sup>2</sup> y un aumento significativo en la humedad miga; características deseables en un pan sin gluten (Zannini et al., 2012).

Los resultados reportados hasta la fecha sugieren que las proteínas de huevo son una herramienta valiosa para el reemplazo del gluten en formulaciones que no lo contienen, gracias a que contribuyen en la formación de la estructura y pueden mejorar el aspecto nutricional que tanto necesitan.

**4.3.2 Goma Xanthan:** es un polisacárido aniónico de alto peso molecular, producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Es soluble en agua caliente y fría e insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos. Su estructura química (**Figura 19**) está formada por una cadena principal de celulosa, es decir, moléculas de glucosa unidas mediante el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico, con ramificaciones en el carbono 3 compuestas por un residuo de ácido glucurónico ligado a una unidad de manosa terminal y a una segunda manosa que se conecta a la cadena principal (D-manopiranososa-(2,1)- $\beta$ -D-ácido glucurónico-(4,1)- $\beta$ -D-manopiranososa). Adicionalmente, algunas de las manosas terminales pueden llevar residuos de piruvato ligados a las posiciones C4 y C6 (Kohajdová & Karovičová, 2008; Phillips & Williams, 2000).



**Figura 19.** Estructura química de la goma xanthan. Tomada de Ebah (2013).

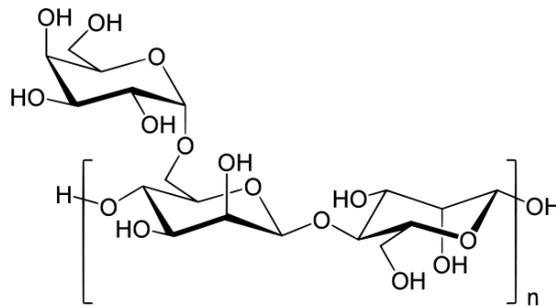
Las soluciones de goma xanthan presentan comportamiento pseudoplástico. Cuando el esfuerzo cortante se incrementa, la viscosidad se reduce progresivamente; al eliminar el esfuerzo, la viscosidad inicial se recobra. Este comportamiento resulta de la habilidad de las moléculas de xanthan, en solución, para formar agregados a través de puentes de hidrogeno y polímeros entrelazados que resultan en la formación de una red compleja débilmente unida, por lo que esta goma se considera no gelificante (Phillips & Williams, 2000). Otra característica particular es que las soluciones no son afectadas por los cambios de pH, temperatura o concentración de sal (Arendt & Dal Bello, 2008).

En los productos horneados la goma xanthan aumenta la absorción de agua de la masa, contribuye a la incorporación y retención de aire, aumenta el volumen específico del pan, además le aporta suavidad mejorando la textura, la retención de

humedad en la miga y la vida útil mediante la limitación de la retrogradación del almidón; sin embargo, estas propiedades se obtienen sólo a bajas concentraciones (<1%) (Arendt & Dal Bello, 2008; Kohajdová & Karovičová, 2008).

**4.3.3 Goma Guar:** es el polisacárido de reserva de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba*, una planta de la familia de las leguminosas. La goma en polvo es neutra y, como tal, sus soluciones son poco afectadas por los iones o el pH; es soluble en agua a 25°C y contiene 75-85% del polisacárido (el hidrocoloide real), 5-6% de proteína, 8-14% de humedad y otros componentes (Arendt & Dal Bello, 2008).

Químicamente, la goma guar es un galactomanano con una cadena principal formada por unidades de  $\beta$ -D-manopiranosas unidas mediante enlaces  $\beta$  (1,4), de la cual se desprenden ramificaciones en la posición 6 de  $\alpha$ -D-galactopiranosas. Se sabe que por cada unidad de galactosa hay de 1,5 a 2 residuos de manosa (Kohajdová & Karovičová, 2008). Su estructura química se presenta en la **Figura 20**.



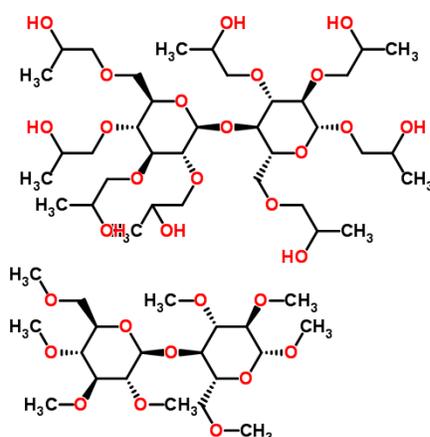
**Figura 20.** Estructura química de la goma guar. Tomada de Ebah (2013).

Las propiedades de esta goma dependen en gran medida del grado de sustitución de galactosa, dado que cantidades altas de manosa aumentan la rigidez del polímero y reducen la extensibilidad. La goma guar puede producir viscosidades que se encuentran entre las más altas de todos los hidrocoloides a una determinada concentración, aunque esta viscosidad depende de la longitud de la cadena de galactomanano. Al igual que la xanthan, la goma guar no forma gel pero es buen espesante, exhibiendo sinergismo con agar, carragenina y xanthan dando lugar a viscosidades aún más altas (Arendt & Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009).

En la industria alimentaria, se utiliza como un agente espesante y estabilizante en una amplia variedad de alimentos, por lo general en cantidades menores al 1%. Estudios han reportado su uso en productos horneados, encontrando que mejora la palatabilidad, las propiedades reológicas y la vida de anaquel a través de la retención de humedad, además puede retrasar el envejecimiento del pan por una posible inhibición de la retrogradación de la amilopectina, ya que esta goma se une preferentemente al almidón (Kohajdová & Karovičová, 2008). En los panes libres de

gluten mejora el volumen específico y algunos autores concluyeron que la combinación de goma xanthan, pectina y goma guar originaba los productos de mejor calidad (Rosell, 2013).

**4.3.4 Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC):** este hidrocólide se obtiene por la adición de metilo y grupos hidroxipropil a la cadena de celulosa (**Figura 21**), la cual se forma por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucopiranosas mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Es soluble en agua fría y el hecho de ser derivado de la celulosa lo hace un polímero con alta actividad superficial y le confiere propiedades únicas respecto a sus características de hidratación y/o deshidratación cuando está en solución y durante los cambios de temperatura (Campbell et al., 2003).



**Figura 21.** Estructura química de la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).  
Tomada de ChemSpider (2013).

A pesar de la presencia de grupos hidrófobos en su cadena, este polímero mantiene parcialmente las propiedades hidrófilas de la celulosa. Sus soluciones ofrecen buena viscosidad y estabilidad en un amplio rango de pH, entre 3 y 11 (Phillips & Williams, 2000), su propiedad más importante es que pueden someterse a gelificación térmica reversible, es decir, gelifica en agua fría, se convierte en amorfo tras el calentamiento y vuelve de nuevo a gel después del enfriamiento; además exhiben un comportamiento pseudoplástico y pueden formar film (Arendt & Dal Bello, 2008; Crockett et al., 2011).

Esta capacidad para formar film le permite fortalecer las burbujas de gas de la masa que se expanden durante la cocción reduciendo la pérdida de gas, por lo tanto el volumen del pan mejora; esta red también podría actuar como una barrera evitando la pérdida de vapor de agua, aumentando así el contenido de humedad final en el pan. Su uso mejora también la textura de la miga, además es un buen agente anti-envejecimiento gracias a que disminuye la migración de la humedad hacia la superficie del pan (Bárceñas & Rosell, 2005).

#### **4.4. Trabajo experimental**

El trabajo experimental se dividió en tres etapas: en la primera se realizaron los ensayos de preformulación para evaluar el efecto de los agentes estructurantes sobre dos formulaciones. En la segunda etapa el objetivo fue obtener una mezcla análoga al gluten, esta puede definirse como una mezcla de materiales que al ser incorporados en la elaboración de productos panificados aporte propiedades viscoelásticas y funcionales proporcionando cualidades sensoriales y estructurales aceptables en el producto final. En la última etapa se tomaron los mejores resultados obtenidos durante todo el trabajo, se integraron para formular la materia prima libre de gluten (MPLG) y se elaboró un prototipo panificado para evaluar su competencia tecnológica

##### **4.4.1 Materiales**

**4.4.1.1 Ensayos de preformulación:** para la elaboración del pan control se utilizó harina de trigo marca los gallos (humedad 8,04% y proteína 13%) y para los panificados modelo libres de gluten se formuló una premezcla compuesta por plátano y lenteja germinada y sin germinar; además se adicionó grasa vegetal marca inca, levadura instantánea liofilizada marca nevada, azúcar morena (0,7% de humedad), sal (0,6% de humedad) y como agentes estructurantes goma xanthan y guar, ambas con un contenido de humedad del 4%, y albumina de huevo en polvo pasteurizada de alto poder de gel (humedad 8,0%, pH 7,5, proteína 80%, grasa 0,20%, cenizas 6,0%). Los materiales fueron suministrados por el grupo de Ciencia y Tecnología de los Cereales del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.

**4.4.1.2 Análogo del gluten:** como componente mayor para su formulación, se utilizaron las harinas de lenteja, garbanzo y plátano por los buenos resultados de funcionalidad obtenidos, como agentes estructurantes albumina, HPMC, goma guar y goma xanthan, además se incluyó aceite de girasol y sal. Todos los materiales fueron suministrados por el grupo de Estabilidad de Medicamentos, Cosméticos y Alimentos (GEMCA) de la Universidad de Antioquia.

**4.4.1.3 Formulación de la materia prima libre de gluten y ensayo de prototipo:** para los prototipos libres de gluten se utilizó una multimezcla compuesta por harina de lenteja germinada, quinua y ahuyama, a la cual se le incorporó el análogo del gluten seleccionado como óptimo; además se utilizó levadura fresca, aceite de girasol, azúcar y sal. Todos los materiales fueron adquiridos en supermercados de cadena de la ciudad de Medellín, Colombia.

## 4.4.2 Métodos

### 4.4.2.1 Ensayos de preformulación

**Elaboración de panificados modelo:** las condiciones de amasado se determinaron con el método 54-40<sup>a</sup> de la AACC (1995) en un mixógrafo (National Manufacturing Co., Lincoln, NE). La porción de masa utilizada para cada mixograma fue de 30 g. Con los mixogramas obtenidos se determinó la cantidad de agua necesaria y el tiempo de desarrollo de la masa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los panificados modelo se obtuvieron siguiendo el método 10-10B de la AACC (1994). Un ensayo fue realizado, en el que se evaluó el efecto de las gomas sobre las harinas, además del pan de trigo control en todos los ensayos se elaboró un pan control libre de gluten de cada formulación. Para definir la cantidad de goma se tomaron como referencia los valores reportados por Crockett et al., (2011), Gallagher (2009) y Arendt & Dal Bello (2008). El tiempo de fermentación fue de 45 minutos y el de horneado de 24 minutos a 215 °C. Las formulaciones se presentan en la **Tabla 6**.

El volumen del pan se determinó por desplazamiento de semillas después del horneado según el método 10-09 de la AACC (2000). El volumen específico (VE) se determinó usando la fórmula  $VE \text{ (cm}^3\text{/g)} = \text{Volumen/Peso}$ . Los ensayos para evaluar la dureza se realizaron después de 1 hora, cuando el pan se había enfriado, cortando transversalmente y tomando cubos de 25 mm de espesor del centro del pan. El análisis se realizó mediante la prueba de compresión simple utilizando un analizador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipado con una sonda cilíndrica de acrílico de 12,7 mm de diámetro bajo los siguientes parámetros: velocidad pre test 2.0 mm/s, velocidad test 1,7 mm/s, velocidad post test 10,0 mm/s, distancia de ruptura test 1.0 mm, distancia 5,0 mm, fuerza 100 g, tiempo 5 s. Las mediciones en ambas pruebas fueron hechas por triplicado.

**Cuantificación de gluten por Elisa R5:** la cuantificación de gluten se le realizó tanto a las materias primas como a los panificados modelo obtenidos, los cuales fueron molidos antes del análisis. Primero se realizó la extracción etanólica de gliadinas para lo cual se pesaron 0,25 g de muestra, se adicionaron 2,5 mL de etanol al 60% y se homogenizó, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se hicieron las diluciones respectivas.

El gluten se cuantificó mediante el kit comercial ELISA-R5 tipo sándwich (Kit Ridascreen gliadin; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania); según lo establecido en el Codex Alimentarius (CODEX, 2008). Para esto se adicionaron 100 µL de muestra en cada pozo de la placa y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se

realizaron 3 lavados, se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo conjugado con peroxidasa y se incubó durante 30 min. Nuevamente se realizaron 3 lavados y se agregaron 50  $\mu$ L de sustrato (peróxido de urea) y 50  $\mu$ L de cromógeno (tetrametilbenzidina) a cada pozo, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1N. La placa fue llevada a un lector Bio-Rad modelo 550 microplate reader y leída a una longitud de onda de 450 nm. Finalmente se determinó el contenido de gliadinas con una curva estándar de gliadinas. El resultado se multiplica por 2 para obtener la concentración de gluten expresado en ppm. La determinación se hizo en el laboratorio de proteínas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.

#### 4.4.2.2 Análogo del gluten

**Obtención del análogo del gluten:** para formular se tomó como referencia la composición química del gluten reportada por Hui (2006); y con base a la composición proximal reportada en el Capítulo 3, se definieron las harinas que serían incluidas. Para evaluar el comportamiento de los materiales se realizaron dos ensayos cualitativos tomando como referencia la Norma Técnica Colombiana NTC 5749 (NTC, 2009) con modificaciones. De estos ensayos se obtuvieron tres mezclas con potencial. Las formulaciones utilizadas se presentan en las **Tablas 10 y 11**.

**Propiedades reológicas:** a las tres mezclas de análogo con potencial se les evaluaron sus propiedades reológicas mediante ensayos dinámicos oscilatorios. Para esto se utilizó un reómetro Bohlin Gemini HR nano Malvern Rotonetic drive 2, con control de temperatura Peltier a 25°C, con placas paralelas de 40 mm, según el método reportado por Crockett et al., (2011). Las muestras se prepararon pesando 10 g de análogo y 6 mL de agua destilada, se mezclaron y se dejaron reposar en recipientes cerrados durante 15 minutos para permitir la hidratación de las gomas.

La muestra se colocó entre la placa y la base, se comprimieron a 1,75 mm y se retiró el exceso de mezcla. Entre la muestra y la placa se ubicó una trampa con agua como solvente para evitar que la muestra se secase. La mezcla se dejó reposar durante 5 min antes del análisis para permitir su acoplamiento a la geometría y su relajación. Primero se realizó el barrido de deformación con un esfuerzo aplicado de 0,01 a 1000 Pa y una frecuencia constante igual a 1 Hz para hallar la RVL. Luego se realizó el barrido de frecuencia con un esfuerzo constante de 1 Pa, definido a partir de la RVL y una frecuencia de 0,01 a 20 Hz. Los parámetros reológicos, módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ), se calcularon utilizando el software Bohlin R6.51.03. Todas las muestras se analizaron por triplicado en el laboratorio de Coloides de la Universidad de Antioquia.

#### 4.4.1.3 Formulación de la materia prima libre de gluten y ensayo de prototipo

**Formulación de la materia prima y composición proximal en base seca:** para la obtención de la materia prima se utilizó la formulación presentada en la **Tabla 12** y su composición proximal (**Tabla 13**) se determinó siguiendo métodos oficiales AOAC (1997) y GTC (Guía Técnica Colombiana) (2012). Proteína método AOAC 954.01 usando un factor de conversión de Nitrógeno de 6.25, grasa total método GTC 6.1, cenizas método AOAC 923.03, humedad método GTC 1.14. contenido de almidón por hidrólisis acida – Lane Eynon (UNAM, 2008).

**Propiedades reológicas de la mezcla:** se midieron siguiendo el procedimiento reportado en el numeral 4.4.2.2 pero en el barrido de frecuencia el esfuerzo constante fue de 1,5 Pa.

**Elaboración de prototipo:** para el prototipo final, se preparó la solución de azúcar – sal siguiendo el método 10-10B de la AACC (1994); se disolvió la levadura en agua a 35°C durante 5 min antes de la adición de los ingredientes secos restantes. Todos los ingredientes se mezclaron con una batidora manual Black and Decker M24S, en velocidad 1 durante 1 min y luego se ajustó a velocidad 3 durante 4 min para garantizar la homogeneidad de la mezcla, la cual fue dividida en porciones de 60 g y depositada en moldes de silicona. Se dejaron por 45 minutos a 30,9 °C en cámara de fermentación con una humedad relativa de 80% y se hornearon en un horno convectivo Salva Kwik – co K 5 a 215°C durante 25 minutos. Por último se retiraron de los moldes y se dejaron enfriar durante 2 horas antes de su análisis. Las formulaciones empleadas se presentan en la **Tabla 14**.

La medición del volumen específico se realizó según el procedimiento descrito en el numeral 4.4.2.1 y la dureza se determinó por compresión simple empleando un texturómetro Brookfield CT3 con carga de 10000g utilizando un aditamento de acrílico en forma cilíndrica de 12,7 mm de diámetro sobre trozos de muestras de 20 mm de diámetro y 20 mm de espesor; se comprimió hasta una profundidad de 10 mm (50%), a una velocidad de 1mm/s y una carga de activación de 5 g. Las mediciones en ambas pruebas fueron hechas por triplicado.

**Concentración de nutrientes:** la cuantificación de Rbf se hizo según el método reportado en el Capítulo 3 numeral 3.5.2.4; esta se determinó tanto en la materia prima como en el prototipo obtenido por ser este el micronutriente más sensible al proceso de elaboración del pan. La cuantificación de Fe y Zn se hizo en la materia prima según el método reportado en el Capítulo 3 numeral 3.5.2.5.

#### 4.4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se aplicó solamente en los ensayos de preformulación. Este se realizó utilizando el Software Minitab Statistical versión 16.0 (Minitab Inc. State College PA, EE.UU.). El análisis de Pearson (r) se utilizó para encontrar las correlaciones entre las diferentes formulaciones respecto a una propiedad evaluada. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía (análisis de varianza). La media de separación se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey.

#### 4.5 Resultados y Discusión

##### ENSAYOS DE PREFORMULACIÓN

**4.5.1 Elaboración de panificados modelo:** se elaboraron dos premezclas libres de gluten en una relación 70:30; la primera estaba compuesta por plátano y lenteja germinada (Premezcla 1) y la segunda por plátano y lenteja sin germinar (Premezcla 2). Se realizó el ajuste de proteína y humedad de cada premezcla con base al 14% por ser la humedad máxima de la harina de trigo utilizada como referencia. Mediante los mixogramas realizados se determinó la cantidad de agua necesaria y el tiempo de desarrollo de la masa (**Tabla 5**).

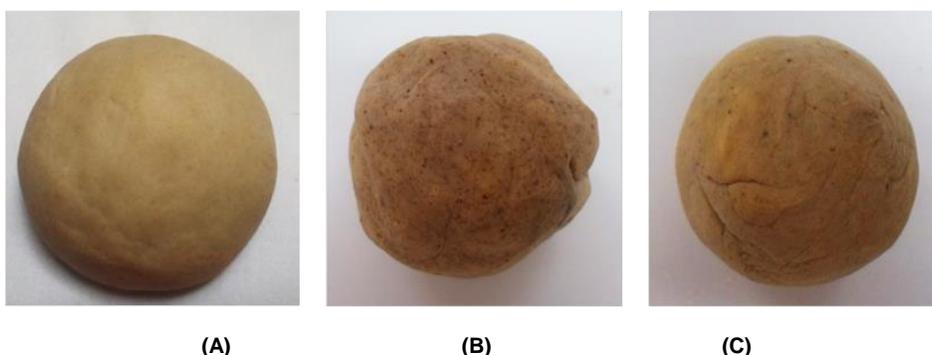
Los mL de agua teóricos, según el método aplicado, para la adecuada hidratación de las premezclas fueron inferiores a los que realmente se utilizaron para obtener una masa con propiedades panaderas. Para la premezcla 1 fue necesario adicionar 41% más de agua mientras que para la premezcla 2 se requirió 12% más; lo que representa un contenido final de agua del 95 y 80% respectivamente. Estos resultados eran de esperarse porque las harinas empleadas presentaron mayores propiedades de hidratación que la harina de trigo.

**Tabla 5.** Resultados obtenidos de los mixogramas

MUESTRA	g de muestra	mL de agua según método	mL de agua finales	Tiempo óptimo de amasado (min)
Control (Harina de trigo)	29,964	18,63	18,63	4:15
Premezcla 1 (PLA/LEG) (70/30)	26,544	17,79	25,22	4:30
Premezcla 2 (PLA/LEN) (70/30)	26,652	17,64	21,32	3:40

En general, las formulaciones libres de gluten, independiente de los ingredientes utilizados, requieren mayor hidratación (Arendt & Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009; Hui, 2006); por lo que se recomienda evaluar y controlar la cantidad de agua a adicionar ya que un exceso de esta afecta el comportamiento reológico de las

masas, la calidad final del pan y por consiguiente disminuye la vida útil debido a una mayor actividad de agua en el producto (Hager et al., 2012). Sin embargo, las masas resultantes eran menos pegajosas y más compactas que la de trigo, debido posiblemente a la buena capacidad de absorción de las harinas utilizadas, lo que favoreció su manipulación durante el proceso, aunque durante la fermentación y horneado esto sería una desventaja ya que podría perjudicar su buen desempeño. Las masas obtenidas se presentan en la **Figura 22**.



**Figura 22.** Masas obtenidas de los mixogramas: (A) Control de trigo, (B) premezcla plátano + lenteja germinada, (C) premezcla plátano + lenteja sin germinar. Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Cereales del CIAD.

Una vez obtenidos los tiempos óptimos de amasado y el agua requerida, se elaboraron 9 panes de los cuales tres eran control: uno a base de trigo y uno de cada premezcla libre de gluten, los 6 panes restantes se hicieron modificando el tipo de goma. Las formulaciones empleadas se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Panificados modelo preformulados

INGREDIENTES <sup>a</sup>	FORMULACIÓN (g)								
	CONTROL	1	2	3	4	5	6	7	8
Harina de trigo	69,96	-	-	-	-	-	-	-	-
Premezcla 1 (PLA/LEG) (70/30)	-	61,94	61,94	61,94	61,94	-	-	-	-
Premezcla 2 (PLA/LLEN) (70/30)	-	-	-	-	-	62,19	62,19	62,19	62,19
Agua potable	38,83	54,21	54,21	54,21	54,21	45,11	45,11	45,11	45,11
Solución Azúcar-Sal	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66
Levadura instantánea	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
Grasa Vegetal	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40
Goma Guar	-	-	0,70	-	0,35	-	0,70	-	0,35
Goma Xanthan	-	-	-	0,70	0,35	-	-	0,70	0,35

<sup>a</sup> Ingredientes expresados en porcentaje de panificación: Premezcla libre de gluten: 100%; agua: control: 55,5%, premezcla 1: 87,52%, premezcla 2: 87,17%, solución azúcar-sal: 12,37%, levadura: 2,26%, grasa vegetal: 3,87%, goma guar: 1%, goma xanthan: 1%, mezcla de gomas (50:50): 1%.

La apariencia visual, así como el volumen de los panes y la estructura y suavidad de la miga son características importantes para el consumidor, ya que las percibe y asocia con la calidad del producto. Se ha informado anteriormente que las harinas libres de gluten utilizadas en este estudio son materias primas potenciales, ya sea solas o en combinación, para la elaboración de productos panificados. Sin embargo, la calidad de los panes resultantes fue inferior a la del pan de trigo. En la **Figura 23**, se muestran las imágenes digitales de las cortezas de los panes modelo preformulados y sus cortes transversales.



**Figura 23.** Cortezas de los panes modelo preformulados y sus cortes transversales. (A) Control de trigo. Premezcla 1: (B) Control libre de gluten, (C) 1% de goma guar, (D) 1% de goma xanthan, (E) 0,5% goma guar+0,5% goma xanthan. Premezcla 2: (F) Control libre de gluten, (G) 1% de goma guar, (H) 1% de goma xanthan, (I) 0,5% goma guar+0,5% goma xanthan. Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Cereales del CIAD.

Al comparar los panes libres de gluten con el pan de trigo, es evidente que la corteza de estos tiene un aspecto quebradizo, las características de los poros son distintas y la estructura de la miga es más compacta, indicando que la humedad no fue retenida lo suficiente para obtener una textura más suave; por consiguiente el volumen específico y la dureza se vieron afectados. Los efectos del tipo de goma y sus concentraciones sobre el volumen específico y la dureza de los panes se presentan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Volumen específico y dureza de los panes modelo preformulados

PREMEZCLA	FORMULACIÓN	VOLUMEN ESPECIFICO (cm <sup>3</sup> /g)	DUREZA (N)
Trigo	Control	3,05 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,21 ± 0,24 <sup>d</sup>
Premezcla 1 (PLA/LEG) (70/30)	1	1,53 ± 0,10 <sup>e</sup>	40,77 ± 3,60 <sup>bc</sup>
	2	1,64 ± 0,02 <sup>cde</sup>	40,60 ± 8,50 <sup>bc</sup>
	3	1,58 ± 0,04 <sup>de</sup>	31,14 ± 5,22 <sup>c</sup>
	4	1,65 ± 0,02 <sup>cd</sup>	30,08 ± 0,51 <sup>c</sup>
Premezcla 2 (PLA/LEN) (70/30)	5	1,64 ± 0,04 <sup>cde</sup>	65,43 ± 2,58 <sup>a</sup>
	6	1,74 ± 0,02 <sup>bc</sup>	49,66 ± 1,59 <sup>b</sup>
	7	1,69 ± 0,04 <sup>cd</sup>	43,02 ± 1,25 <sup>b</sup>
	8	1,85 ± 0,05 <sup>b</sup>	30,83 ± 0,03 <sup>c</sup>

Todos los datos representan la media de triplicados ± desviación estándar. Las medias con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) acorde al método de Tukey con una confianza del 95.0%.

Se observa que en ambas premezcla, la adición de gomas, solas o en combinación, tuvo un efecto positivo respecto a los controles sin gluten (Formulaciones 1 y 5). El volumen obtenido en los panes libres de gluten fue significativamente menor que el control; el cual presentó un volumen específico de 3,05 cm<sup>3</sup>/g. El mayor volumen para los panes sin gluten lo presentaron las formulaciones 4 y 8 (1,65 y 1,85 cm<sup>3</sup>/g, respectivamente) que contenían la mezcla de gomas y el más bajo fue para las formulaciones 3 y 7 (1,58 y 1,69 cm<sup>3</sup>/g, respectivamente) que solo contenían goma xanthan (**Figura 24**).

Estos resultados están acorde con los encontrados por Rosell et al., (2001) quienes observaron una disminución en la expansión de la masa de trigo cuando le fue adicionada goma xanthan, posiblemente porque la interacción entre la proteína y los hidrocoloides limita la expansión de la masa durante la fermentación. Sin embargo, difieren de los reportados por Ács, Kovacs, & Matuz (1996a, 1996b) quienes investigaron el uso de diferentes hidrocoloides, como sustitutos del gluten en formulaciones de pan sin gluten, encontrando que la adición de estos agentes aumenta el volumen del pan. Ellos concluyeron que el pan sin gluten de más alta calidad contenía entre 1-3% de goma xanthan. Una posible explicación de este resultado es la diferencia entre los materiales utilizados y la interacción entre ellos, además de las concentraciones empleadas.

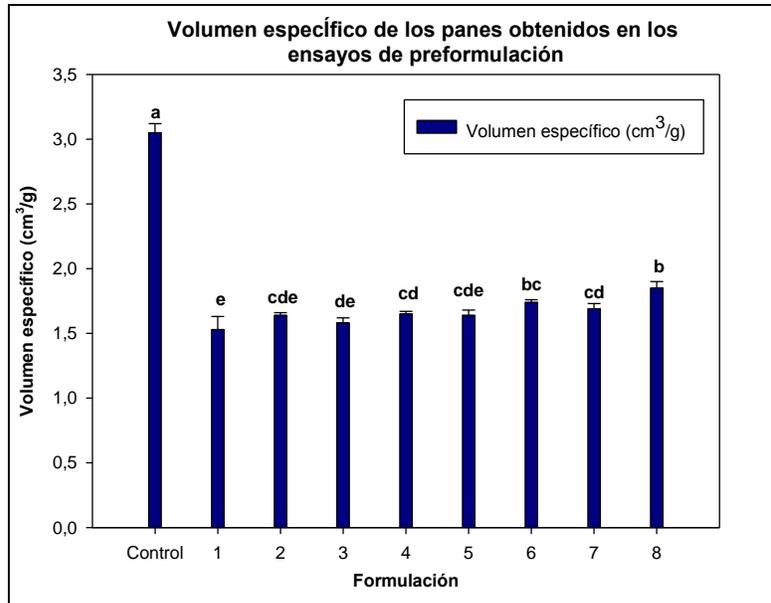


Figura 24. Volumen específico de los panes modelo preformulados.

En cuanto a la dureza, las formulaciones 2 y 6 que contenían 1% de goma guar mostraron valores más altos que las formulaciones que contenían 1% de goma de xanthan (3 y 7) y mezcla de las dos gomas (4 y 8), siendo estas últimas la mejor opción respecto a esta propiedad (**Figura 25**). El endurecimiento está asociado al deterioro de la calidad del pan durante el almacenamiento y a cambios sensoriales típicos que incluyen aumento en la firmeza de la miga y pérdida de sabor y humedad, entre otros (Sahraiyán et al., 2013).

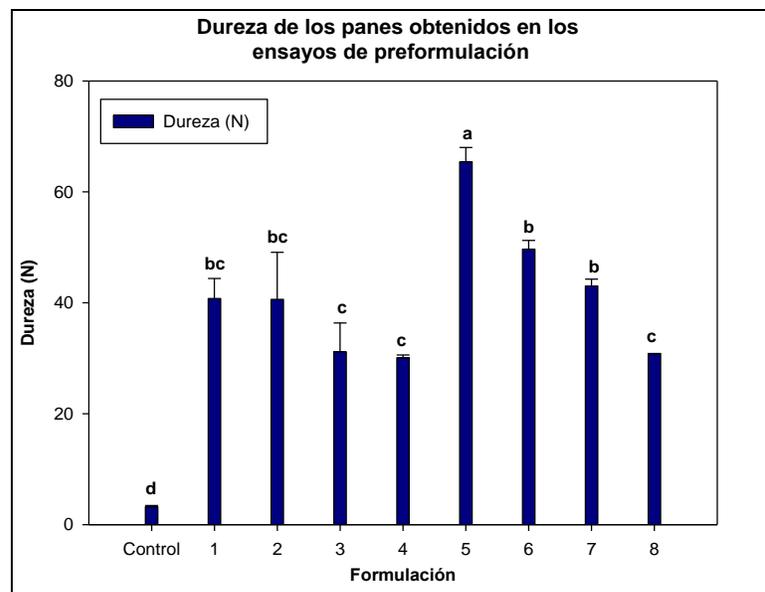


Figura 25. Dureza de los panes modelo preformulados.

La dureza de los panes libres de gluten estuvo entre 30,08 y 65,43 N mientras que el pan control de trigo estuvo en 3,21 N. Los altos valores no son deseados ya que los consumidores relacionan una miga firme a un producto viejo.

Al igual que en el presente trabajo, Sumnu et al., (2009) observaron que la goma guar llevó a los mayores valores de dureza cuando evaluaron su efecto en formulaciones sin gluten a base de arroz. Gómez et al., (2007), reportaron igual comportamiento indicando que la goma guar dio lugar a las tortas más duras con una firmeza 140% más alta que la del control mientras que las tortas que contenían goma xanthan la disminuyeron en un 40%. Ellos también encontraron que el efecto del hidrocoloide en el aumento de la dureza era dependiente del tipo de goma añadido y que esto puede ser explicado por las diferentes interacciones químicas entre las gomas y el almidón que afectan su retrogradación.

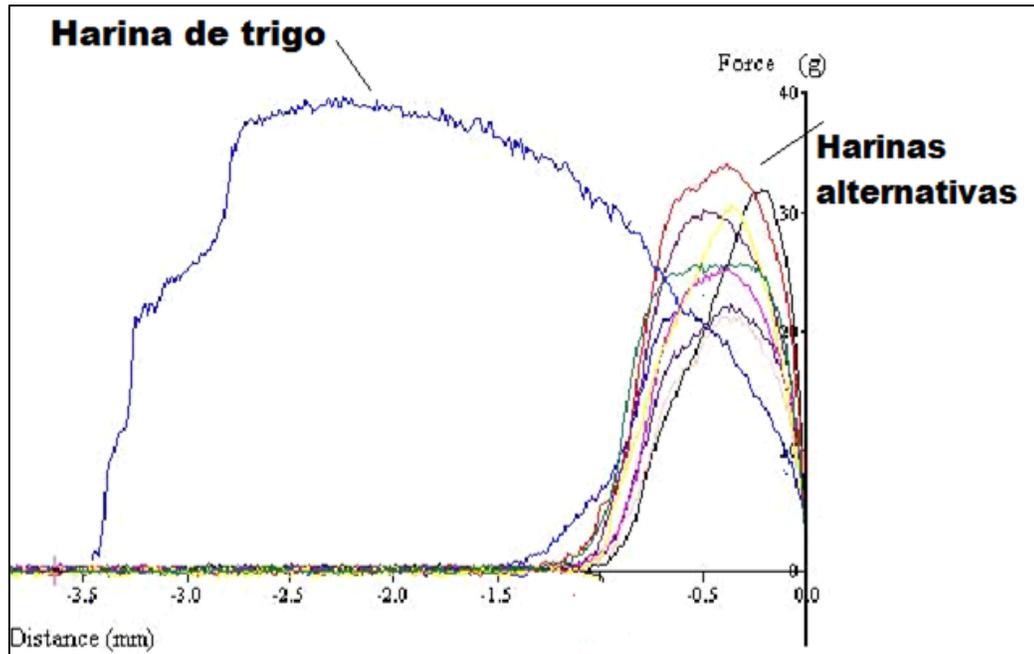
La combinación de xanthan y guar en ambas premezclas resultó en una disminución significativa en los valores de dureza de los panes sin gluten, lo que sugiere que la adición de estas gomas retarda el envejecimiento del pan en términos de dureza. Las gomas son capaces de modificar la gelatinización del almidón y retardar su retrogradación mediante la interacción con la amilosa y la amilopectina. Estos resultados están acorde con lo reportado por Ozkoc et al., (2009).

En general, los panes presentaron una miga homogénea aunque con una apariencia mucho más densa y firme que la del control de trigo, lo que puede asociarse a varios factores. Uno de ellos es la deficiencia de estas harinas en proteínas estructurales que da como resultado redes moleculares débiles, presentando una menor expansión durante la fermentación, probablemente debido a que las celdas formadas durante el amasado no tuvieron suficiente fuerza para mantener el gas retenido, afectando la formación de poros, reflejándose en una disminución del volumen específico (Aguilar Valenzuela et al., 2011; Crockett et al., 2011).

Otro factor a considerar es la tenacidad de la masa, definida como la resistencia que ofrece una masa a ser estirada. Las celdas de gas se incorporan a la masa a través del proceso de mezclado, si la masa es muy tenaz o compacta la incorporación de gas se dificulta, generando un pan denso y con corteza quebradiza, por lo que las diferencias en las migas y los defectos en las cortezas pueden deberse a las diferencias en la consistencia de las masas (Hager et al., 2012; Tejero, 1992).

La extensibilidad que es la capacidad de una masa para dejarse estirar, es otro factor que afecta la calidad del pan. En un estudio anterior realizado en el grupo de investigación de estabilidad de medicamentos, cosméticos y alimentos – GEMCA de la Universidad de Antioquia se evaluó la extensibilidad de las masas libres de gluten

(Umaña, 2010), en las que se incluyeron tanto el plátano como la lenteja, utilizando como control masa de harina de trigo. En este se pudo observar la superioridad del trigo respecto a los valores de extensibilidad de las masas libres de gluten justificada en la distancia recorrida; dando indicios de la capacidad de cada masa para retener el gas y expandirse sin romperse (**Figura 26**).



**Figura 26.** Extensibilidad de diferentes harinas evaluadas.

Tomado de Umaña, (2010). Obtenida en el laboratorio de alimentos de la Universidad de Antioquia

En una masa muy tenaz y poco extensible, como las obtenidas, debido a la falta de una matriz proteica cohesiva, la elasticidad y la extensibilidad se reducen (Hager et al., 2012). Lo que ocurre es que el gas presiona sobre las paredes, pero debido a que tiene poca elasticidad la masa no cede ante la presión del gas y este se escapa, por lo tanto la masa no se hincha obteniéndose un pan denso, con corteza quebradiza y de poco volumen (Tejero, 1992).

Se puede afirmar entonces que el volumen específico y la dureza del pan son dos de los criterios más importantes al evaluar su calidad, ya que proporciona mediciones cuantitativas del rendimiento del horneado y de la posible aceptabilidad o rechazo por parte del consumidor, además desde un punto de vista económico, es deseable una alta proporción de volumen por unidad de peso.

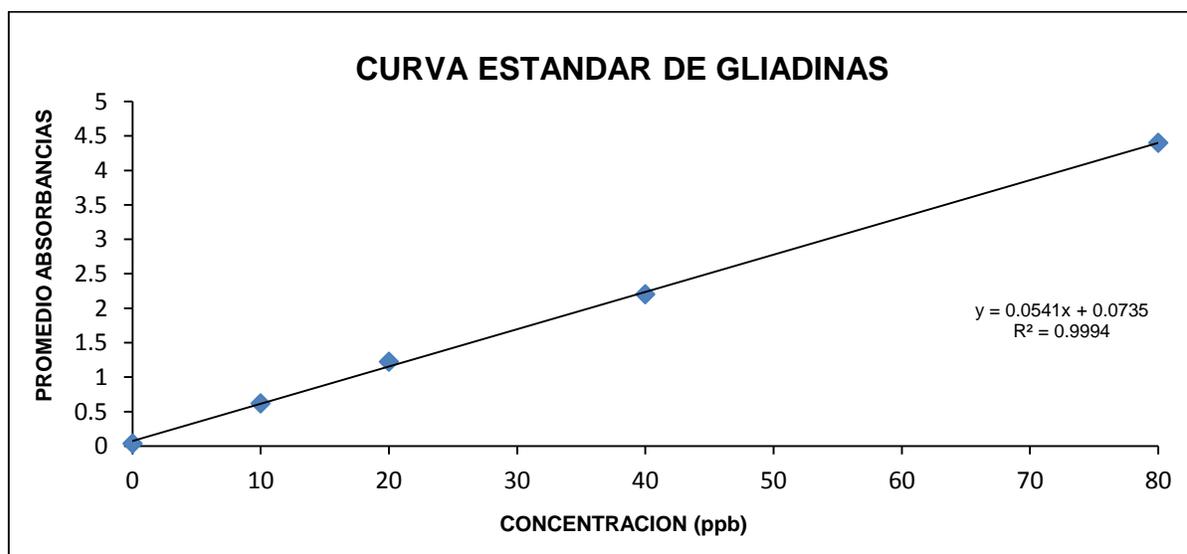
**4.5.2 Cuantificación de gluten por Elisa R5:** para garantizar la ausencia de los péptidos de gliadina se realizó una prueba inmunoquímica teniendo como control el pan de trigo. El análisis se realizó a los panes obtenidos de las premezclas 1 y 2 que

contenían la mezcla de gomas, por ser los que mejores propiedades presentaron, además se analizaron dos mezclas de harinas: una compuesta por Ahuyama y Garbanzo y otra por Quinua y Orellana; estas se consideraron como materias primas con potencial para ser utilizadas en la elaboración de productos libres de gluten. La harina de orellana no fue incluida en este trabajo pero su resultado se presenta por estar en combinación con la quinua.

Para cuantificar el gluten presente en las muestras primero se obtuvieron las absorbancias (**Tabla 8**) y se interpolaron en una curva estándar de gliadinas (**Figura 27**), obteniéndose así el contenido de gliadinas en ppb. Posteriormente, este valor se multiplico por el factor de dilución correspondiente, se llevó a ppm y se multiplico por 2 para obtener la concentración de gluten (**Tabla 9**). La multiplicación por 2 es necesaria en esta prueba porque, como se mencionó anteriormente, el anticuerpo R5 detecta principalmente prolaminas y por lo tanto se debe asumir una relación constante prolaminas / glutelinas 1:1 en todas las muestras.

**Tabla 8.** Curva estándar de gliadinas

ESTANDAR DE GLIADINAS	Concentración (ppb)	Absorbancia
	0	0.04
	10	0.62
	20	1.22
	40	2.20
	80	4.40



**Figura 27.** Curva estándar de gliadinas para la cuantificación de gluten. Obtenida en el laboratorio de proteínas de la Coordinación de Nutrición del CIAD.

**Tabla 9.** Contenido de gluten en materias primas y panes modelo preformulados.

Muestra	Absorbancia	Gliadinas (ppb)	Gliadinas (ppb) * Factor dilución	Gliadinas (ppm)	Gluten (ppm)
Pan control (trigo)	2,50	46,07	46070000,00	46070,00	92140,00
Panificado modelo Premezcla 1	0,69	12,62	6310	6,31	12,62
Panificado modelo Premezcla 2	0,21	3,89	1945	1,945	3,89
Mezcla harina Quinoa + Orellana	0,27	4,90	2450	2,45	4,9
Mezcla harina Ahuyama + Garbanzo	0,67	12,24	6120	6,12	12,24

El contenido de gluten en el pan de trigo ha sido reportado entre 90.000 y 120.000 ppm (Esquer, 2010; Heredia, 2012), encontrándose el valor obtenido en este rango (92140,00 ppm). Los resultados indicaron que los niveles de gluten en todas las muestras sin gluten fueron <13 ppm. El CODEX STAN en su norma 118 (2008): Relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten, considera que un alimento es exento de gluten cuando contiene <20 ppm (mg/kg). Como se puede observar todas las muestras analizadas cumplen con dicho parámetro, indicando que son seguras para personas que presentan enteropatías asociadas al gluten.

Los ensayos de preformulación permiten concluir que la presencia mínima de proteínas estructurales, como las prolaminas y las glutelinas, en las harinas utilizadas conlleva a la obtención de un pan con defectos de calidad en comparación con el pan de trigo. Sin embargo, es notable que la incorporación de hidrocoloides, solos o en combinación, producen un efecto positivo respecto a los controles libres de gluten, disminuyendo la dureza, aumentando el volumen específico y favoreciendo la formación de una miga homogénea. También se puede concluir que todas las materias primas utilizadas cumplen con la norma del CODEX STAN 118, en lo referente a los niveles de gluten definidos para que un alimento se denomine “*Libre de gluten*”; permitiendo ofrecer un producto seguro a las personas que presentan enteropatías asociadas a esta proteína.

## ANÁLOGO DEL GLUTEN

### 4.5.3 Ensayos cualitativos:

**ENSAYO 1:** el gluten en la harina de trigo representa aproximadamente el 11% del total de la harina; está compuesto principalmente por 70-85% de proteína, 5-15% de carbohidratos y 3-10% de lípidos (Hui, 2006). Con el fin de simular su composición, se formularon los análogos presentados en la **Tabla 10**, los cuales fueron hidratados con 6 mL de agua para su posterior evaluación.

**Tabla 10.** Formulaciones para obtener el análogo del gluten.

INGREDIENTES (%)	FORMULACION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Harina de lenteja	68	55,5	45	68	55,5	45	-	-	-	-	-	-
Harina de garbanzo	-	-	-	-	-	-	68	55,5	45	68	55,5	45
Albumina	21	33	43	21	33	43	21	33	43	21	33	43
HPMC-Guar (60:40)	2	2,5	3	-	-	-	2	2,5	3	-	-	-
Xanthan-Guar (60:40)	-	-	-	2	2,5	3	-	-	-	2	2,5	3
Harina de plátano	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Aceite de girasol	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Sal (NaCl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Las harinas de lenteja y garbanzo fueron seleccionadas porque además de su valor nutricional, sus proteínas exhiben propiedades como gelificación, emulsificación y formación de espuma haciéndolas funcionales (Miñarro et al., 2012). La gelificación se lleva a cabo tras el calentamiento a una temperatura superior al punto de desnaturalización de las proteínas, en donde las principales interacciones responsables de la formación de la red de gel parecen ser de naturaleza hidrófoba; además los puentes disulfuro covalentes pueden contribuir en cierta medida al desarrollo de la estructura del gel; lo que sugiere que la carga de la proteína desempeña un papel fundamental para equilibrar las fuerzas intermoleculares repulsivas y atractivas para formar una red de gel elástica (Tiwari, 2011).

Aunque hay diferencias entre la emulsificación y la formación de espuma, el papel de las proteínas exhibe muchas similitudes; en ambos sistemas las moléculas de proteínas son adsorbidas en la interfase formada (aceite/agua – aire/agua), reduciendo la tensión superficial, seguida por la formación de una película rígida alrededor de las gotas de aceite o burbujas de aire, evitando la coalescencia. Van Vliet et al., (2002), reportaron que las leguminas (11S) y las vicilinas (7S), gracias a su actividad superficial ayudan a estabilizar las burbujas de gas mediante la formación de agregados cuando estas son adsorbidas en una superficie aire/agua, formando una capa proteica fuerte similar a un gel en la interfaz, lo que resulta muy útil en la elaboración de productos aireados como el pan.

Otro ingrediente seleccionado que aporta valor proteico es la albumina de huevo, que presenta masas molares relativamente bajas y contiene aminoácidos principalmente ácidos. Cuenta entre sus propiedades con buena actividad superficial y emulsionante, coagulación por calor y baja temperatura de desnaturalización, lo que le permite formar películas viscoelásticas cohesivas que favorecen la estabilización de las celdas de gas y la estructura de la miga en las primeras etapas de cocción, además su alta capacidad para unirse al dióxido de carbono podría tener una

influencia importante sobre la estructura de la masa durante la fermentación y la cocción (Gallagher, 2009; Zannini et al., 2012; Ziobro et al., 2013).

Respecto a los hidrocoloides, su inclusión se hizo con la finalidad de incrementar la viscosidad de la mezcla y formar, en conjunto con las harinas y la albumina, la estructura que dará fuerza a las celdas en expansión formadas durante el amasado y permitirá la retención de gas durante la fermentación y la cocción, obteniendo un pan con mayor volumen y mejor textura (Mastromatteo et al., 2012).

La harina de plátano se incluyó por ser una excelente fuente de carbohidratos, principalmente de almidón, representando el 69,56%, además es alta en fibra dietética total (6,28 - 15,54 g/100 g en base seca) (Wang et al., 2012). El almidón gelatinizado junto con las proteínas hidratadas, facilitan el desarrollo de una red bicontinua cohesiva que atrapa las burbujas de gas y evita la pérdida de dióxido de carbono y el colapso de la corteza. Por otra parte, la inclusión de almidón en las formulaciones sin gluten mejora la consistencia de la masa durante el mezclado, la suavidad de la miga y la apariencia del producto final (Lamacchia et al., 2010; Zannini et al., 2012).

El aceite actúa como un lubricante entre las partículas en la masa disminuyendo la resistencia al mezclado. Gujral et al., (2003), evaluaron el efecto del aceite vegetal en las propiedades reológicas de la masa de arroz, encontrando que la adición de aceite aumentó tanto el módulo elástico como el viscoso, con un incremento mayor en el elástico, lo que sugiere que el aceite contribuyó en el comportamiento elástico de la masa, además influyó positivamente en las propiedades de empastado.

Los lípidos juegan un papel clave en el mantenimiento y la protección de la estructura de la masa leudada ya que presentan una baja tensión superficial; esto les permite penetrar entre la capa acuosa de la proteína y el almidón para formar una bicapa lubricante que retardará el paso del agua al almidón y por consiguiente retrasará la gelatinización, mejorando la expansión de la masa (Schoenlechner et al., 2010).

Por último, el cloruro de sodio (NaCl) juega un papel importante en las propiedades sensoriales y tecnológicas de la masa. Además de actuar como un potenciador del sabor, la sal inhibe el crecimiento de la levadura permitiendo controlar la velocidad de fermentación, fortalece la proteína, mejora la tolerancia de la masa al mezclado regulando tanto la fuerza como el equilibrio y puede afectar las propiedades funcionales especialmente la gelificación, aunque su efecto puede variar dependiendo de las características de los materiales (contenido de humedad, tipo de harina), el tipo de mezcla y las condiciones del proceso (Moreira, Chenlo, & Torres, 2011).

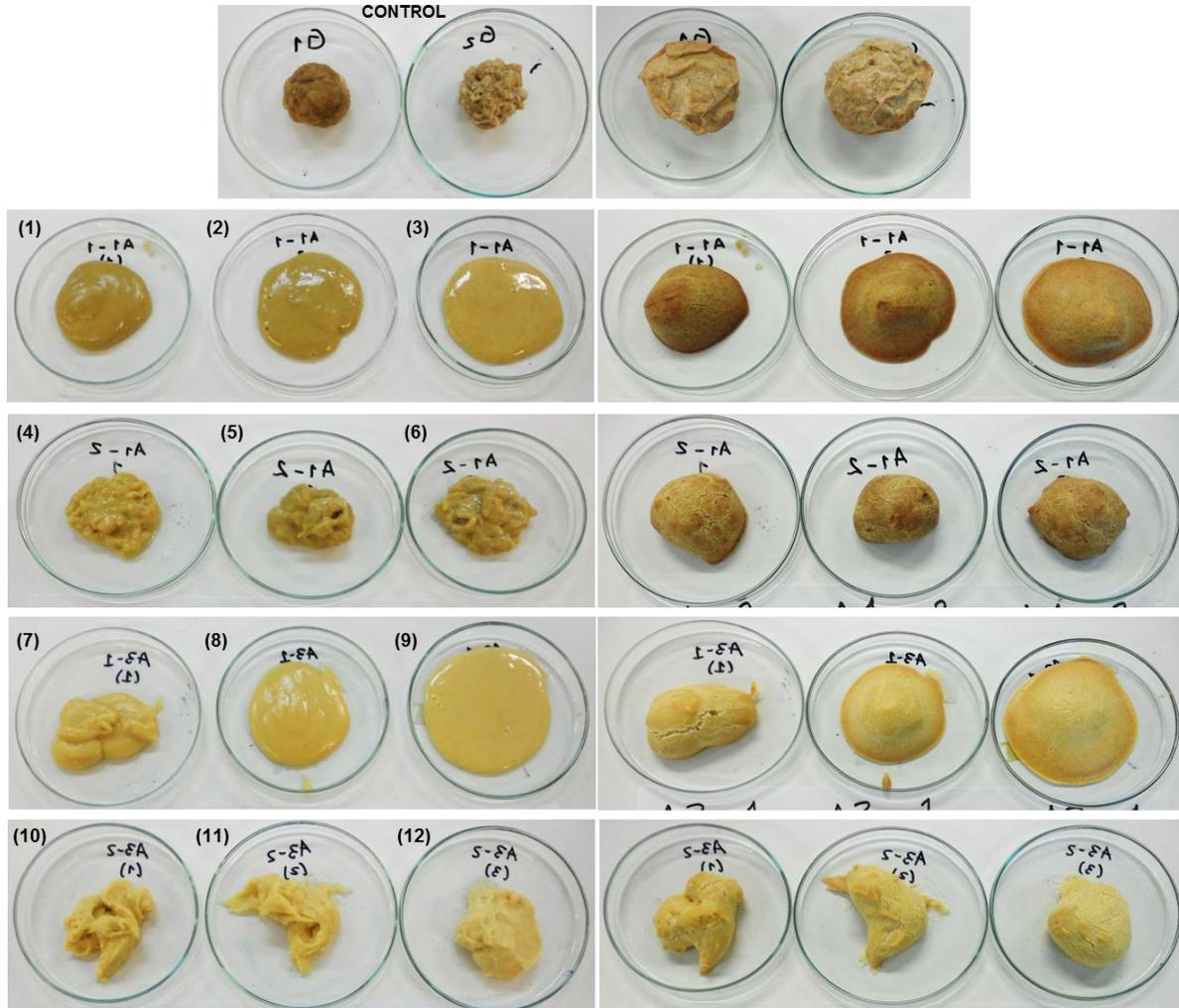
Es conocido que el cloruro de sodio tiene una fuerte influencia sobre las propiedades del gluten debido a que su naturaleza iónica le permite neutralizar los residuos de aminoácidos cargados reduciendo la repulsión electrostática, además favorece la exposición de los residuos no polares conduciendo a una mayor interacción proteína-proteína que facilita la agregación del gluten (Pflaum et al., 2013). Se esperaría que en los análogos propuestos, al igual que en el gluten, las interacciones iónicas tuvieran lugar entre las cadenas laterales cargadas de las proteínas y los iones de sodio o cloruro provocando un aumento en el módulo elástico (Tiwari, 2011).

En el gluten los iones de calcio pueden interactuar con cadenas laterales cargadas positivamente de histidina, lisina y arginina, mientras que los iones de sodio pueden interactuar con cadenas laterales cargadas negativamente de ácido aspártico y glutámico. Estas interacciones permiten una mayor agregación de la proteína lo que conlleva a la formación de una estructura más fuerte y elástica capaz de retener el gas y expandir la masa (Pflaum et al., 2013).

### **Evaluación cualitativa**

El gluten vital como control y los análogos obtenidos se presentan en la **Figura 28**. Se considera que el ingrediente que tuvo mayor efecto fue la mezcla de hidrocoloides que se añadió con el fin de dar mayor estabilidad a la estructura encargada de retener el gas. Es evidente que los análogos que contenían HPMC y goma guar, (Formulaciones 1, 2, 3, 7, 8 y 9) tanto con la harina de lenteja como con la de garbanzo presentaron un aspecto más fluido y al tacto se percibían viscosos, mientras que los análogos que contenían goma xanthan y guar (Formulaciones 4, 5, 6, 10, 11 y 12) con harina de lenteja y de garbanzo fueron más consistentes, con mayor estructura, se podían estirar aunque obviamente en menor proporción que una masa de trigo común y visualmente presentaron mayor similitud al control.

Luego de ser horneados se pudo percibir en todos los análogos que a mayor contenido de albumina y gomas mayor era la dureza, especialmente en los que contenían harina de garbanzo, y en el caso de la HPMC y la goma guar menor el volumen. Es común añadir hidrocoloides a las formulaciones de pan sin gluten como sustitutos de este porque se considera que pueden imitar las propiedades viscoelásticas del gluten; aunque existen diferencias reológicas específicas entre ambos materiales; incluso las propiedades reológicas de los geles formados por diferentes hidrocoloides difieren el uno del otro (Gallagher, 2009), lo que se demuestra con las mezclas obtenidas.



**Figura 28.** Ensayo cualitativo 1: en la columna de la izquierda se presentan las mezclas de los análogos del gluten sin hornear y en la columna de la derecha los análogos horneados. Numeración según la Tabla 10. Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Estabilidad de medicamentos, cosméticos y alimentos de la Universidad de Antioquia

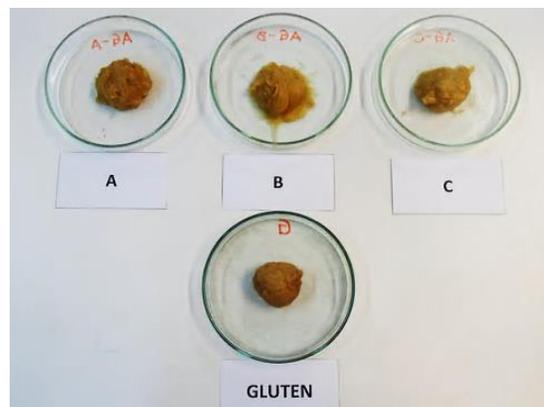
El resultado más homogéneo lo presentaron los análogos que incluían goma xanthan y goma guar lo que sugiere que interactuaron sinérgicamente con los demás ingredientes, aunque otros autores han encontrado resultados contradictorios (Crockett et al., 2011; Lazaridou et al., 2007; Marco & Rosell, 2008). Esto puede deberse a las diferencias entre los ingredientes y a las interacciones que se generan entre estos ya que finalmente impactarán el comportamiento de la mezcla y a los procedimientos utilizados para la preparación por lo que la selección de las gomas utilizadas dependerá de su desempeño durante la elaboración del pan.

**ENSAYO 2:** los resultados obtenidos en el ensayo 1 permitieron la selección de tres formulaciones para realizar un segundo ensayo, en el que se redujo el contenido de albumina y se aumentó el contenido de harina para evaluar si esta proteína afectaba

la dureza. Las formulaciones utilizadas y las mezclas obtenidas se presentan en la **Tabla 11** y la **Figura 29**.

**Tabla 11.** Formulaciones seleccionadas a partir del Ensayo 1 para el análogo del gluten.

FORMULACION (%)			
COMPONENTES	AG-A	AG-B	AG-C
Harina de lenteja	75	70	65
Albumina	14	19	24
Xanthan-Guar (60:40)	2	2,5	3
Harina de plátano	2	2	2
Aceite de girasol	6	6	6
Sal (NaCl)	1	1	1



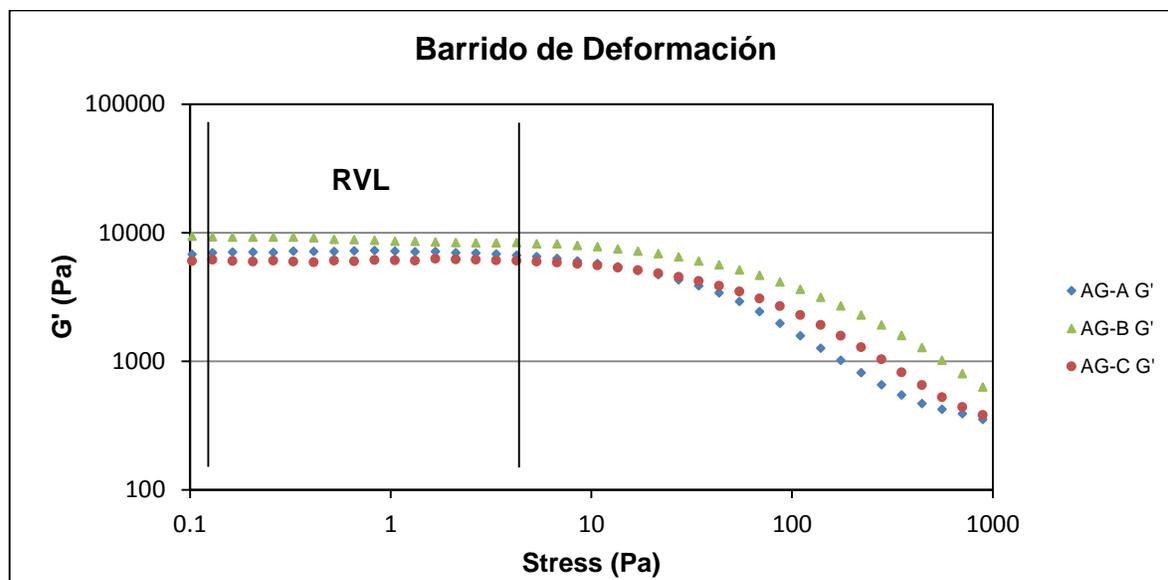
**Figura 29.** Ensayo cualitativo 2 de los análogos del gluten.

La disminución en la concentración de albúmina respecto al ensayo 1 fue favorable. Schoenlechner et al., (2010), evaluaron el efecto de la albumina en panes libres de gluten, encontrando que un alto contenido conlleva a la obtención de panes con una estructura compacta y firme y por consiguiente con mayor dureza aparente, además reduce el tamaño de los poros posiblemente por la interrupción de la estructura debido al aumento del contenido de albumina, lo que pudo afectar la retención de gas. Ellos concluyeron que la adición de albumina con mejores resultados fue cercana a 5%, especialmente porque su concentración no tiene ninguna influencia positiva en la disminución de la dureza o en el volumen del pan.

Siguiendo estos resultados, en el ensayo 2 se disminuyó el contenido de albumina en un 59% aproximadamente, pasando de 21, 33 y 43% a 14, 19 y 24%, resultando en una disminución de la dureza, por lo que se procedió a la evaluación reológica de los análogos finales.

**4.5.4 Propiedades reológicas:** se evaluó el impacto de la combinación de las gomas xanthan y guar a diferentes concentraciones sobre el comportamiento reológico de la mezcla, utilizando un nivel de agua constante para permitir una comparación directa entre las muestras. Primero se realizó el barrido de deformación para encontrar la región viscoelástica lineal (RVL) (**Figura 30**), en la cual el material es capaz de soportar deformaciones sin modificar su estructura. La determinación de la RVL es importante porque existe una fuerte correlación entre esta, el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y la calidad final del pan en las formulaciones sin gluten,

además es necesaria porque el esfuerzo que será aplicado en los barridos de frecuencia se define a partir de esta zona. Ver **Anexo 4** (Tablas de datos y transformaciones).



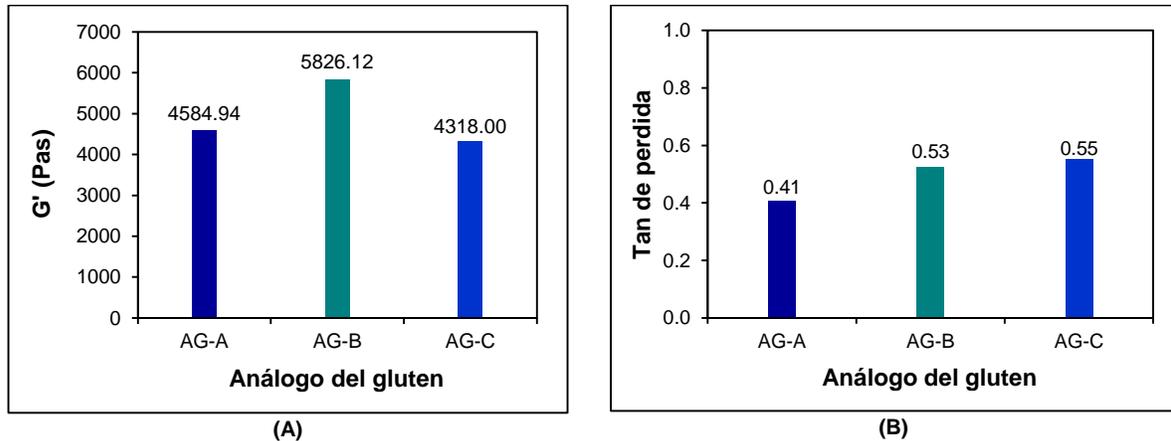
**Figura 30.** Región viscoelástica lineal de las formulaciones análogas del gluten obtenida a partir del barrido de deformación (1Hz de frecuencia a 25°C). Las curvas son promedios de duplicados para cada formulación.

Entre los análogos evaluados, la formulación AG-B que contenía 2,5% de gomas presentó mayor elasticidad (mayores valores de  $G'$ ) (**Figura 31–A**), lo que sugiere que la mezcla era más elástica, indicando que la concentración afectó las propiedades reológicas, mientras que los análogos AG-A y AG-C con 2 y 3% de gomas respectivamente exhibieron un efecto menor sobre las propiedades elásticas dinámicas de la mezcla libre de gluten.

Otro parámetro evaluado fue la tangente de pérdida ( $\text{Tan } \delta$ ) (**Figura 31–B**), que permite conocer la relación entre el comportamiento viscoso y elástico de un material. En el pan se requiere un equilibrio entre ambas propiedades ya que el componente elástico permite la formación del film y la retención de gas y el componente viscoso permite la absorción de la proteína en la interfase y la flexibilidad del film para que se dé la expansión de la masa (Lazaridou et al., 2007).

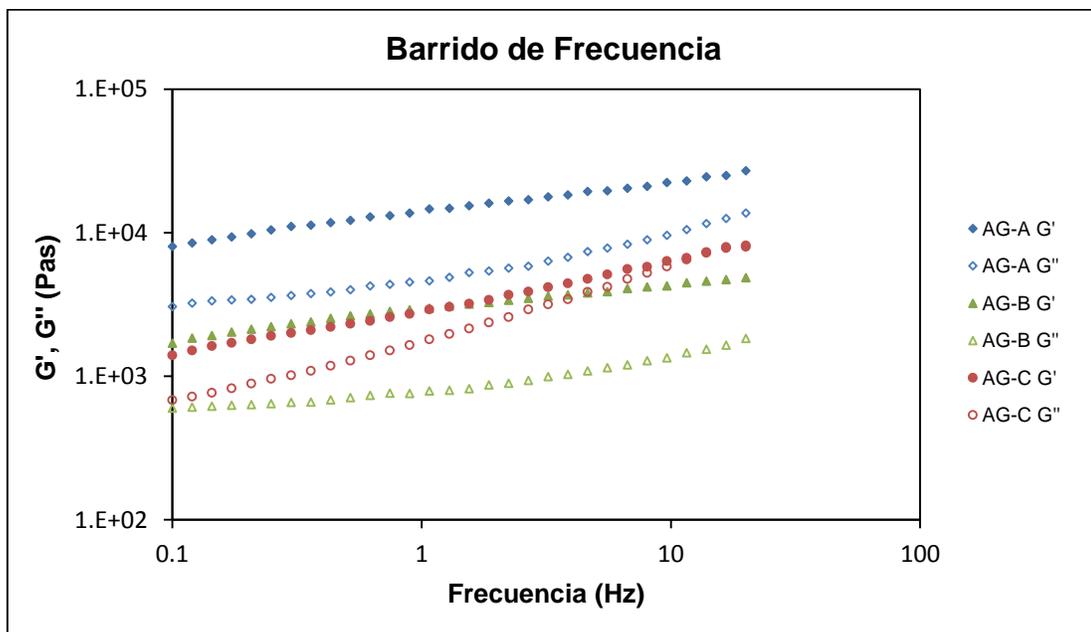
La  $\text{Tan } \delta$  para todos los análogos fue menor que 1, indicando que eran más de tipo sólido que líquido. Se puede observar que los valores de la  $\text{Tan } \delta$  aumentaron ligeramente cuando se aumentó el contenido de gomas, indicando que la adición de estas aumenta la componente viscosa y por consiguiente la viscoelasticidad del sistema (Torres et al., 2010) (**Figura 31–B**). La formulación AG-A presentó una  $\text{Tan } \delta$  menor que las formulaciones AG-B y AG-C. Las masas con pequeños valores de

**Tan  $\delta$**  están relacionadas con sistemas más rígidos y duros debido posiblemente a una mayor retención de agua y a una reducción del agua disponible para hidratar el almidón, mientras que altos valores están asociados a masas caracterizadas como húmedas y flojas (Crockett, 2011; Lamacchia, 2010).



**Figura 31.** Efecto de la adición de hidrocoloides en (A) el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y (B) tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ) de las formulaciones análogas del gluten obtenidos en la RVL (1 Hz de frecuencia, 25 °C). Los valores son los promedios de los triplicados.

La **Figura 32** muestra los espectros mecánicos de los análogos investigados. Para todas las muestras la respuesta fue típica de un gel débil, con módulos de almacenamiento ( $G'$ ) mayores que los módulos de pérdida ( $G''$ ) en el rango de frecuencias estudiadas, con un ligero incremento de ambos módulos con la frecuencia. Este comportamiento es típico de un sólido viscoelástico que presenta una contribución dominante de la componente elástica (Lamacchia et al., 2010).



**Figura 32.** Barrido de frecuencia de los análogos del gluten.

Se observaron diferencias en los espectros mecánicos dependiendo de la composición; el análogo AG-A presentó el mayor valor en la componente elástica ( $G'$ ) mientras que el análogo AG-B presentó el gel más resistente, indicado por una mayor separación entre los valores de  $G'$  y  $G''$  (Crockett et al., 2011). De este comportamiento se puede inferir que la combinación de goma xanthan y goma guar en formulaciones sin gluten aumenta tanto el módulo elástico como el viscoso, favoreciendo así las propiedades viscoelásticas de la mezcla; estos resultados coinciden con los estudios previos realizados por Demirkesen et al., (2010).

Tanto la goma xanthan como la guar interactúan con el almidón y el agua mediante puentes de hidrogeno formando agregados que resultan en la formación de una red compleja débilmente unida, aumentando la viscosidad de la mezcla a temperatura ambiente. Este comportamiento ayuda a mantener las burbujas de gas suspendidas y evita su coalescencia manteniendo el sistema homogéneo hasta la gelatinización del almidón permitiendo una estabilidad en las propiedades reológicas del sistema tras el calentamiento (Hager & Arendt, 2013; Lazaridou et al., 2007).

Los resultados obtenidos permiten seleccionar la formulación AG-A como óptima porque esta presentó altos valores de  $G'$  y bajos valores de  $\tan \delta$  y este comportamiento en productos sin gluten está asociado a mezclas más firmes y elásticas y a buena estructura en el producto final (Lamacchia et al., 2010; Rao et al., 2000).

Los ensayos cualitativos y reológicos realizados a las diferentes formulaciones de análogos del gluten permiten concluir que la adición de agentes estructurantes, como los hidrocoloides, no debe ser superior al 2% ya que cantidades mayores influyen desfavorablemente en las propiedades sensoriales del producto, aumentando la dureza y disminuyendo el volumen. Con estos ensayos es claro que para las harinas seleccionadas, la mejor combinación de gomas es la que incluye xanthan y guar por ofrecer una mezcla más consistente y con mayor estructura, gracias a que aumenta tanto el módulo elástico como el viscoso, favoreciendo así las propiedades viscoelásticas de la mezcla.

## **FORMULACIÓN DE LA MATERIA PRIMA LIBRE DE GLUTEN Y ENSAYO DE PROTOTIPO**

**4.5.5 Formulación de la materia prima y composición proximal en base seca:** luego de conocer las propiedades funcionales y el valor nutricional de todas las harinas y de haber evaluado su desempeño en conjunto con los agentes estructurantes mediante pruebas reológicas y de competencia panadera, se seleccionaron las harinas de lenteja germinada, quinua y ahuyama para formar la

multimezcla libre de gluten, por ser las que mejores resultados presentaron. La formulación de la materia prima y su composición proximal se presenta en las **Tablas 12 y 13**.

Si bien se sabe que la ausencia de gluten en estas harinas conlleva a problemas de calidad en el producto final, también se debe reconocer que su utilización como ingredientes alimentarios en la elaboración de productos panificados aumenta su valor nutricional. La adición de harina de leguminosas, por ejemplo, aumenta su calidad y cantidad proteica, gracias a que estas contienen altas cantidades de leucina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina, proporcionando perfiles de aminoácidos esenciales equilibrados cuando se consumen con cereales y otros alimentos ricos en aminoácidos sulfurados (Miñarro et al., 2012).

**Tabla 12.** Formulación de la materia prima libre de gluten.

INGREDIENTES		%	% en la formulación final
Multimezcla libre de gluten	Harina de lenteja germinada	60	89
	Harina de quinua	32	
	Harina de ahuyama	8	
Análogo del gluten	Harina de lenteja	75	11
	Albumina	14	
	Xanthan - Guar (60:40)	2	
	Harina de plátano	2	
	Aceite de girasol	6	
	Sal	1	

**Tabla 13.** Composición proximal en base seca de la materia prima libre de gluten.

HARINA	COMPONENTE (%)				
	Proteína	Extracto etéreo	Cenizas	Almidón	Humedad
Harina de Trigo	12,05	0,46	0,71	69,82	12,44
Materia prima libre de gluten	24,60	2,38	2,80	62,10	8,12

Por otro lado, las leguminosas contienen almidón resistente que puede utilizarse como fuente de fibra mejorando la apariencia, la textura y la sensación en boca de estos productos, además de los beneficios que se le han atribuido para la salud como la disminución del índice glicémico (León & Rosell, 2007). Otro punto a favor, en el caso específico de la harina de lenteja germinada, es su alto contenido de hierro y riboflavina en comparación con la harina de lenteja sin germinar, como se demostró en el Capítulo 3, por lo que se espera que su inclusión en la materia prima mejore el contenido de estos micronutrientes en el producto final.

Similar a las harinas de leguminosas, las harinas de granos andinos como la quinua se pueden añadir a los productos libres de gluten con el fin de mejorar su valor

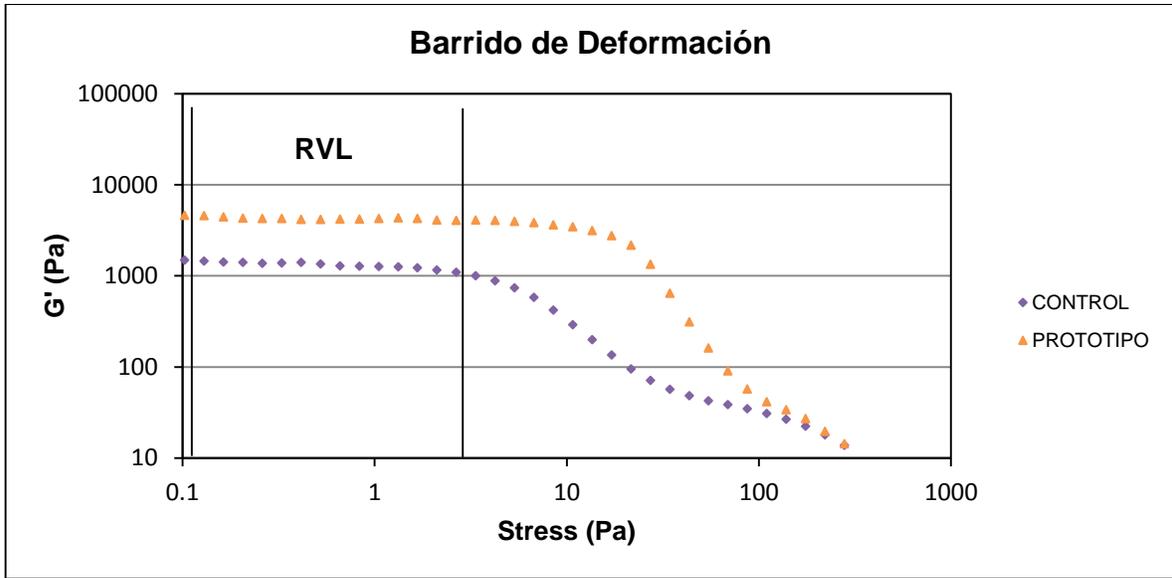
nutricional. La quinua presenta una cantidad importante de proteínas con buen perfil de aminoácidos, de los cuales ocho están considerados esenciales tanto para niños como para adultos, por lo que la importancia de las proteínas de la quinua radica más en su alto valor biológico que en su cantidad (FAO, 2013a).

La quinua también es considerada buena fuente de fibra dietética tanto soluble como insoluble. Repo-Carrasco y Serna (Repo-carrasco & Serna, 2011) reportaron que la fibra dietética en la quinua cruda varía entre 13,6 y 16,0 g por cada 100 g de peso seco. La mayoría de la fibra dietética era insoluble, entre 12,0 y 14,4 g, en comparación con el contenido de fibra soluble, entre 1,4 y 1,6 g por cada 100 g de peso en seco, lo que favorece el tránsito intestinal. Su fracción lipídica está compuesta principalmente por ácidos grasos poliinsaturados esenciales, siendo el ácido linoleico (omega 6) predominante (50,2%); con un contenido importante de tocoferoles (León & Rosell, 2007).

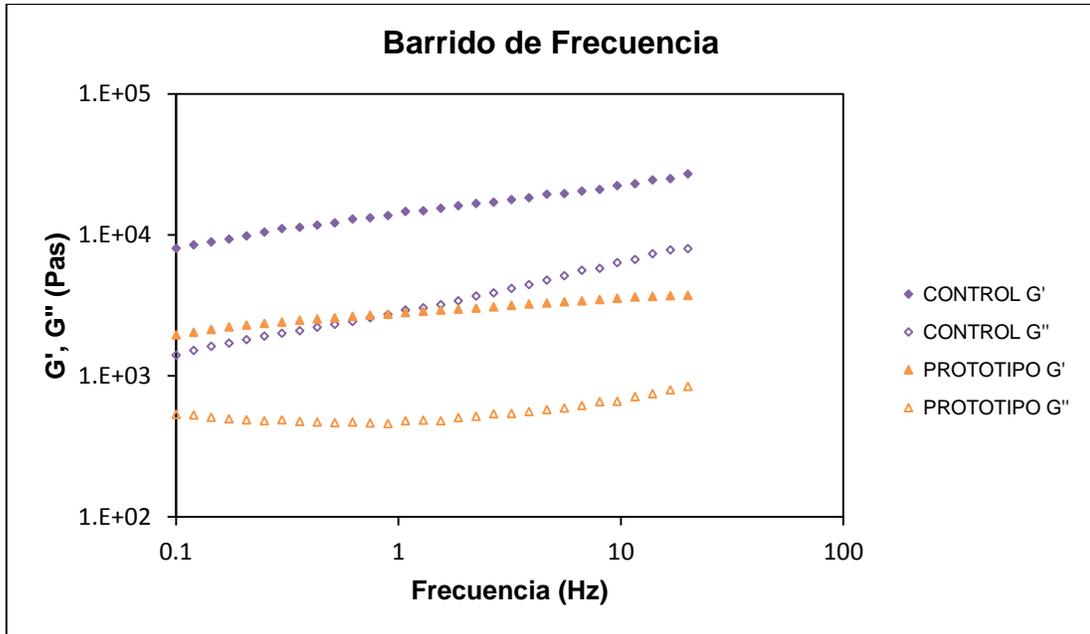
En cuanto a los micronutrientes, la quinua es buena fuente de hierro, magnesio, zinc, riboflavina y ácido fólico en comparación con otros granos y cumple con las recomendaciones relativas al consumo diario de vitaminas y minerales. Sin embargo, la quinua, al igual que todos los alimentos vegetales, contiene algunos componentes no nutritivos que pueden reducir el contenido y la absorción de las sustancias minerales (FAO, 2013a). Es importante mencionar que su inclusión también se debe a la alta capacidad de hinchamiento y capacidad emulsificante que mostró durante la caracterización funcional.

Por último, la harina de ahuyama presenta un contenido importante de carotenoides, vitamina C, E, tiamina, riboflavina, hierro, potasio, fósforo y magnesio que la hacen buena fuente de nutrientes, por lo que esta harina ha sido utilizada como suplemento nutricional (Rakcejeva et al., 2011). Todas estas propiedades se ven reflejadas en la composición proximal de la materia prima formulada (**Tabla 13**) que al ser comparada con la harina de trigo presenta mayor contenido de proteína, extracto etéreo y cenizas, lo que sugiere que su inclusión en la formulación de alimentos sin gluten podría mejorar su calidad nutricional.

**4.5.6 Propiedades reológicas de la mezcla:** mediante esta prueba se evaluó el comportamiento reológico de la materia prima respecto al control, en este caso harina de trigo y al igual que en la evaluación reológica del análogo del gluten, se utilizó un nivel de agua constante para permitir una comparación directa entre las muestras, se realizó el barrido de deformación para encontrar la RVL (**Figura 33**) y por último se realizaron los barridos de frecuencia para evaluar el comportamiento de la mezcla al ser hidratada (**Figura 34**). Ver **Anexo 4** (Tablas de datos y transformaciones).



**Figura 33.** Región viscoelástica lineal de la harina de trigo (control) y de la materia prima libre de gluten, obtenida a partir del barrido de deformación (1Hz de frecuencia a 25°C). Las curvas son promedios de duplicados para cada formulación.



**Figura 34.** Barrido de frecuencia de la harina de trigo (control) y de la materia prima libre de gluten.

Similar a la masa de trigo, la formulación libre de gluten fue dependiente del cizallamiento, aunque en menor medida que el control, demostrado por el aumento tanto del módulo elástico como del viscoso ( $G'$  y  $G''$  respectivamente) con el aumento de la cizalla. Se puede inferir que los valores de  $G'$  son mayores que los valores de  $G''$ , indicando un comportamiento viscoelástico típico que presenta una contribución dominante de la componente elástica, por lo tanto, los valores de **Tan  $\delta$**  para todas

las formulaciones de masa fueron inferiores a 1. Sin embargo, el control presentó valores superiores en ambos módulos, indicando que este tiene mejores propiedades viscoelásticas seguramente por la presencia de gluten.

Este comportamiento puede estar asociado a las diferencias entre las proteínas presentes en cada material como por ejemplo la solubilidad en agua, las diferencias en la estructura primaria y sus distribuciones de tamaño (Lamacchia et al., 2010). Otra posible causa puede ser la competencia entre las proteínas de las harinas sin gluten y los coadyuvantes incorporados como las gomas y la albumina por las moléculas de agua para hidratarse, lo que puede afectar el comportamiento de dichas proteínas causando el debilitamiento de las masas, además se supone que la adición de leguminosas implica un incremento en el contenido de enzimas proteolíticas, lo que también debilitaría las masas (León & Rosell, 2007).

Aunque las condiciones de poca deformación utilizadas en estas mediciones difieren de las condiciones experimentadas por la masa durante su procesamiento, estas permiten analizar la matriz sin destruir la estructura inherente y caracterizar los componentes elásticos y viscosos independientemente, por lo que resultan de gran valor en el seguimiento de la consistencia y los cambios estructurales en la masa durante la elaboración del pan, permitiendo evaluar la influencia y la acción de los componentes de la harina y los aditivos, tales como los hidrocoloides, en sistemas modelo y así transferir los resultados al proceso tecnológico, ya que los parámetros mecánicos dinámicos son muy sensibles a los cambios en el tipo de polímero y concentración, así como al contenido de agua (Lazaridou et al., 2007; Weipert, 1990).

**4.5.7 Elaboración de prototipo:** la obtención del prototipo final se hizo utilizando la formulación presentada en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Formulación del prototipo libre de gluten.

INGREDIENTES	FORMULACIÓN			
	CONTROL		PROTOTIPO	
	%	g	%	g
Harina de trigo	100	69,96	-	-
Premezcla de harinas sin gluten	-	-	89,00	67,64
Análogo del gluten	-	-	11,00	8,36
Agua	55,50	38,83	151,32	115,00
Solución Azúcar-Sal	10,95	7,66	15,25	7,66
Levadura fresca	2,00	1,40	1,84	1,40
Aceite de girasol	3,43	2,40	3,16	2,40

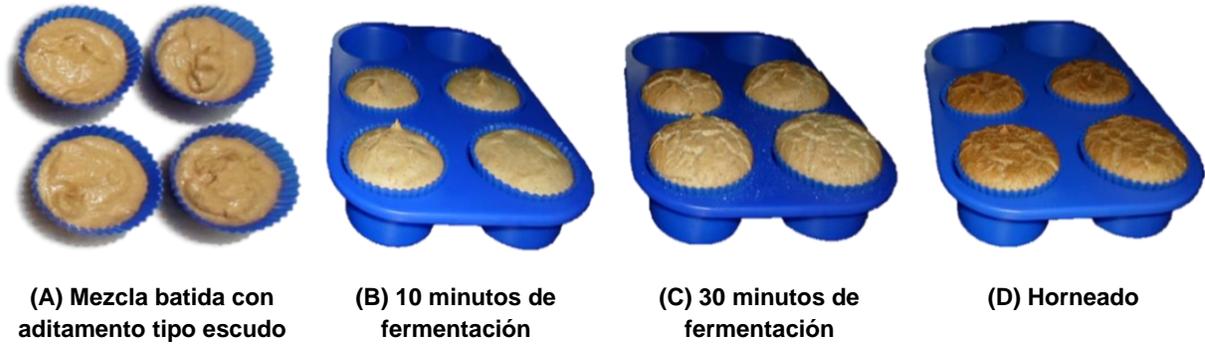
Se realizó el ajuste de proteína y humedad de la multimezcla libre de gluten con base al 14% por ser la humedad máxima de la harina de trigo utilizada como referencia. Con el fin de mejorar el volumen específico y la dureza, se cambió el método de mezclado aplicado en los ensayos de preformulación por el método de incorporación de aire por batido por lo que al final no se obtuvo una masa compacta sino una mezcla viscosa. Para permitir la comparación con el control, los panes fueron hechos en moldes para muffins (**Figura 35–A**).

Nuevamente se requirió una mayor adición de agua, 151% sobre el 100% de harina, para obtener una adecuada hidratación de todos los materiales incorporados y facilitar su mezcla. En una masa libre de gluten, el nivel de hidratación es mayor comparado con una masa común, principalmente porque la incorporación de gomas en la formulación conlleva a un aumento en la retención de humedad, que al mismo tiempo, depende de la estructura química de las gomas utilizadas y de sus interacciones con el resto de ingredientes (Gómez et al., 2007).

En las formulaciones sin gluten existe una red de polímeros tridimensional en donde interactúan moléculas de proteínas e hidrocoloides que atrapa las moléculas de agua y los gránulos de almidón. Larrosa et al., (2013), sugieren que un alto contenido de agua puede influir en esta red disminuyendo las propiedades viscoelásticas de la mezcla y por consiguiente la calidad final del pan, ya que las moléculas de agua pueden actuar como un lubricante provocando la relajación y la movilidad de los componentes funcionales de la masa.

Por otra parte, Schoenlechner et al., (2010), evaluaron el efecto del agua en la calidad de los panes libres de gluten a base de amaranto, encontrando que su contenido era un factor determinante en la estructura final, particularmente en atributos como la elasticidad, firmeza y porosidad de la miga. Ellos concluyeron que altos niveles de agua disminuyeron significativamente la dureza de la miga y aumentaron ligeramente la elasticidad, lo que conllevó a un aumento significativo en el volumen específico del pan. Como se observa, los resultados encontrados en diferentes estudios son contradictorios y por lo tanto el efecto del agua puede depender de los materiales utilizados.

Un factor crítico que afectó negativamente la apariencia final del prototipo fue la fermentación. En la **Figura 35–B, C y D** se puede observar que a mayor tiempo de fermentación mayor era el daño en la corteza, mostrando un aspecto quebradizo durante la fermentación y después del horneado, aunque también se puede observar un aumento de volumen considerable, muy deseado en estos productos, indicando que el batido es una buena opción para mejorar el volumen del pan.



**Figura 35.** Prototipo libre de gluten Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Estabilidad de medicamentos, cosméticos y alimentos de la Universidad de Antioquia.

En la **Figura 36**, se muestran las imágenes digitales de las cortezas del pan control y el prototipo libre de gluten y sus cortes transversales. Aun se siguen apreciando diferencias notables entre el prototipo propuesto y el pan de trigo, seguramente debido a las diferencias en la composición de las harinas sin gluten. El prototipo presenta menor volumen, engrosamiento de los alveolos, un olor característico a leguminosa, sin ser desagradable, un color más oscuro en la corteza y en la miga, aunque estas últimas se perciben húmedas y suaves.



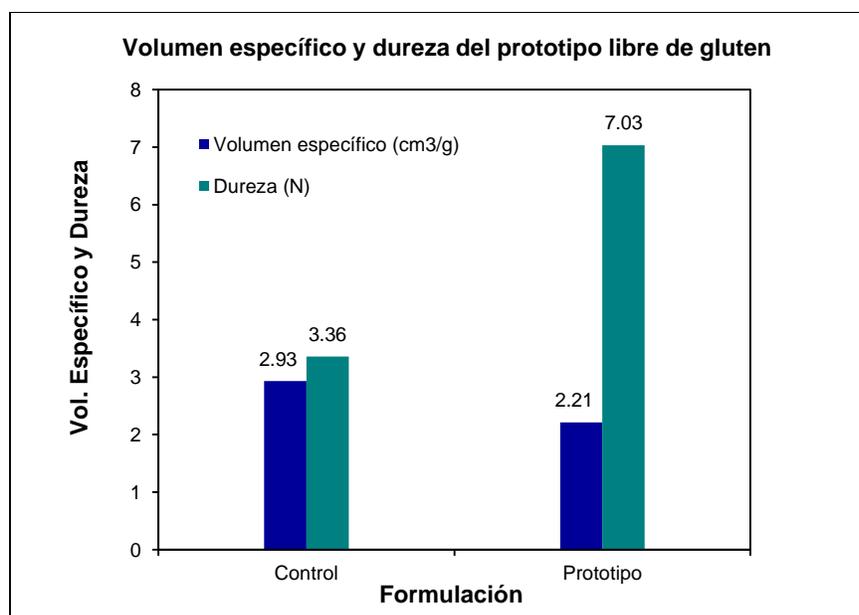
**Figura 36.** Cortezas de los panes y sus cortes transversales: (A) Control de trigo y (B) prototipo libre de gluten. Figura obtenida por el autor del trabajo de investigación en el laboratorio de Estabilidad de medicamentos, cosméticos y alimentos de la Universidad de Antioquia.

El menor volumen del prototipo respecto al control puede deberse a la incapacidad de los alvéolos de la miga para retener el gas producido durante la fermentación, además se debe considerar el efecto que genera la incorporación de harina de

lenteja germinada. Durante la germinación de las leguminosas se producen cambios en los componentes de la semilla, tales como la disminución de cenizas, almidón y azúcares no reductores, y el incremento de azúcares reductores, de la capacidad de hidratación y de la actividad  $\alpha$ -amilásica. Estos cambios son los principales responsables del deterioro de las propiedades panificadoras de las harinas (León & Rosell, 2007).

Sin embargo, respecto a los panificados modelo, obtenidos en los ensayos de preformulación se logró una mejora significativa, en estos el mayor volumen fue 1,85  $\text{cm}^3/\text{g}$  y la menor dureza 30,08 N, en el prototipo final el volumen fue de 2,21  $\text{cm}^3/\text{g}$  y la dureza de 7,03 N (**Figura 37**), estando el prototipo final más cercano a los parámetros arrojados por el control de trigo: volumen 2,93  $\text{cm}^3/\text{g}$  y dureza 3,36 N. Matos & Rosell (2012), en su trabajo sobre la relación entre los parámetros instrumentales y las características sensoriales de los panes sin gluten, evaluaron 11 formulaciones y reportaron los valores de volumen específico entre 1,59 – 2,71  $\text{cm}^3/\text{g}$  y de dureza entre 8,47 y 80,20 N encontrándose la mayoría entre 10,33 y 14,60 N, lo que permite afirmar que se obtuvieron buenos resultados en ambos parámetros para el prototipo elaborado.

La reducción de la dureza y el aumento del volumen pueden estar asociados al contenido de agua y al efecto que produjo el batido en la mezcla, permitiendo obtener un pan más aireado, ligero y esponjoso. También la presencia de las gomas xanthan y guar y la albumina pudo conducir a la obtención de panes con mayor volumen (Gómez et al., 2007).



**Figura 37.** Volumen específico y dureza del control de trigo y del prototipo libre de gluten.

**4.5.8 Concentración de nutrientes:** diferentes estudios han demostrado que una dieta libre de gluten puede mejorar los síntomas de la enfermedad celíaca y otras enteropatías asociadas. Sin embargo, el cumplimiento de dicha dieta tiene un impacto en la calidad de vida de las personas que se adhieren a ella, y posiblemente, en su estado nutricional. Los productos sin gluten generalmente tienen niveles bajos de micronutrientes (Myszkowska et al., 2010), por lo que uno de los objetivos en este trabajo fue mejorar su valor nutricional, especialmente en el contenido de riboflavina (Rbf), hierro (Fe) y zinc (Zn).

La determinación de estos minerales se hizo en la materia prima mientras que la Rbf se cuantificó tanto en la materia prima como en el prototipo final, por ser este el micronutriente más sensible al proceso de elaboración del pan. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Contenido de micronutrientes en la materia prima y el prototipo libre de gluten.

PRODUCTO	Rbf (mg/100g)	Fe (mg/100g)	Zn (mg/100g)
Materia prima libre de gluten – MPLG	0,11	0,13	0,61
Prototipo elaborado con MPLG	0,09	No determinado	

Acorde a estos resultados, se puede observar que los tratamientos térmicos a los que es sometido el pan durante su procesamiento afectan su composición, produciendo una disminución en el contenido de Rbf. Sin embargo, una porción de 100 gramos de un producto tipo pan elaborado con la MPLG, aporta 5,3% del contenido diario de Rbf y el 8,6% y el 12,2% de las necesidades diarias de Fe y Zn respectivamente; esto acorde a los valores diarios de referencia de nutrientes según la Resolución 333 (2011), la cual establece que el consumo de Rbf debe ser de 1,7 mg, el de Fe entre 1,5 y 2,2 mg y el de Zn entre 5 y 10 mg.

Es importante considerar que comparando el contenido de micronutrientes de esta materia prima con la fortificación por adición de vitaminas y minerales en la harina de trigo, como está normalizado en el Decreto 1944 (1996) en el que se reglamenta la adición de 4 mg/Kg de riboflavina y 44 mg/Kg de hierro; la materia prima aportaría cantidades mayores de estos nutrientes a las personas que por diferentes razones no consumen productos con gluten. Sin embargo, se debe resaltar que debido a las deficiencias nutricionales y a los problemas potenciales de salud causados por la enfermedad celíaca, es esencial para los pacientes llevar una dieta balanceada y preferiblemente supervisada por un nutricionista.

## 4.6 Conclusiones

- La combinación de gomas xanthan y guar:
  - Favorece las propiedades viscoelásticas de la mezcla seleccionada.
  - Aumenta el volumen específico.
  - Disminuye la dureza.
- Las muestras analizadas presentaron niveles de gluten inferiores a 13 ppm, lo que permite afirmar que son materiales “libres de gluten” según lo reglamentado en la norma del CODEX STAN 118 – 1979: Relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten.
- La MPLG presentó un comportamiento tecnológico promisorio y puede considerarse como un ingrediente con alto valor nutricional por su composición:

MPLG	%				mg/ 100g		
	Proteína	Extracto etéreo	Cenizas	Almidón	Rbf	Fe	Zn
	24,60	2,38	2,80	62,10	0,11	0,13	0,61

## CONCLUSIONES GENERALES

- La lenteja germinada como grano y procesada como harina, es una materia prima mejorada nutricionalmente, con viabilidad en su obtención y procesamiento.
- La determinación de la composición nutricional y funcionalidad tecnológica de las harinas libres de gluten permite establecer su potencial para ser incorporadas como materias primas innovadoras en productos panificados y afines.
- La incorporación de hidrocoloides mejora las características viscoelásticas de las mezclas libres de gluten, haciéndolas más consistentes y con mayor estructura, propiedades que se reflejan en la calidad del producto final; ya que disminuye la dureza, aumenta el volumen específico y favorece la formación de una miga homogénea.
- La materia prima libre de gluten formulada presenta un comportamiento tecnológico promisorio reflejado en las aptitudes panaderas que mostró durante el proceso, demostrando con esto que no solo el trigo ofrece buenas propiedades en la panificación, constituyendo además una alternativa para la elaboración de productos para regímenes especiales y alimentos con valor nutricional agregado.

## PERSPECTIVAS

Este trabajo hace parte de una nueva línea de investigación, por lo tanto se continuará con su desarrollo y se agotaran esfuerzos para vincular a la industria, a profesionales y a personas con enfermedades asociadas a participar en el desarrollo del tema y en la toma de conciencia en lo referente a esta necesidad; ya que, aunque el tema en Colombia no es considerado un problema nacional como en otros países, cada día toma más fuerza y son más las personas que buscan orientación para adherirse a una dieta sin gluten.

Como estrategia de divulgación, está en curso la redacción de dos artículos: uno que incluye la caracterización de harinas alternativas y su aplicación en productos horneados libres de gluten y otro referente a la germinación como estrategia de mejoramiento nutricional; además surgen otros temas para estudios posteriores como:

- Evaluar el efecto de otros ingredientes y aditivos, como agua, grasas, almidones, fibras y emulsificantes, en las propiedades reológicas de las masas y en las características del pan libre de gluten.
- Utilización de masas fermentadas en la elaboración de panes libres de gluten.
- Analizar la percepción sensorial del prototipo libre de gluten obtenido con un grupo de personas celiacas y no celiacas.
- Evaluar el índice glicémico de la materia prima libre de gluten y su impacto en la salud.
- Evaluar el efecto de la germinación sobre los factores antinutricionales presentes en las leguminosas.
- Evaluar el impacto de la germinación en otros micronutrientes, especialmente las vitaminas pertenecientes al complejo B, en leguminosas.

## BIBLIOGRAFIA

- AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (1994).
- AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (1995).  
St. Paul, MN, USA.
- AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (2000).
- Acevedo, B. a., Avanza, M. V., Cháves, M. G., & Ronda, F. (2013). Gelation, thermal and pasting properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), dolichos bean (*Dolichos lablab* L.) and jack bean (*Canavalia ensiformis*) flours. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 65–71. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.014
- Ács, E., Kovacs, Z., & Matuz, J. (1996a). Bread from corn starch for dietetic purposes. I. Structure formation. *Cereal Research Communications*, 24(4), 441–449.
- Ács, E., Kovacs, Z., & Matuz, J. (1996b). Bread from corn starch for dietetic purposes. II. Formation of the visual and technological properties. *Cereal Research Communications*, 24(4), 451–459.
- Adams, G. G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Kok, S., Gray, D. a., ... Harding, S. E. (2011). The hypoglycaemic effect of pumpkins as anti-diabetic and functional medicines. *Food Research International*, 44(4), 862–867. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.016
- Aguilar Valenzuela, J., Esparza Rivera, J. R., Meza Velazquez, J. A., Candelas Cadillo, M. G., Aguilera Ortiz, M., & Ramírez Baca, P. (2011). Efecto de la harina de lenteja (*Lens culinaris*) sobre las propiedades reológicas y de panificación de la harina de trigo. *Ciencia@UAQ*, 4(2), 4–9.
- Aguilera, Y., Esteban, R. M., Benítez, V., Mollá, E., & Martín-Cabrejas, M. a. (2009). Starch, functional properties, and microstructural characteristics in chickpea and lentil as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10682–8. doi:10.1021/jf902042r
- Ahmed, I., Singh, D., Abas, A., & Singh, B. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 278–284.
- Ahmed, J., Al-Foudari, M., Al-Salman, F., & Almusallam, A. S. (2014). Effect of particle size and temperature on rheological, thermal, and structural properties of pumpkin flour dispersion. *Journal of Food Engineering*, 124, 43–53. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.09.030

- Ahn, H. J., Kim, J. H., & Ng, P. K. W. (2005). Functional and Thermal Properties of Wheat , Barley , and Soy Flours and Their Blends Treated with a Microbial Transglutaminase. *Journal of food science*, 70(6), 380–386.
- Akobeng, a K., & Thomas, a G. (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(11), 1044–52. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03669.x
- Akubor, P. I., Adamolekun, Flora, O., Oba, C. a., Obari, H., & Abudu, I. O. (2003). Chemical composition and functional properties of cowpea and plantain flour blends for cookie production. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1–9. doi:10.1023/B:QUAL.0000041160.25384.f6
- Ángeles Cornejo-Villegas, M. D. L., Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Del Real-López, A., Luz Zambrano-Zaragoza, M. D. La, Martínez-Vega, V., & Rodríguez-García, M. E. (2013). Physicochemical, morphological, and pasting properties of nixtamalized flours from quality protein maize and its particle distribution. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 81–87. doi:10.1016/j.lwt.2013.01.023
- Anton, A. A., & Artfield, S. D. (2008). Hydrocolloids in gluten-free breads: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 59(1), 11–23. AOAC. Associaton of Official Analytical Chemists (1997).
- Arendt, E. k, & Dal Bello, F. (2008). *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (1a. Ed.). San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Arranz, E., Montalvillo, E., & Garrote, J. (2013). Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 123–149). Barcelona, España: OmniaScience.
- Badui, S. (1996). *Química de los Alimentos*. México, D.F.: Alhambra Mexicana.
- Bárceñas, M. E., & Rosell, C. M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1037–1043. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.01.005
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4ta. Ed.). Berlin, Alemania: Springer.
- Benítez, V., Cantera, S., Aguilera, Y., Mollá, E., Esteban, R. M., Díaz, M. F., & Martín-Cabrejas, M. a. (2013). Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food Research International*, 50(1), 64–69. doi:10.1016/j.foodres.2012.09.044
- Bezerra, C. V., Amante, E. R., de Oliveira, D. C., Rodrigues, A. M. C., & da Silva, L. H. M. (2013). Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed –

Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch. *Industrial Crops and Products*, 41, 241–249. doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.035

- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. doi:10.1016/j.foodres.2009.07.021
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.003
- Bugyi, Z., Török, K., Hajas, L., Adonyi, Z., Popping, B., & Tömösközi, S. (2013). Comparative study of commercially available gluten ELISA kits using an incurred reference material. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods (QAS)*, 5(March), 79–87. doi:10.3920/QAS2012.0174
- Cabrera-Chávez, F., & Calderon de la Barca, A. M. (2009). Bovine milk intolerance in celiac disease is related to IgA reactivity to alpha- and beta-caseins. *Nutrition*, 25(6), 715–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268534>
- Calderón de la Barca, A. M., & Cabrera-Chávez, F. (2013). No solo el gluten, sino otras proteínas de los alimentos, podrían afectar algunos enfermos celíacos. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 89–101). Barcelona, España: OmniaScience.
- Campbell, L., Raikos, V., & Euston, S. R. (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins - Review. *Nahrung/Food*, 47(6), 369–376.
- Canadá Pulse. (2013). Pulse Canadá. Retrieved July 16, 2013, from <http://www.pulsecanada.com>
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102. doi:10.1016/j.lwt.2011.07.012
- Cappa, C., Lucisano, M., & Mariotti, M. (2013). Rheological properties of gels obtained from gluten-free raw materials during a short term aging. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 464–472. doi:10.1016/j.lwt.2013.02.027
- Casanova, H. F., & Cardona, S. C. (2004). Emulsiones o/w estabilizadas con caseinato de sodio: efecto de los iones calcio, concentración de proteína y temperatura. *Vitae*, 11(1), 13–19.

- CE, C. de la U. Reglamento (CE) N° 41/2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (2009).
- ChemSpider. (2013). ChemSpider. *HPMC*. Retrieved November 20, 2013, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21241863>
- Chung, H.-J., Cho, D.-W., Park, J.-D., Kweon, D.-K., & Lim, S.-T. (2012). In vitro starch digestibility and pasting properties of germinated brown rice after hydrothermal treatments. *Journal of Cereal Science*, *56*(2), 451–456. doi:10.1016/j.jcs.2012.03.010
- CODEX. CODEX ALIMENTARIUS. Norma para la harina de trigo - CODEX STAN 152 (1985).
- CODEX. CODEX ALIMENTARIUS. Norma relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten - CODEX STAN 118 (2008).
- Comino, I., Real, A., Moreno, M. L., Cebolla, A., & Sousa, C. (2013). Detección de la fracción inmunotóxica del gluten: Aplicaciones en seguridad alimentaria. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 433–445). Barcelona, España: OmniaScience.
- Crockett, R., le, P., & Vodovotz, Y. (2011). How do xanthan and hydroxypropyl methylcellulose individually affect the physicochemical properties in a model gluten-free dough? *Journal of food science*, *76*(3), E274–82. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02088.x
- Crowe, S. E. (2010). Celiac Disease. In *Nutrition and Gastrointestinal Disease*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.
- De Escalada Pla, M. F., Ponce, N. M., Stortz, C. a., Gerschenson, L. N., & Rojas, A. M. (2007). Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). *LWT - Food Science and Technology*, *40*(7), 1176–1185. doi:10.1016/j.lwt.2006.08.006
- Decreto 1944, M. DECRETO 1944. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control (1994). Colombia.
- Delegge, M. H. (2010). *Nutrition and Gastrointestinal Disease* (1a. Ed.). Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.

- Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2010). Rheological properties of gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 295–303. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.08.004
- Devi, K., & Haripriya, S. (2012). Pasting Behaviors of Starch and Protein in Soy Flour-Enriched Composite Flours on Quality of Biscuits. *Journal of Food Processing and Preservation*, (Agarwal 1990), no–no. doi:10.1111/j.1745-4549.2012.00752.x
- Du, S., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 308–313. doi:10.1016/j.lwt.2013.06.001
- Dyner, L., Drago, S., Piñeiro, A., Sánchez, H., & González, R. (2007). Composición y aporte potencial de hierro, calcio y zinc de panes y fideos elaborados con harinas de trigo y amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(1), 69–78.
- Ebah. (2013). ebah. *Curso de Engenharia de Alimentos*. Retrieved November 20, 2013, from <http://www.ebah.com.br/engenharia-alimentos>
- Ecogastropediatria. (2013). Ecogastropediatria. Retrieved December 11, 2013, from [http://www.ecogastropediatria.com/wp/?page\\_id=93](http://www.ecogastropediatria.com/wp/?page_id=93)
- Elizalde, A. de D., Porrilla, Y., & Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(1).
- Elkhalifa, A. E. O., & Bernhardt, R. (2010). Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry*, 121(2), 387–392. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.041
- Esquer Munguía, E. J. (2010). *Cuantificación de gluten en alimentos para enfermos celíacos: condiciones, limitaciones y alternativas*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.
- EVM. (2002). Food Standards agency: Expert group on vitamins and minerals. *Revised review of riboflavin*. Retrieved October 20, 2013, from <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/reviewriboflavin>.
- Fagbemi, T. N. (1999). Effect of blanching and ripening on functional properties of plantain (*Musa aab*) flour. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 54(3), 261–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716407>
- FAO. (2013a). FAO. *Año Internacional de la Quinoa 2013. Valor nutricional*. Retrieved December 11, 2013, from <http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/>

- FAO. (2013b). FAO. *Tabla de composición de alimentos*. Retrieved December 11, 2013, from <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos/busqueda/?clave=A383>
- FDA. (2012). FDA. *Looks for Answers on Arsenic in Rice*. Retrieved September 08, 2013, from <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM320040.pdf>
- FDA. (2013a). FDA. *What Is Gluten-Free? FDA Has an Answer*. Retrieved September 02, 2013, from <http://www.fda.gov/downloads/forconsumers/consumerupdates/ucm363276.pdf>
- FDA. (2013b). FDA. *Explores Impact of Arsenic in Rice*. Retrieved October 03, 2013, from <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM367418.pdf>
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry* (3ra. Ed.). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Food Business News. (2012). *The gluten-free quandary*. Retrieved July 16, 2013, from [www.nxtbook.com/sosland/fbn/2012\\_01\\_17/index.php?startid=0#/243/3](http://www.nxtbook.com/sosland/fbn/2012_01_17/index.php?startid=0#/243/3)
- Gallagher, E. (2009). *Gluten-Free Food Science and Technology* (1a. Ed.). Teagasc, Dublin, Ireland: Wiley - Blackwell Publishing Ltd.
- Gallagher, E., Gormley, T. ., & Arendt, E. . (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 143–152. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.012
- Gambus, H., Sikora, M., & Ziobro, R. (2007). The effect of composition of hydrocolloids on properties of gluten-free bread. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 6(3), 61–74.
- Gaonkar, A. G., & McPherson, A. (2006). *Ingredient interactions. Effects on Food Quality* (2da. Ed.). Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2006). Effect of germination and dehulling on functional properties of legume flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1189–1195. doi:10.1002/jsfa
- Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1292–1299. doi:10.1016/j.lwt.2006.08.002

- Gil Ruiz, L. M. (2011a). *Obtención y caracterización de harinas a partir de semillas germinadas mediante un proceso tecnológico*. Universidad de Antioquia.
- Gil Ruiz, L. M. (2011b). Evento: III Convención Internacional Alimentación Saludable para la Comunidad y el Turismo. In *Evaluación del contenido de riboflavina con método HPLC en granos germinados y en harina de lenteja (Lens esculenta)*. La Habana, Cuba.
- Giménez, M., & Barro, F. (2013). Variedades de Trigo Aptas para Celíacos. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. (pp. 463–477). Barcelona, España: OmniaScience.
- Gluten-Free Diet. (2012). *Gluten-Free Product Consumer Survey*. Retrieved July 17, 2013, from <http://glutenfreediet.ca/> Autor Shelley Case
- Gobbetti, M., & Gänzle, M. (2013). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. New York, USA: Springer.
- Gomez, J. C., Selvaggio, G. S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., ... Bai, J. C. (2001). Prevalence of celiac disease in argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *American Journal of Gastroenterology*, 96(9). Retrieved from (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002927001026867>)
- Gómez, M., Ronda, F., Caballero, P. a., Blanco, C. a., & Rosell, C. M. (2007). Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 167–173. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.03.012
- González, J. M., García, E., Fernández, J. L., Gago, L., & Benito, J. (2007). *Madri+d. Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos*. Retrieved September 06, 2011, from [http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt9\\_deteccion\\_gluten\\_alimentos.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt9_deteccion_gluten_alimentos.pdf)
- Goyoaga Jorba, C. (2005). *Estudio de factores no nutritivos en “Vicia Faba I.”: Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo*. Universidad complutense de Madrid.
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2003). *Food composition data. Production, management and use* (2da. Ed.). Roma, Italia: FAO Publishing Management Service.
- GTC. Guía Técnica Colombiana (2012). Colombia.

- Guiné, R. P. F., Pinho, S., & Barroca, M. J. (2011). Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 422–428. doi:10.1016/j.fbp.2010.09.001
- Gujral, H. S., Guardiola, I., Carbonell, J. V., & Rosell, C. (2003). Effect of Cyclodextrinase on Dough Rheology and Bread Quality from Rice Flour. *J. Agric. Food Chem*, 51, 3814–3818.
- Guzmán, C. (2008). *Evaluación y aplicación de técnicas para estabilizar la riboflavina en preparaciones farmacéuticas*. Universidad de Antioquia.
- Hager, A.-S., & Arendt, E. K. (2013). Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 195–203. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.12.021
- Hager, A.-S., Wolter, A., Czerny, M., Bez, J., Zannini, E., Arendt, E. K., & Czerny, M. (2012). Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *European Food Research and Technology*, 235(2), 333–344. doi:10.1007/s00217-012-1763-2
- Hasjim, J., Li, E., & Dhital, S. (2013). Milling of rice grains: effects of starch/flour structures on gelatinization and pasting properties. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 682–90. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.023
- Henriques, F., Guiné, R., & Barroca, M. J. (2011). Chemical properties of pumpkin dried by different methods. *Livro de resumos do 7th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*.
- Heredia Sandoval, N. G. (2012). *Transpeptidación de proteínas de trigo durante el procesamiento de pan reducido en gluten para enfermos celíacos*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo – CIAD.
- Hodge, L., Swain, A., & Faulkner-Hogg, K. (2009). Food allergy and intolerance. *Australian family physician*, 38(9), 705–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957451>
- Hui, Y. H. (2006). *Bakery Products: Science and Technology* (1a. Ed.). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Juhász, R., Gergely, S., Gelencsér, T., & Salgó, A. (2005). Relationship Between NIR Spectra and RVA Parameters During Wheat Germination. *Cereal Chemistry Journal*, 82(5), 488–493. doi:10.1094/CC-82-0488

- Kárpáti, S. (2012). Dermatitis herpetiformis. *Clinics in dermatology*, 30(1), 56–9. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.03.010
- Kaur, M., Sandhu, K. S., & Lim, S.-T. (2010). Microstructure, physicochemical properties and in vitro digestibility of starches from different Indian lentil (*Lens culinaris*) cultivars. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 349–355. doi:10.1016/j.carbpol.2009.08.017
- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 59–68. doi:10.1016/j.lwt.2012.02.028
- Kaushik, G., Satya, S., & Naik, S. N. (2010). Effect of domestic processing techniques on the nutritional quality of the soybean. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 39–46. doi:10.1007/s12349-009-0079-7
- Kigel, J., & Galili, G. (1995). *Seed Development and Germination*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Kohajdová, Z., & Karovičová, J. (2008). Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers*, 63(1), 26–38. doi:10.2478/s11696-008-0085-0
- Krupa-Kozak, U., Troszyńska, A., Bączek, N., & Soral-Śmietana, M. (2011). Effect of organic calcium supplements on the technological characteristic and sensory properties of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 232(3), 497–508. doi:10.1007/s00217-010-1421-5
- Kuhn, K. R., & Cunha, R. L. (2012). Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 449–457. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.01.016
- Kulp, K., & Ponte, J. G. J. (2000). *Handbook of Cereal Science and Technology* (2a. Ed.). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Lajolo, F., & Wenzel, E. (2002). *Temas En Tecnología De Alimentos - Volumen 2*. Alfaomega, IPN, CYTED.
- Lamacchia, C., Chillo, S., Lamparelli, S., Suriano, N., La Notte, E., & Del Nobile, M. a. (2010). Amaranth, quinoa and oat doughs: Mechanical and rheological behaviour, polymeric protein size distribution and extractability. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 97–106. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.07.001

- Larrosa, V., Lorenzo, G., Zaritzky, N., & Califano, A. (2013). Optimization of rheological properties of gluten-free pasta dough using mixture design. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 520–526. doi:10.1016/j.jcs.2013.03.003
- Laureati, M., Giussani, B., & Pagliarini, E. (2012). Sensory and hedonic perception of gluten-free bread: Comparison between celiac and non-celiac subjects. *Food Research International*, 46(1), 326–333. doi:10.1016/j.foodres.2011.12.020
- Lazaridou, a., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1033–1047. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032
- León, A. E., & Molina-Rosell, C. (2007). *De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica* (1a. Ed.). Córdoba, Argentina.
- Lester, D. R. (2008). Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant methods*, 4, 26. doi:10.1186/1746-4811-4-26
- Li, E., Dhital, S., & Hasjim, J. (2013). Effects of grain milling on starch structures and flour / starch properties. *Starch Journal*, 00, 1–13. doi:10.1002/star.201200224
- Lim, S. H., Choi, J. S., & Park, E. Y. (2001). Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers , *Ashbya gossypii* , *Bacillus subtilis* , and *Candida famate* : An Overview. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 75–88.
- Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, H., Jäger, R., Hlebeina, T., Markolin, G., & Gössler, W. (1997). Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 50(3), 223–37.
- Lutz, E., Wieser, H., & Koehler, P. (2012). Identification of disulfide bonds in wheat gluten proteins by means of mass spectrometry/electron transfer dissociation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(14), 3708–16. doi:10.1021/jf204973u
- Ma, Z., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S. O., Monpetit, D., & Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Research International*, 44(8), 2534–2544. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.017
- Maneemegalai, S., & Nandakumar, S. (2011). Biochemical studies on the germinated seeds of *vigna radiata* (L.) R. Wilczek, *Vigna mungo* (L.) Hepper and *Pennisetum typhoides* (Burm f.) Stapf and C.E. Hubb. *International Journal of Agricultural Research*, 6(7), 601–606.

- Marco, C., & Rosell, C. M. (2008). Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1205–1213. doi:10.1007/s00217-008-0838-6
- Mastromatteo, M., Danza, A., Guida, M., & Del Nobile, M. a. (2012). Formulation optimisation of vegetable flour-loaded functional bread Part I: screening of vegetable flours and structuring agents. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1313–1320. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02975.x
- Matos, M. E., & Rosell, C. M. (2012). Relationship between instrumental parameters and sensory characteristics in gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 235(1), 107–117. doi:10.1007/s00217-012-1736-5
- Megat Rusydi, M. R., Noraliza, C. W., Azrina, A., & Zulkhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, 18, 705–713.
- Melgarejo, L. M. (2010). *Experimentos en fisiología vegetal* (1ra. Ed.). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/cgi/export/8545/#sthash.E3Kp9E0r.dpuf>
- Mena, M. C., Lombardía, M., Hernando, A., Méndez, E., & Albar, J. P. (2012). Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta*, 91, 33–40. doi:10.1016/j.talanta.2011.12.073
- Miceli, A., & Miceli, C. (2012). Effect of thermal treatments on vitality and physical characteristics of bean, chickpea and lentil. *Journal of Stored Products Research*, 51, 86–91. doi:10.1016/j.jspr.2012.08.001
- Milde, L. B., Ramallo, L. a., & Puppo, M. C. (2010). Gluten-free Bread Based on Tapioca Starch: Texture and Sensory Studies. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 888–896. doi:10.1007/s11947-010-0381-x
- Mínguez Díez, J. (2013). *Caracterización de la harina de teff para su uso en panificación*. Universidad de Valladolid.
- Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., & Capellas, M. (2012). Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 476–481. doi:10.1016/j.jcs.2012.04.012
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110–121. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.11.005

- Mohammadi, M., Sadeghnia, N., Azizi, M.-H., Neyestani, T.-R., & Mortazavian, A. M. (2013). Development of gluten-free flat bread using hydrocolloids: Xanthan and CMC. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi:10.1016/j.jiec.2013.08.035
- Montoro, M., & Domínguez Cajal, M. (2013). Enfermedad celíaca en el adulto. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 233–284). Barcelona, España: OmniaScience.
- Moreira, R., Chenlo, F., & Torres, M. D. (2011). Effect of sodium chloride, sucrose and chestnut starch on rheological properties of chestnut flour doughs. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1041–1050. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.09.025
- Muzquiz, M., Hill, G. D., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Burbano, C. (2004). *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds* (1ra. Ed.). Toledo, España: Wageningen Academic.
- Myszkowska-ryciak, J., Szymańska, J., Harton, A., & Gajewska, D. (2010). Evidence of high fat and sugar intake, and low fibre and selected minerals intake in adult female coeliac patients. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 4(2), 112–115.
- Newport Scientific. (2001). *Interpreting Test Results Rapid Visco Analyser: Instalation and Operation Manual*. Warriewood, Australia: Newport Scientific.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. doi:10.1016/j.plantsci.2010.02.010
- NTC. Norma Técnica Colombiana NTC 5749: Trigo y harina de trigo. Contenido del gluten. Parte 2: determinación del gluten húmedo por método mecánico y del gluten seco (obtenido a partir del gluten húmedo) por método de secado rápido. (2009). Colombia.
- Ozkoc, S. O., Sumnu, G., Sahin, S., & Turabi, E. (2009). Investigation of physicochemical properties of breads baked in microwave and infrared-microwave combination ovens during storage. *European Food Research and Technology*, 228(6), 883–893. doi:10.1007/s00217-008-1001-0
- Pablo-Pérez, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., López-Upton, J., Ramos-Juárez, J., & Aranda-Ibáñez, E. (2013). Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro*, 25(2), 101–108.
- Pal, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(1), 41–60. doi:10.1016/j.cocis.2010.10.001

- Peña, A., & Rodrigo, L. (2013). Enfermedad Celíaca y Sensibilidad al Gluten no Celíaca. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 25–43). Barcelona, España: OmniaScience.
- Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., & Micard, V. (2010). Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, *43*(2), 634–641. doi:10.1016/j.foodres.2009.07.020
- Pflaum, T., Konitzer, K., Hofmann, T., & Koehler, P. (2013). Analytical and sensory studies on the release of sodium from wheat bread crumb. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(26), 6485–94. doi:10.1021/jf4012906
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2000). *Handbook of Hydrocolloids* (1ra. Ed.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing limited.
- Polanco, I. (2013). Enfermedad celíaca en la infancia. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 219–232). Barcelona, España: OmniaScience.
- Pompa, M., Giuliani, M. M., Palermo, C., Agriesti, F., Centonze, D., & Flagella, Z. (2013). Comparative analysis of gluten proteins in three durum wheat cultivars by a proteomic approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(11), 2606–17. doi:10.1021/jf304566d
- Preedy, V. R., Watson, R. R., & Patel, V. B. (2011). *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (1a. Ed.). San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Prodanov, M., Sierra, I., & Vidal-Valverde, C. (1997). Effect of germination on the thiamine, riboflavin and niacin contents in legumes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *205*(1), 48–52. doi:10.1007/s002170050122
- Prodanov, M., Sierra, I., & Vidal-Valverde, C. (2004). Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chemistry*, *84*(2), 271–277. doi:10.1016/S0308-8146(03)00211-5
- Queiroz, M. S., Nery, M., Cançado, E. L., Gianella-Neto, D., & Liberman, B. (2004). Prevalence of celiac disease in Brazilian children of short stature. *Brazilian journal of medical and biological research*, *37*(1), 55–60.
- Rakcejeva, T., Galoburda, R., Cude, L., & Strautniece, E. (2011). Use of dried pumpkins in wheat bread production. *Procedia Food Science*, *1*(Icef 11), 441–447. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.068

- Rao, V., Mulvaney, S., & Dexter, J. (2000). Rheological Characterisation of Long- and Short- Mixing Flours Based on Stress–Relaxation. *Journal of Cereal Science*, 31(2), 159–171. doi:10.1006/jcrs.1999.0295
- Repo-carrasco, R. A., & Serna, L. A. (2011). Quinoa ( *Chenopodium quinoa* , Willd .) as a source of dietary fiber and other functional components. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 225–230.
- Resolución 333, M. RESOLUCIÓN NÚMERO 333 de 2011. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Reglamento técnico sobre los requisitos de etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano (2011). Colombia.
- Rodrigo, L., Lauret-Braña, M. E., & Pérez-Martínez, I. (2013). Manifestaciones extra-intestinales y enfermedades asociadas. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca* (pp. 299–323). Barcelona, España: OmniaScience.
- Rodrigo, L., & Peña, A. (2013). *Enfermedad Celíaca y Sensibilidad al Gluten no Celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience.
- Rodríguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., & Hernández, A. (2008). Correlations between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. *Food Chemistry*, 108(1), 245–252. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.073
- Roje, S. (2007). Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 68(14), 1904–21. doi:10.1016/j.phytochem.2007.03.038
- Rosell, C. (2013). Alimentos sin gluten derivados de cereales. In L. Rodrigo & A. Peña (Eds.), *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. (pp. 447–461). Barcelona, España: OmniaScience.
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., & Barber, C. B. De. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15, 75–81.
- Sahraiyán, B., Naghipour, F., Karimi, M., & Davoodi, M. G. (2013). Evaluation of *Lepidium sativum* seed and guar gum to improve dough rheology and quality parameters in composite rice–wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 698–703. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.08.013
- Sangronis, E., & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 116–120. doi:10.1016/j.lwt.2005.08.003

- Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., ... Fasano, A. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC medicine*, *10*(1), 13. doi:10.1186/1741-7015-10-13
- Sapone, A., Lammers, K. M., Mazzarella, G., Mikhailenko, I., Carteni, M., Casolaro, V., & Fasano, A. (2010). Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *International archives of allergy and immunology*, *152*(1), 75–80. doi:10.1159/000260087
- Schoenlechner, R., Mandala, I., Kiskini, A., Kostaropoulos, A., & Berghofer, E. (2010). Effect of water, albumen and fat on the quality of gluten-free bread containing amaranth. *International Journal of Food Science & Technology*, *45*(4), 661–669. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02154.x
- Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., León, A. E., & Pérez, G. T. (2008). Influence of Gluten-free Flours and their Mixtures on Batter Properties and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(4), 577–585. doi:10.1007/s11947-008-0098-2
- See, E. F., Wan Nadiah, W. A., & Noor Aziah, A. A. (2007). Physico-Chemical and Sensory Evaluation of Breads Supplemented with Pumpkin Flour. *ASEAN Food Journal*, *14*(2), 123–130.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (2000). *Wheat Gluten*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Siddiq, M., Kelkar, S., Harte, J. B., Dolan, K. D., & Nyombaire, G. (2013). Functional properties of flour from low-temperature extruded navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 215–219. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.024
- Singh, J., & Whelan, K. (2011). Limited availability and higher cost of gluten-free foods. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*, *24*(5), 479–86. doi:10.1111/j.1365-277X.2011.01160.x
- Sridaran, A., Karim, A. a., & Bhat, R. (2012). Pithecellobium jiringa legume flour for potential food applications: Studies on their physico-chemical and functional properties. *Food Chemistry*, *130*(3), 528–535. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.062
- Steffe, J. F. (1992). *Rheological methods in food process engineering* (2da. Ed.). Michigan, USA: Freeman Press.
- Steffolani, M. E. (2012). *Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos de panificación*. Universidad Nacional de la Plata.

- Sumnu, G., Koksel, F., Sahin, S., Basman, A., & Meda, V. (2009). The effects of xanthan and guar gums on staling of gluten-free rice cakes baked in different ovens. *International Journal of Food Science & Technology*, *45*(1), 87–93. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02107.x
- Tejero, F. (1992). *Panaderia Española*. Barcelona, España: Montagud Editores.
- Thompson, T. (1999). Thiamin, riboflavin, and niacin contents of the gluten-free diet: is there cause for concern? *Journal of the American Dietetic Association*, *99*, 858–862.
- Thompson, T. (2000). Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, *100*, 1389–1396.
- Tiwari, B. K., Gowen, A., & McKenna, B. (2011). *Pulse Foods Processing, Quality and Nutraceutical Applications* (1ra. Ed.). San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Torres, J. D., Tárrega, A., & Costell, E. (2010). Storage stability of starch-based dairy desserts containing long-chain inulin: Rheology and particle size distribution. *International Dairy Journal*, *20*(1), 46–52. doi:10.1016/j.idairyj.2009.08.001
- Tranquet, O., Larré, C., & Denery-Papini, S. (2012). Selection of a monoclonal antibody for detection of gliadins and glutenins: A step towards reliable gluten quantification. *Journal of Cereal Science*, *56*(3), 760–763.
- Umaña, J. (2010). *Caracterización de harinas alternativas de origen vegetal con potencial utilización en procesos de panificación*. Universidad de Antioquia.
- UNAM. (2008). *Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos*. México, D.F.
- Urbano, G., López-Jurado, M., Frejnagel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J. M., Frías, J., ... Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutrition*, *21*(2), 230–9. doi:10.1016/j.nut.2004.04.025
- Vaclavik, V. A. (2002). *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos* (1a. Ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Van Hees, N. J. M., Van der Does, W., & Giltay, E. J. (2013). Coeliac disease, diet adherence and depressive symptoms. *Journal of psychosomatic research*, *74*(2), 155–60. doi:10.1016/j.jpsychores.2012.11.007
- Van Vliet, T., Martin, A. H., & Bos, M. a. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *7*(5-6), 462–468. doi:10.1016/S1359-0294(02)00078-X

- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sierra, I., Blazquez, I., Lambein, F., & Kuo, Y.-H. (2002). New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215(6), 472–477. doi:10.1007/s00217-002-0602-2
- Wang, N., & Daun, J. K. (2004). Pulse Canada. *The Chemical Composition and Nutritive Value of Canadian Pulses*. Retrieved June 10, 2013, from <http://www.pulsecanada.com/food-health/composition-functionality>
- Wang, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2012). Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition, color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 175–182. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.011
- Wang, Yang, Zhu, P.-H., Tian, T., Tang, J., Wang, L., & Hu, X.-Y. (2011). Synchronous fluorescence as a rapid method for the simultaneous determination of folic acid and riboflavin in nutritional beverages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12629–34. doi:10.1021/jf202536m
- Wei, Y., Shohag, M. J. I., Wang, Y., Lu, L., Wu, C., & Yang, X. (2012). Effect of zinc sulfate fortification in germinated brown rice on seed zinc concentration, bioavailability, and seed germination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1871–9. doi:10.1021/jf205025b
- Weipert, D. (1990). The Benefits of Basic Rheometry in Studying Dough Rheology. *American Association of Cereal Chemists*, 67(4), 311–317.
- Wild, D., Robins, G. G., Burley, V. J., & Howdle, P. D. (2010). Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32(4), 573–81. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04386.x
- Wu, F., Chen, H., Yang, N., Wang, J., Duan, X., Jin, Z., & Xu, X. (2013). Effect of germination time on physicochemical properties of brown rice flour and starch from different rice cultivars. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 263–271. doi:10.1016/j.jcs.2013.06.008
- Xu, J., Zhang, H., Guo, X., & Qian, H. (2012). The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch. *Journal of the science of food and agriculture*, 92(2), 380–7. doi:10.1002/jsfa.4588
- Yonezawa, A., & Inui, K. (2013). Novel riboflavin transporter family RFVT / SLC52 : Identification , nomenclature , functional characterization and genetic diseases RFVT/SLC52. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 693–701.

- Zannini, E., Jones, J. M., Renzetti, S., & Arendt, E. K. (2012). Functional replacements for gluten. *Annual review of food science and technology*, 3, 227–45. doi:10.1146/annurev-food-022811-101203
- Zarkadas, M., Dubois, S., Maclsaac, K., Cantin, I., Rashid, M., Roberts, K. C., ... Pulido, O. M. (2013). Living with coeliac disease and a gluten-free diet: a Canadian perspective. *Journal of human nutrition and dietetics: the official journal of the British Dietetic Association*, 26(1), 10–23. doi:10.1111/j.1365-277X.2012.01288.x
- Zieliński, H., Frias, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2006). The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry*, 99(3), 516–520. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.014
- Ziobro, R., Witczak, T., Juszcak, L., & Korus, J. (2013). Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 213–220. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.01.006
- Zuleta, A., Dyer, L., Sambucetti, M. E., & de Francisco, A. (2006). Effect of Gamma Irradiation on the Functional and Nutritive Properties of Rice Flours from Different Cultivars. *Cereal Chemistry Journal*, 83(1), 76–79. doi:10.1094/CC-83-0076

## ANEXOS

### ANEXO 1 NORMA DEL CODEX RELATIVA A LOS ALIMENTOS PARA RÉGIMENES ESPECIALES DESTINADOS A PERSONAS INTOLERANTES AL GLUTEN CODEX STAN 118 - 1979

#### 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

**1.1** La presente Norma se aplica a los alimentos para regímenes especiales que se han formulado, procesado o preparado para cubrir las necesidades dietéticas especiales de las personas intolerantes al gluten.

**1.2** En los alimentos para consumo general que por su naturaleza son aptos para las personas con intolerancia al gluten, se puede indicar dicha aptitud de acuerdo con las disposiciones de la Sección 4.3.

#### 2. DESCRIPCIÓN

**2.1 Definiciones:** Los productos regulados por la presente Norma son los siguientes:

**2.1.1 Alimentos exentos de gluten:** Los alimentos exentos de gluten son alimentos dietéticos que: a) están constituidos por, o son elaborados únicamente con, uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena<sup>1</sup> o sus variedades híbridas, y cuyo contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor; b) están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), el centeno, la cebada, la avena<sup>1</sup> o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten, y cuyo contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

**2.1.2 Alimentos procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg:** Estos alimentos están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir, todas las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), el centeno, la cebada, la avena<sup>1</sup> o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor. Las decisiones relativas a la comercialización de los productos descritos en esta sección podrán adoptarse a nivel nacional.

## **2.2 Definiciones auxiliares**

**2.2.1 Gluten:** A los efectos de la presente Norma, se entiende por “gluten” una fracción proteínica del trigo, el centeno, la cebada, la avena<sup>1</sup> o sus variedades híbridas y derivados de los mismos, que algunas personas no toleran y que es insoluble en agua y en 0,5M NaCl.

**2.2.2 Prolaminas:** Por prolaminas se entiende la fracción del gluten que puede extraerse con etanol al 40-70 %. La prolamina del trigo es la gliadina, la del centeno es la secalina, la de la cebada es la hordeína y la de la avena<sup>1</sup> es la avenina. No obstante, es habitual referirse a la sensibilidad al gluten. Por lo general se considera que el contenido de prolamina del gluten es del 50 %.

## **3. COMPOSICIÓN ESENCIAL Y FACTORES DE CALIDAD**

**3.1** En los productos a los que se hace referencia en la Sección 2.1.1 a) y b), el contenido de gluten no deberá ser superior a 20 mg/kg en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

**3.2** En los productos a los que se hace referencia en la Sección 2.1.2, el contenido de gluten no deberá ser superior a 100 mg/kg en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

**3.3** Los productos regulados por la presente Norma que sustituyan a alimentos básicos importantes deberían suministrar aproximadamente la misma cantidad de vitaminas y minerales que los alimentos originales a los que sustituyen.

**3.4** Los productos regulados por la presente Norma deberán prepararse con especial cuidado con arreglo a buenas prácticas de fabricación (BPF) a fin de evitar la contaminación con gluten.

## **4. ETIQUETADO**

Además de las disposiciones generales sobre etiquetado que figuran en la Norma general para el etiquetado de los alimentos preenvasados (CODEX STAN 1-1985) y en la Norma general para el etiquetado y declaración de propiedades de alimentos preenvasados para regímenes especiales (CODEX STAN 146-1985) y de toda otra disposición específica sobre etiquetado que figure en una norma del Codex aplicable al alimento concreto de que se trate, se aplicarán las siguientes disposiciones para el etiquetado de los “alimentos exentos de gluten”:

**4.1** En el caso de los productos descritos en la Sección 2.1.1, el término “exento de gluten” deberá aparecer en la etiqueta muy cerca del nombre del producto.

**4.2** El etiquetado de los productos descritos en la Sección 2.1.2 debería regularse a nivel nacional. No obstante, estos productos no deben denominarse “exentos de gluten”. Los términos empleados en las etiquetas de esos productos deberían indicar la verdadera naturaleza del alimento y deberán aparecer en la etiqueta muy cerca del nombre del producto.

**4.3** Un alimento que por su naturaleza sea apto para su uso como parte de una dieta exenta de gluten no deberá designarse “para regímenes especiales”, “para dietas especiales” o con otro término equivalente. No obstante, en la etiqueta de dicho alimento podrá declararse que “este alimento está exento de gluten por su naturaleza”, siempre y cuando el alimento se ajuste a las disposiciones que regulan la composición esencial de los alimentos exentos de gluten, establecidas en la Sección 3.1 y siempre que dicha declaración no confunda al consumidor. Podrán establecerse reglas más detalladas, con el fin de evitar confundir al consumidor, a nivel nacional.

## **5. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO**

### **5.1 Descripción general de los métodos**

- La determinación de la cantidad de gluten presente en los alimentos e ingredientes deberá basarse en un método inmunológico o en otro método que ofrezca como mínimo la misma sensibilidad y especificidad.
- El anticuerpo utilizado debería reaccionar a las fracciones de las proteínas de los cereales que son tóxicas para las personas intolerantes al gluten y no deberían reaccionar a otras proteínas de los cereales ni a otros constituyentes de los alimentos o ingredientes.
- Los métodos utilizados para la determinación deberían validarse y calibrarse en relación con material de referencia certificado, de haberlo.
- El límite de detección debe ser el apropiado con arreglo a la norma técnica y a los métodos más avanzados. Dicho límite debería ser igual o inferior a 10 mg/kg.
- El análisis cualitativo que indique la presencia de gluten deberá basarse en métodos pertinentes (p. ej. métodos de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas [ELISA] o basados en el ADN).

**5.2 Método de determinación del gluten:** Método de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) R5 Méndez.

**ANEXO 2**  
**DECRETO NÚMERO 1944 DE 1996**  
**(Octubre 28)**

por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control.

El Presidente de la República de Colombia, en ejercicio de las facultades constitucionales y legales, en especial las conferidas por el numeral 11 del artículo 189 de la Constitución Política,

**CONSIDERANDO:**

Que de conformidad con la Ley 09 de 1979, Título V y el Decreto 1292 de 1994, el Ministerio de Salud debe formular las políticas y normas sobre el control de los factores de riesgo del consumo para su aplicación por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Invima, y las entidades territoriales;

Que estudios realizados en el país demuestran que existen deficiencias en el consumo de micronutrientes en la población colombiana;

Que en la Cumbre Mundial en favor de la Infancia convocada por las Naciones Unidas en 1990, en la cual participaron 159 países entre ellos, Colombia, se establecieron los compromisos de los países para erradicar las deficiencias de micronutrientes en sus poblaciones;

Que después en la Conferencia Internacional de Nutrición realizada en Roma en 1992, los representantes de prácticamente todos los países del mundo incluyendo a Colombia, firmaron la Declaración Mundial y Plan de Acción en Nutrición en la cual se ratificó la determinación de eliminar el hambre y todas las formas de desnutrición;

Que el documento Conpes 2847 y las líneas de acción que conforman el Plan Nacional de Alimentación y Nutrición 1996-2005 fijan como una política la Prevención y Control de las deficiencias de micronutrientes, a través de la fortificación de alimentos de consumo básico;

Que la harina de trigo es uno de los insumos más importantes para la fabricación de alimentos básicos en la dieta colombiana, como son los productos de panadería, pastelería, galletas, pastas alimenticias y otros;

Que es necesario reglamentar la fortificación de la harina de trigo con micronutrientes deficientes en la dieta colombiana;

Que el Decreto 1112 del 24 de junio de 1996, en sus artículos 4º y 9º establece los procedimientos para la expedición de reglamentos con carácter urgente;

Que el presente reglamento de acuerdo con el impacto en la salud pública es de carácter urgente.

**DECRETA:**

Expedir el reglamento de fortificación de la harina de trigo para consumo en Colombia

Artículo 1º. Campo de aplicación. Las disposiciones del presente reglamento se aplican a la harina de trigo que se comercializa en el territorio nacional para la venta directa al consumidor, como para la fabricación de productos de panadería, pastelería, galletería, pastas alimenticias, y otros.

Artículo 2º. Obligatoriedad de fortificación. La harina de trigo que se comercializa en el territorio nacional deberá estar fortificada con vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido fólico y hierro.

Parágrafo. La adición de calcio podrá hacerse de manera opcional.

Artículo 3º. Para efectos de este decreto se establecen en las siguientes definiciones.

- Harina de trigo fortificada: Es la harina de trigo a la cual se le han agregado los micronutrientes en las cantidades especificadas en la presente Resolución.
- Fortificación: Significa la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento ya sea que esté(n) o no contenido(s) en el alimento, con el propósito de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o en grupos específicos de población.

Artículo 4º. Requisitos. La harina de trigo que se comercializa en el territorio nacional deberá estar adicionada o añadida con las siguientes cantidades mínimas de micronutrientes por cada kilogramo de harina:

Micronutrientes	Cantidad mínima	Mg/Kg
Vitamina B <sub>1</sub> o Tiamina	6 mg	
Vitamina B <sub>2</sub> o Riboflavina	4 mg	
Niacina	55 mg	
Acido Fólico o Folato	1.54 mg	
Hierro	44 mg	
Calcio (Opcional)	1.280 mg	

Parágrafo. La harina de trigo que se importe y se comercialice en el país deberá cumplir con estos requisitos.

Artículo 5º. Forma de adición de los micronutrientes. Los micronutrientes a que hace referencia el artículo anterior deberán ser adicionados en forma de una premezcla para facilitar el proceso de adición de los micronutrientes a la harina.

Parágrafo. El calcio puede ser añadido de manera independiente a la adición de la premezcla.

Artículo 6º. Formas químicas de los micronutrientes. Los micronutrientes que hacen parte de la premezcla deberán ser adicionados en las formas químicas siguientes:

Micronutrientes	Forma química
Vitamina B <sub>1</sub>	Mononitrato de Tiamina
Vitamina B <sub>2</sub>	Riboflavina
Niacina	Nicotinamida
Acido Fólico	Acido Fólico
Hierro	Fumarato Ferroso
	Hierro Reducido
	Sulfato Ferroso
Calcio	Carbonato de Calcio
	Fosfato Monocálcico

Parágrafo. La calidad de los micronutrientes y del vehículo de la premezcla deberá cumplir con las especificaciones técnicas establecidas en el Food Chemical Codex, FCC, y las Farmacopeas Oficiales en Colombia.

Artículo 7º. De las competencias técnicas. El Ministerio de Salud podrá modificar los micronutrientes, las formas químicas de los mismos y las cantidades de fortificación, de acuerdo con los avances de los conocimientos científicos del tema.

Artículo 8º. De la responsabilidad. La fortificación de la harina de trigo con los micronutrientes es responsabilidad de los industriales fabricantes de la harina de trigo. Así mismo, para la fabricación de productos alimenticios en los cuales se utilice esta materia prima, deberán elaborarse con harina de trigo fortificada según los requisitos establecidos en este Decreto.

Artículo 9º. Rotulado. El rótulo del envase o empaque de la harina de trigo, además de las condiciones de rotulado señaladas en la Resolución 8688 de 1979 o las que modifiquen, sustituyan o adicionen, deberá contener en forma destacada la leyenda

Harina de Trigo Fortificada con la declaración de las cantidades de los micronutrientes adicionados en miligramos por kilogramo (mg/kg) de harina.

Artículo 10. Vigilancia y control. El control y la vigilancia en el cumplimiento de las disposiciones contenidos en el presente Decreto para la Harina de Trigo Fortificada y de las premezclas, estará a cargo del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Invima, y las entidades territoriales competentes. Se tomarán periódicamente muestras de harina de trigo y de las premezclas para su análisis por parte del Invima.

Artículo 11. De la aplicación de las medidas sanitarias. Corresponde al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Invima, y a las entidades territoriales o las autoridades sanitarias delegadas tomar las medidas sanitarias preventivas y de seguridad, adelantar los procedimientos y establecer las sanciones que se deriven del incumplimiento de las especificaciones que se señalan en el presente Decreto, conforme a lo establecido en el Decreto 2780 de 1991 o los que lo modifiquen, adicionen o sustituyan.

Artículo 12. Los industriales fabricantes de la harina de trigo tendrán un plazo de 8 meses para dar cumplimiento a lo previsto en este Decreto.

Artículo 13. El presente Decreto rige a partir de la fecha de su publicación.

Publíquese y cúmplase.

28 de octubre de 1996.

ERNESTO SAMPER PIZANO

La Ministra de Salud,

María Teresa Forero de Saade.

**ANEXO 3**  
**CERTIFICADO EXPEDIDO POR EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN**  
**ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO – CIAD**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.

CIAD

SEP-CONACYT-UNAM-IPN-GOBIERNO DE SONORA-GOBIERNO DE SINALOA-GOBIERNO DE CHIHUAHUA-SAGARPA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

A quien corresponda:

A petición de la interesada, hago constar que Carolina Álvarez Restrepo, de nacionalidad colombiana, estuvo en una estancia de entrenamiento en esta institución, del 30 de abril, al 27 de mayo de 2013. La razón, fue recibir entrenamiento en técnicas para hacer pruebas reológicas, de cuantificación de gluten y de índice glicémico, a las masas y panes de combinaciones con ingredientes alternos al trigo. Para los fines que a ella convengan, extiendo la presente en Hermosillo, Sonora, México, el 17 de junio de 2013.

Dra. Ana Ma. Calderón de la Barca  
Investigadora Titular  
Coordinación de Nutrición

Km 0.6 Carretera a La Victoria  
Apartado Postal No. 1735  
Hermosillo, Sonora, México. CP. 83000

TEL.: (662) 289 24 00 ext. 288  
FAX: (662) 2 80 00 94

**ANEXO 4**  
**TABLAS DE DATOS OBTENIDAS DEL REÓMETRO**

Barrido de deformación para el análogo del gluten.

<b>Shear Stress (Pa)</b>	<b>AG-A (G')</b>	<b>AG-B (G')</b>	<b>AG-C (G')</b>
0,102	6786,0	9367,0	6008,0
0,129	6971,0	9249,0	6166,0
0,163	7041,0	9212,0	6004,0
0,206	7045,0	9195,0	5936,0
0,260	7008,0	9205,0	6046,0
0,328	7163,0	9228,0	5941,0
0,413	7126,0	9107,0	5875,0
0,521	7116,0	8878,0	6040,0
0,658	7227,0	8793,0	5973,0
0,830	7249,0	8720,0	6104,0
1,048	7162,0	8579,0	6094,0
1,322	7078,0	8549,0	6051,0
1,668	7149,0	8450,0	6257,0
2,105	6989,0	8380,0	6178,0
2,656	6926,0	8335,0	6149,0
3,352	6826,0	8336,0	6091,0
4,229	6675,0	8345,0	6032,0
5,337	6520,0	8154,0	5953,0
6,734	6287,0	8177,0	5836,0
8,497	6024,0	7937,0	5700,0
10,720	5737,0	7748,0	5534,0
13,530	5433,0	7467,0	5344,0
17,070	5096,0	7176,0	5093,0
21,540	4696,0	6869,0	4826,0
27,180	4284,0	6471,0	4520,0
34,300	3852,0	6023,0	4201,0
43,290	3395,0	5607,0	3851,0
54,620	2916,0	5137,0	3474,0
68,920	2428,0	4642,0	3076,0
86,970	1967,0	4121,0	2678,0
109,800	1579,0	3620,0	2281,0
138,500	1263,0	3134,0	1910,0
174,800	1014,0	2686,0	1576,0
220,500	813,9	2279,0	1280,0
278,300	655,4	1909,0	1032,0
351,100	545,2	1582,0	817,9
443,100	468,8	1279,0	651,8
559,100	421,9	1013,0	524,4
705,500	389,2	798,8	438,3
1000	350,9	630,1	381,3

Barrido de frecuencia para el análogo del gluten.

FRECUENCIA (Hz)	MUESTRA A		MUESTRA B		MUESTRA C	
	G'	G''	G'	G''	G'	G''
0,10	8,05E+03	3,06E+03	1,70E+03	6,03E+02	1,40E+03	6,84E+02
0,12	8,50E+03	3,25E+03	1,85E+03	6,12E+02	1,51E+03	7,21E+02
0,14	8,94E+03	3,35E+03	1,93E+03	6,21E+02	1,62E+03	7,68E+02
0,17	9,37E+03	3,42E+03	2,03E+03	6,29E+02	1,71E+03	8,25E+02
0,21	9,86E+03	3,45E+03	2,13E+03	6,36E+02	1,81E+03	8,90E+02
0,25	1,05E+04	3,56E+03	2,23E+03	6,44E+02	1,91E+03	9,63E+02
0,30	1,11E+04	3,67E+03	2,33E+03	6,58E+02	2,01E+03	1,02E+03
0,36	1,13E+04	3,78E+03	2,40E+03	6,62E+02	2,10E+03	1,09E+03
0,43	1,18E+04	3,88E+03	2,54E+03	6,85E+02	2,21E+03	1,19E+03
0,52	1,22E+04	4,01E+03	2,64E+03	7,13E+02	2,33E+03	1,29E+03
0,62	1,30E+04	4,26E+03	2,73E+03	7,36E+02	2,43E+03	1,41E+03
0,75	1,32E+04	4,38E+03	2,83E+03	7,65E+02	2,58E+03	1,51E+03
0,90	1,37E+04	4,54E+03	2,91E+03	7,60E+02	2,73E+03	1,65E+03
1,08	1,47E+04	4,64E+03	2,99E+03	7,92E+02	2,93E+03	1,81E+03
1,29	1,49E+04	4,89E+03	3,09E+03	8,02E+02	3,05E+03	1,98E+03
1,55	1,55E+04	5,28E+03	3,18E+03	8,22E+02	3,20E+03	2,16E+03
1,86	1,61E+04	5,44E+03	3,28E+03	8,73E+02	3,41E+03	2,38E+03
2,23	1,67E+04	5,69E+03	3,39E+03	8,95E+02	3,69E+03	2,59E+03
2,68	1,71E+04	5,86E+03	3,50E+03	9,36E+02	3,89E+03	2,92E+03
3,22	1,78E+04	6,36E+03	3,62E+03	9,97E+02	4,17E+03	3,17E+03
3,86	1,84E+04	6,76E+03	3,71E+03	1,03E+03	4,44E+03	3,44E+03
4,64	1,94E+04	7,41E+03	3,82E+03	1,09E+03	4,79E+03	3,88E+03
5,57	1,96E+04	7,84E+03	3,90E+03	1,15E+03	5,13E+03	4,20E+03
6,68	2,05E+04	8,31E+03	4,10E+03	1,20E+03	5,60E+03	4,77E+03
8,02	2,11E+04	8,97E+03	4,19E+03	1,29E+03	5,81E+03	5,27E+03
9,63	2,24E+04	9,63E+03	4,27E+03	1,34E+03	6,35E+03	5,83E+03
11,56	2,30E+04	1,05E+04	4,50E+03	1,46E+03	6,70E+03	6,53E+03
13,88	2,46E+04	1,16E+04	4,61E+03	1,55E+03	7,34E+03	7,26E+03
16,66	2,51E+04	1,26E+04	4,72E+03	1,65E+03	7,85E+03	7,97E+03
20,00	2,70E+04	1,37E+04	4,89E+03	1,84E+03	8,01E+03	8,16E+03

Barrido de deformación para el prototipo libre de gluten.

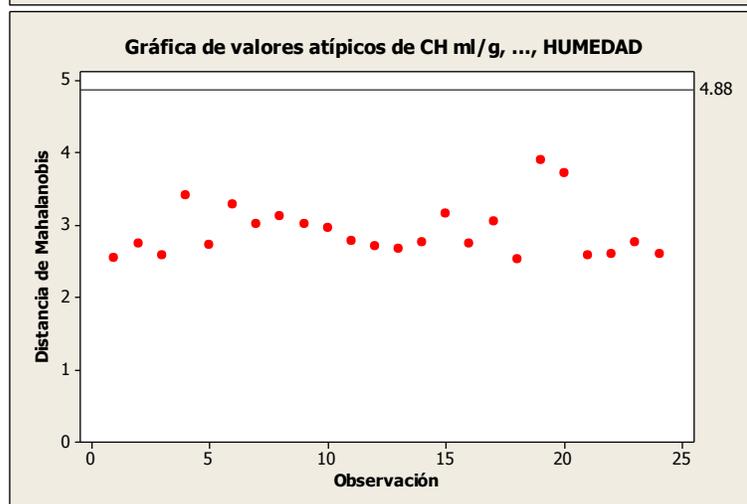
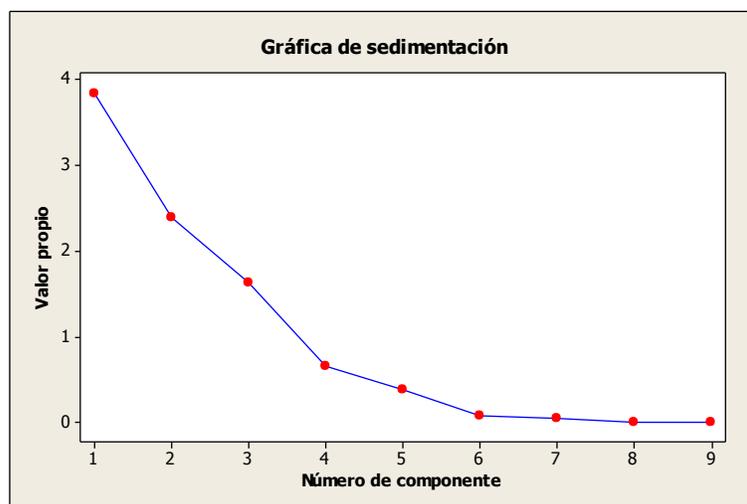
Shear Stress (Pa)	CONTROL (G')	PROTOTIPO (G')
0,102	1488,00	4624,00
0,129	1458,00	4579,00
0,163	1422,00	4466,00
0,206	1407,00	4304,00
0,260	1374,00	4287,00
0,328	1385,00	4280,00
0,413	1410,00	4176,00
0,521	1349,00	4172,00
0,658	1293,00	4190,00
0,830	1277,00	4200,00
1,048	1270,00	4285,00
1,322	1258,00	4337,00
1,668	1227,00	4258,00
2,105	1165,00	4120,00
2,656	1095,00	4074,00
3,352	1007,00	4110,00
4,229	885,00	4058,00
5,337	740,90	3987,00
6,734	579,10	3856,00
8,497	419,80	3633,00
10,720	291,00	3475,00
13,530	198,80	3148,00
17,070	135,20	2760,00
21,540	94,87	2166,00
27,180	70,90	1342,00
34,300	56,58	646,10
43,290	48,27	313,20
54,620	42,58	161,80
68,920	38,44	90,30
86,970	34,66	57,20
109,800	30,68	41,43
138,500	26,60	33,85
174,800	22,33	27,10
220,500	17,93	19,68
278,300	13,77	14,28
351,100	9,78	9,68
443,100	5,94	6,68
559,100	3,53	5,74
705,500	1,90	5,60
1000	1,23	5,53

Barrido de frecuencia para el prototipo libre de gluten.

FRECUENCIA (Hz)	CONTROL		PROTOTIPO LIBRE DE GLUTEN	
	G'	G''	G'	G''
0,10	8,26E+03	1,45E+03	1,95E+03	5,33E+02
0,12	8,60E+03	1,52E+03	2,04E+03	5,27E+02
0,14	9,14E+03	1,63E+03	2,14E+03	5,09E+02
0,17	9,57E+03	1,71E+03	2,22E+03	4,96E+02
0,21	9,96E+03	1,81E+03	2,30E+03	4,88E+02
0,25	1,05E+04	1,91E+03	2,35E+03	4,82E+02
0,30	1,13E+04	2,01E+03	2,40E+03	4,88E+02
0,36	1,16E+04	2,10E+03	2,48E+03	4,75E+02
0,43	1,18E+04	2,21E+03	2,54E+03	4,70E+02
0,52	1,22E+04	2,33E+03	2,59E+03	4,65E+02
0,62	1,30E+04	2,43E+03	2,64E+03	4,72E+02
0,75	1,34E+04	2,58E+03	2,70E+03	4,64E+02
0,90	1,39E+04	2,73E+03	2,75E+03	4,60E+02
1,08	1,47E+04	2,93E+03	2,81E+03	4,82E+02
1,29	1,49E+04	3,05E+03	2,87E+03	4,86E+02
1,55	1,55E+04	3,20E+03	2,93E+03	4,80E+02
1,86	1,61E+04	3,41E+03	2,98E+03	5,08E+02
2,23	1,67E+04	3,69E+03	3,03E+03	5,18E+02
2,68	1,76E+04	3,89E+03	3,09E+03	5,39E+02
3,22	1,78E+04	4,17E+03	3,18E+03	5,43E+02
3,86	1,84E+04	4,44E+03	3,23E+03	5,60E+02
4,64	1,94E+04	4,79E+03	3,29E+03	5,76E+02
5,57	1,96E+04	5,13E+03	3,36E+03	5,92E+02
6,68	2,05E+04	5,60E+03	3,41E+03	6,16E+02
8,02	2,11E+04	5,81E+03	3,48E+03	6,58E+02
9,63	2,24E+04	6,35E+03	3,55E+03	6,59E+02
11,56	2,39E+04	6,70E+03	3,63E+03	7,15E+02
13,88	2,46E+04	7,34E+03	3,68E+03	7,48E+02
16,66	2,51E+04	7,85E+03	3,71E+03	7,96E+02
20,00	2,70E+04	8,01E+03	3,73E+03	8,44E+02

## ANEXO 5

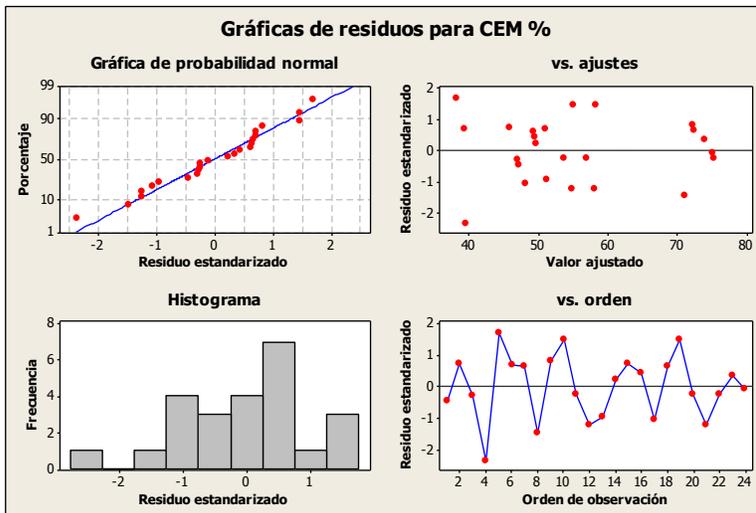
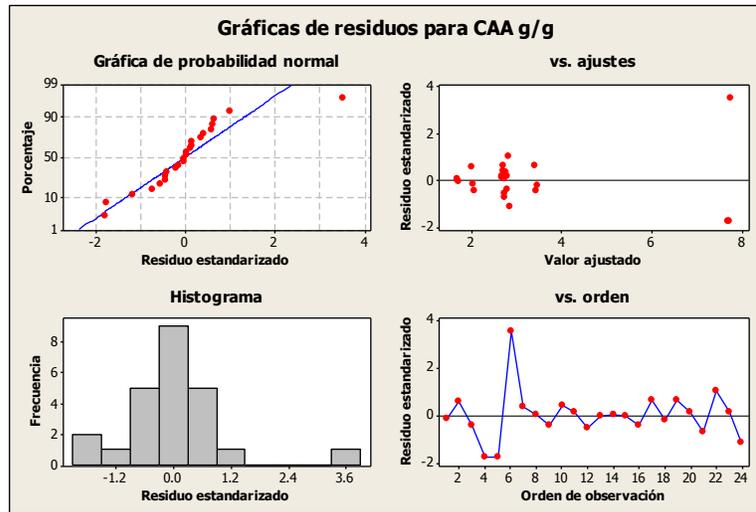
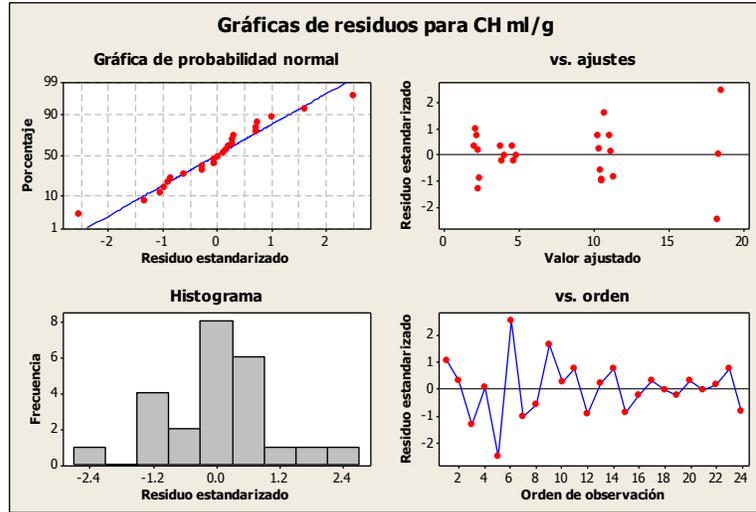
### ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA LA COMPOSICIÓN PROXIMAL Y LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS HARINAS EVALUADAS

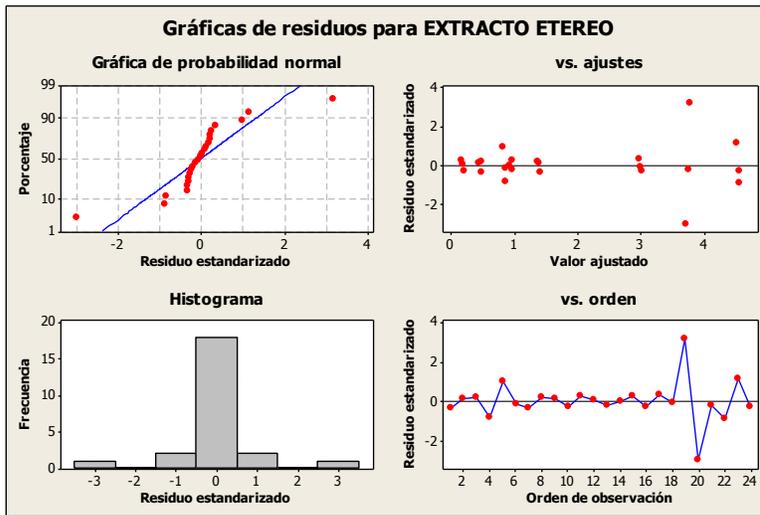
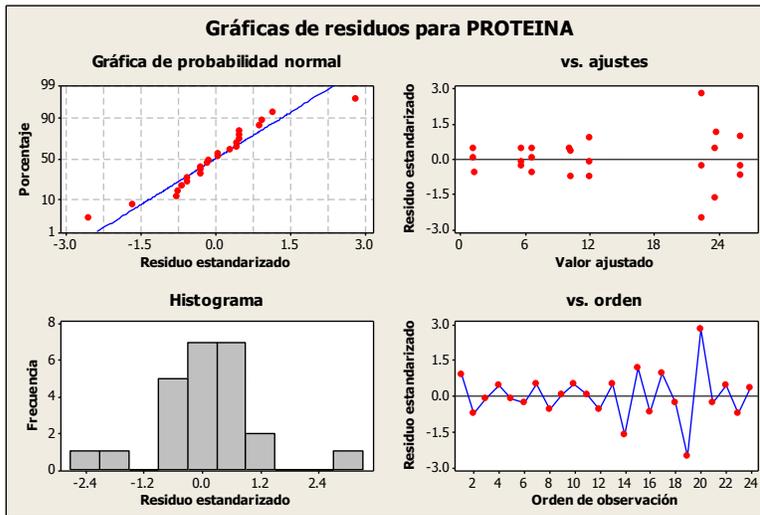
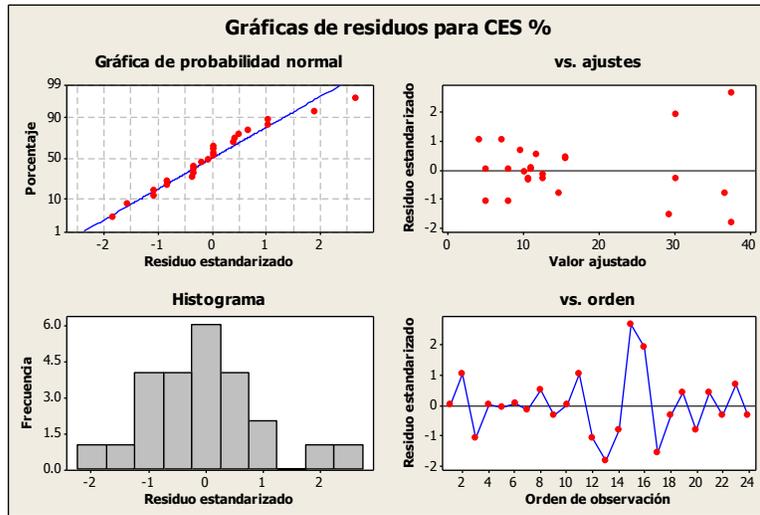


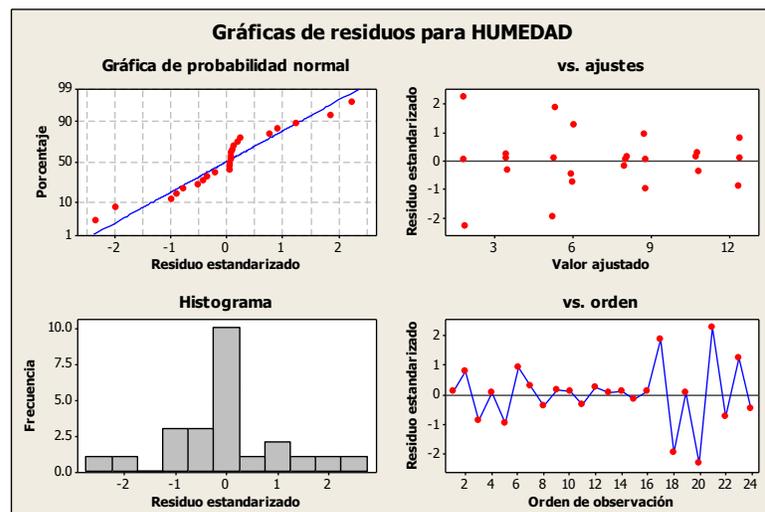
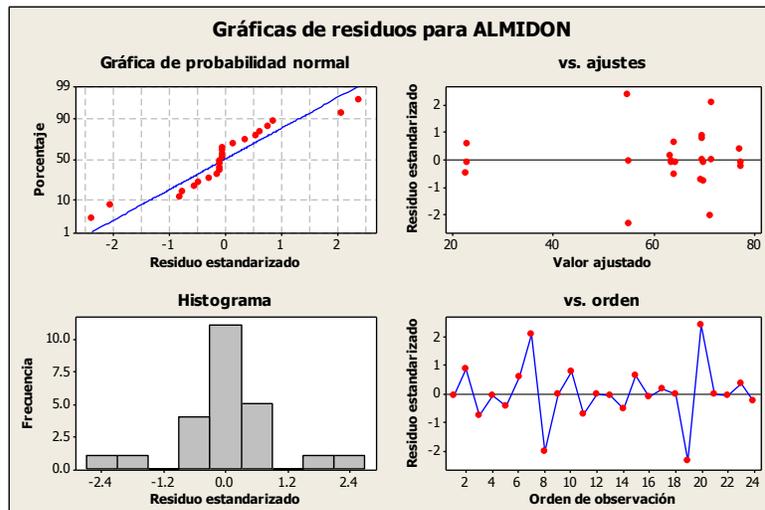
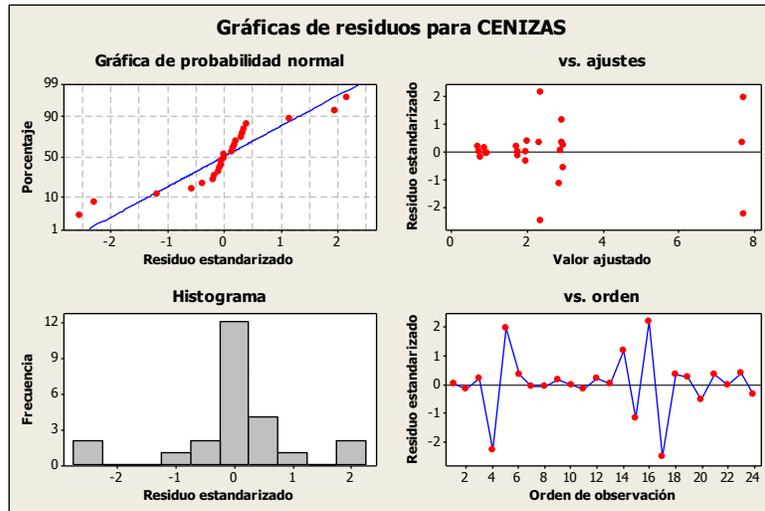
### Correlación de Pearson

VARIABLE	DESCRIPCION	CH	CAA	CEM	CES	PROTEINA	EXTRACTO ETEREO	CENIZAS	ALMIDON
CAA	correlacion	0,803							
	valor-p	0							
CEM	correlacion	0,089	-0,444						
	valor-p	0,68	0,03						
CES	correlacion	-0,495	-0,219	-0,225					
	valor-p	0,014	0,304	0,291					
PROTEINA	correlacion	-0,716	-0,325	-0,25	0,826				
	valor-p	0	0,122	0,239	0				
EXTRACTO ETEREO	correlacion	-0,08	-0,102	0,45	0,134	0,435			
	valor-p	0,709	0,637	0,027	0,533	0,034			
CENIZAS	correlacion	0,61	0,893	-0,575	0,057	-0,069	-0,075		
	valor-p	0,002	0	0,003	0,79	0,748	0,727		
ALMIDON	correlacion	-0,514	-0,878	0,697	0,006	0,058	0,197	-0,946	
	valor-p	0,01	0	0	0,979	0,789	0,356	0	
HUMEDAD	correlacion	0,04	0,06	-0,097	-0,073	-0,249	-0,495	-0,088	0,006
	valor-p	0,852	0,781	0,651	0,734	0,24	0,014	0,683	0,979

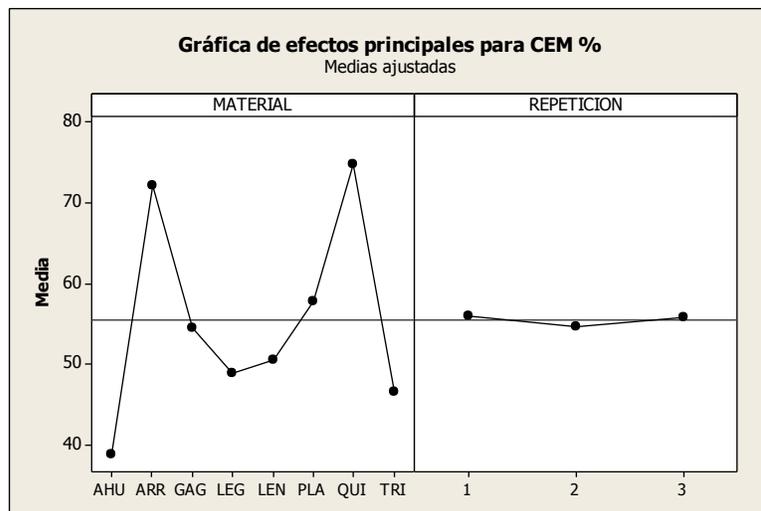
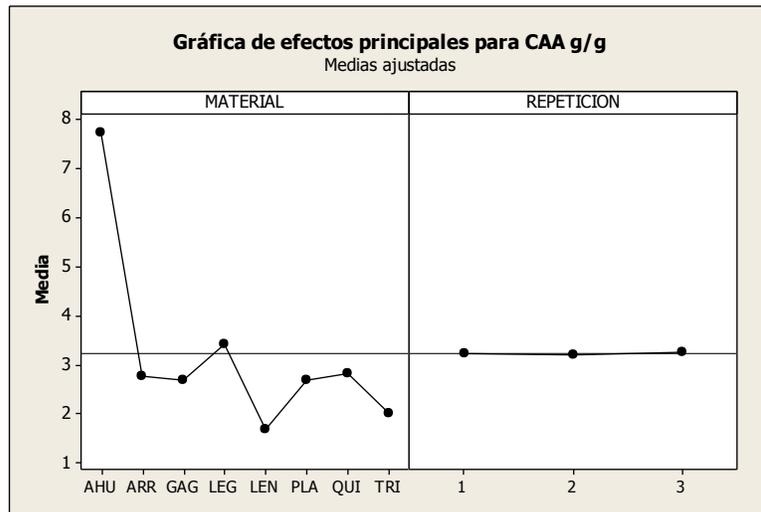
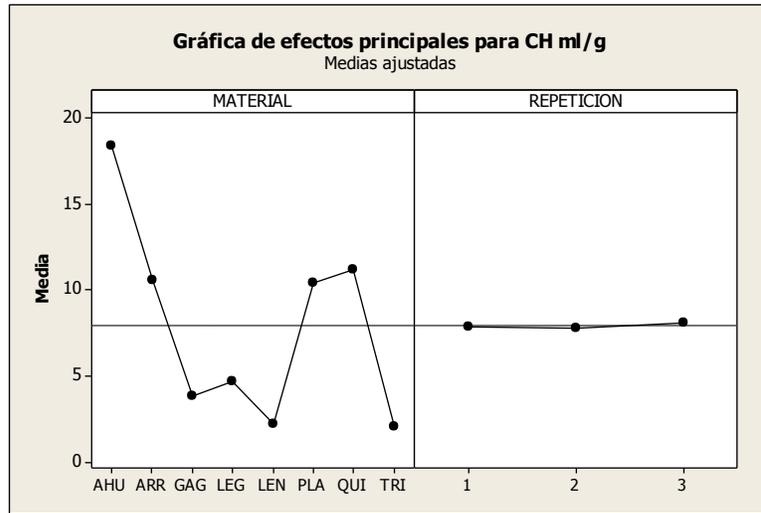
**Graficas de residuo:** se cumplen los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia

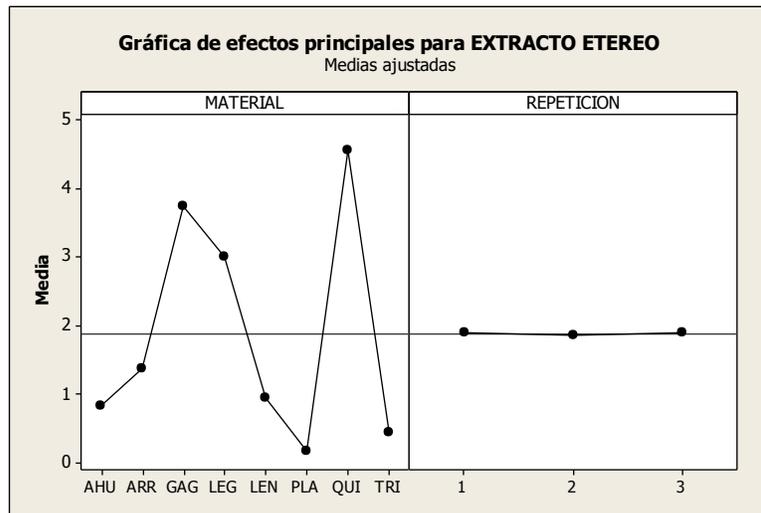
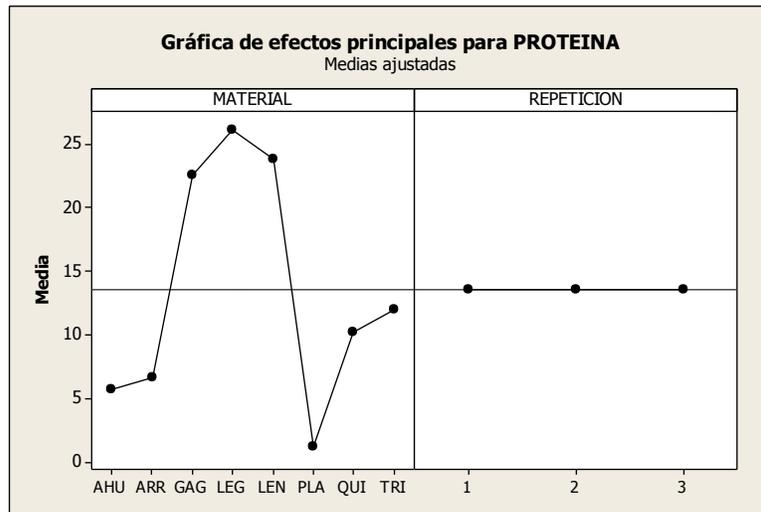
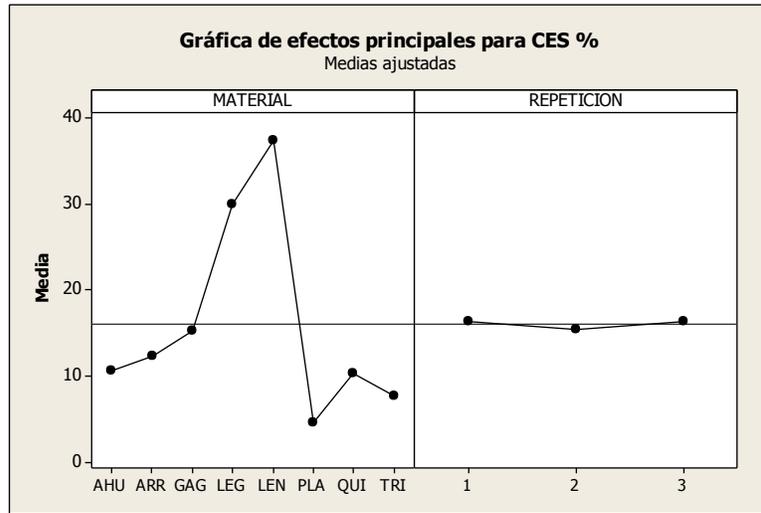


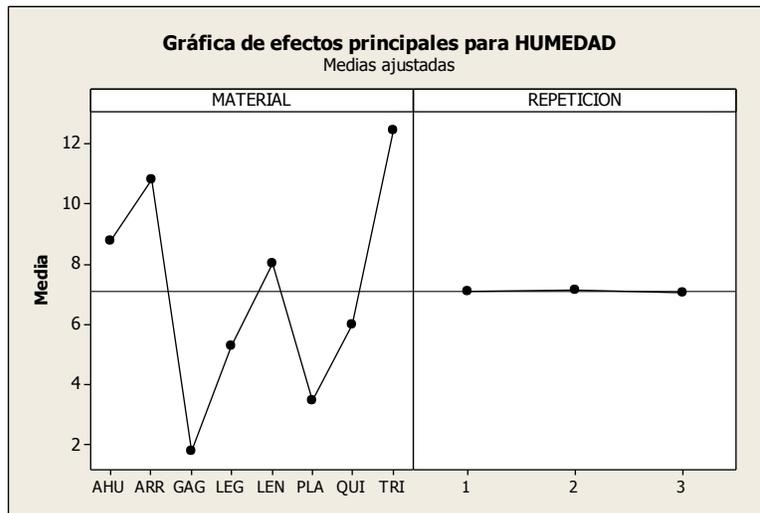
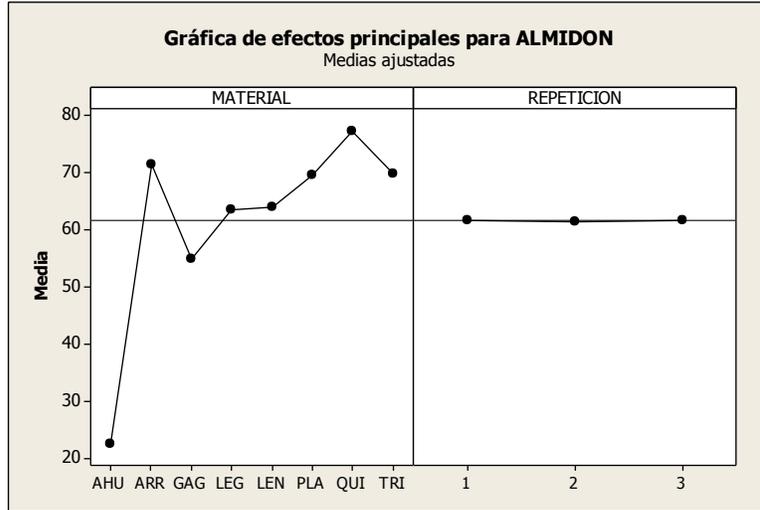
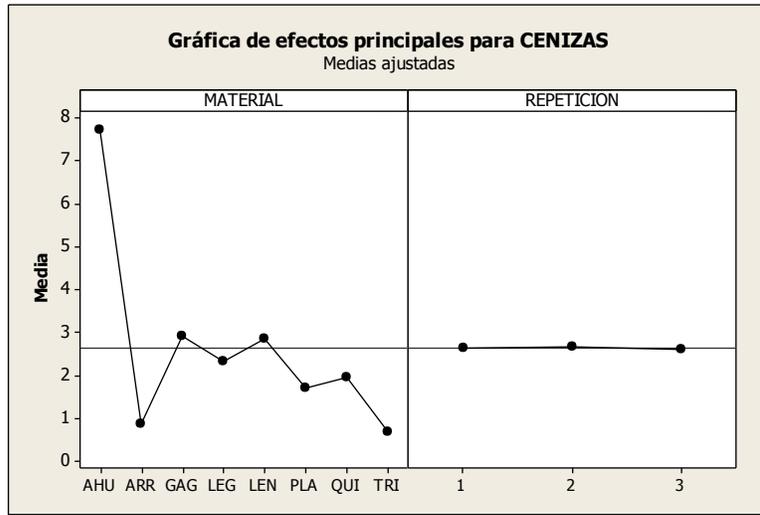




## Graficas de efectos principales:

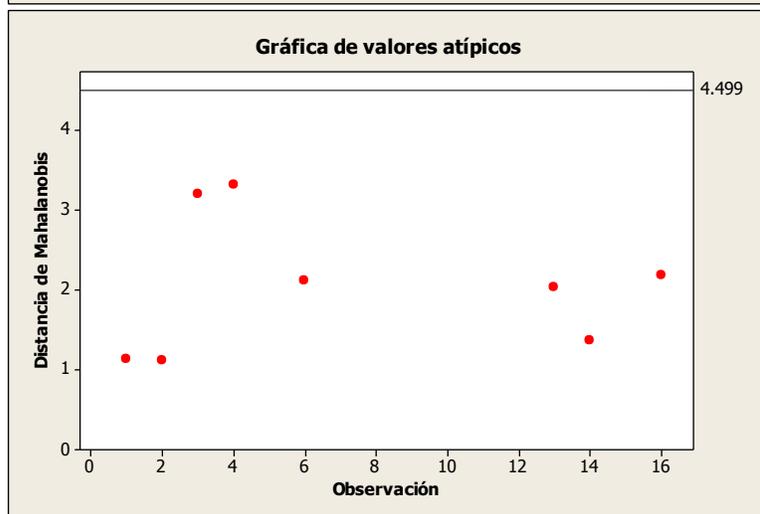
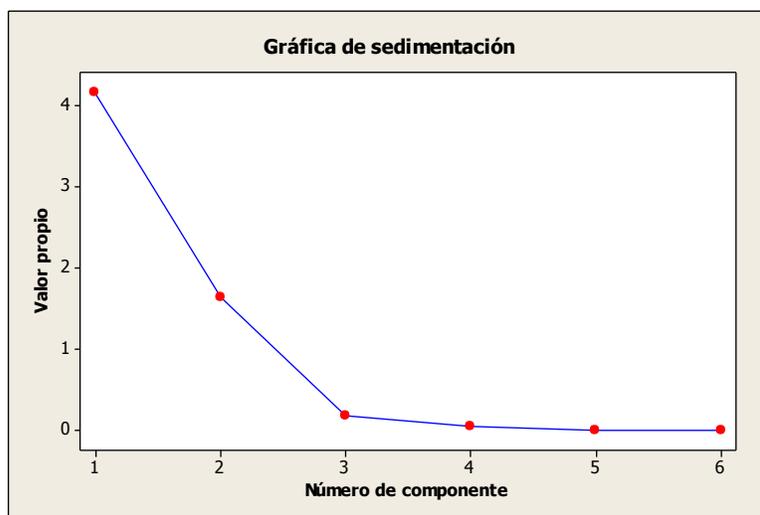






## ANEXO 6

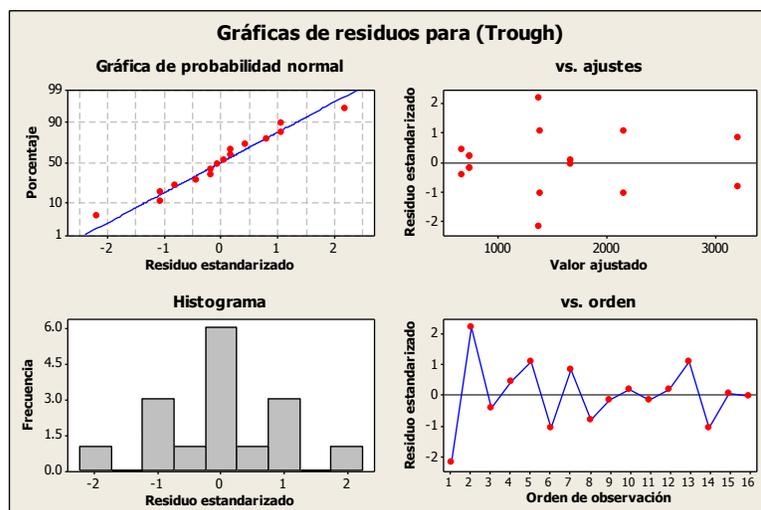
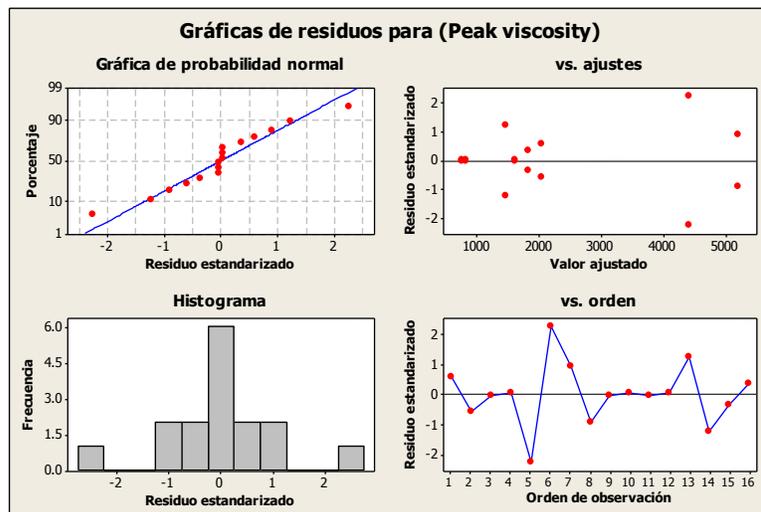
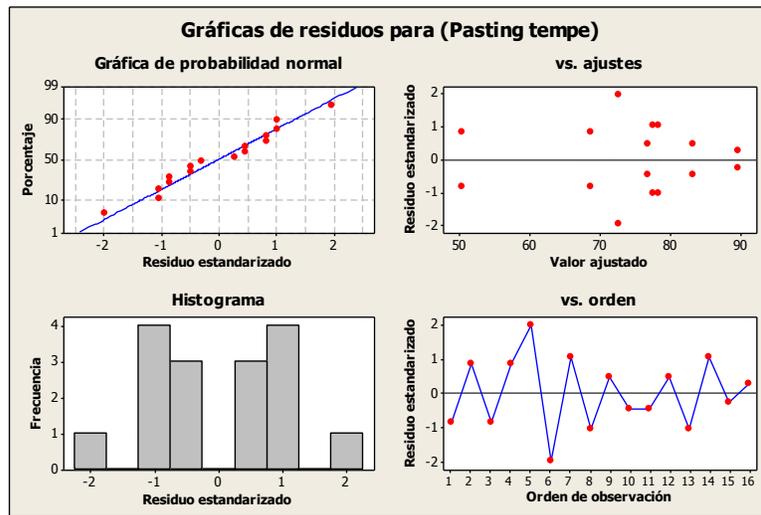
### ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA LAS PROPIEDADES DE EMPASTADO (RVA) DE LAS HARINAS EVALUADAS

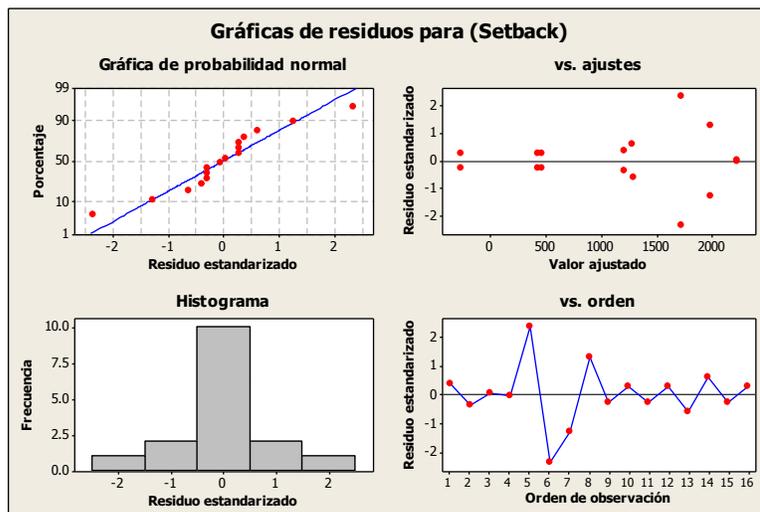
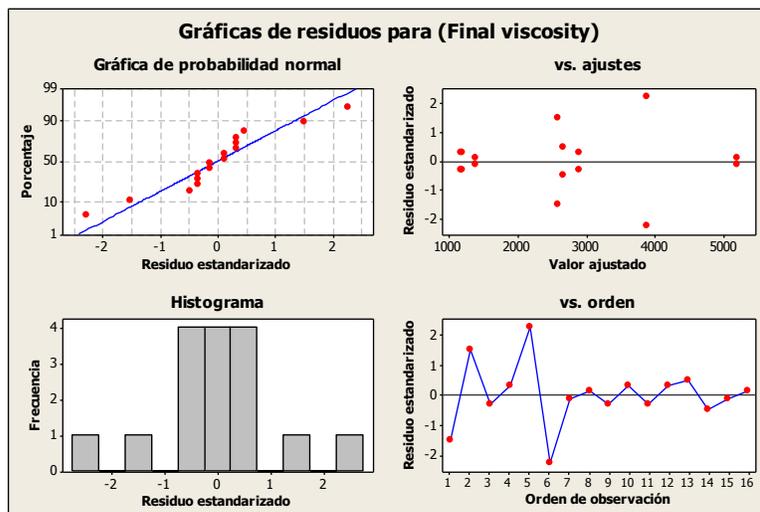
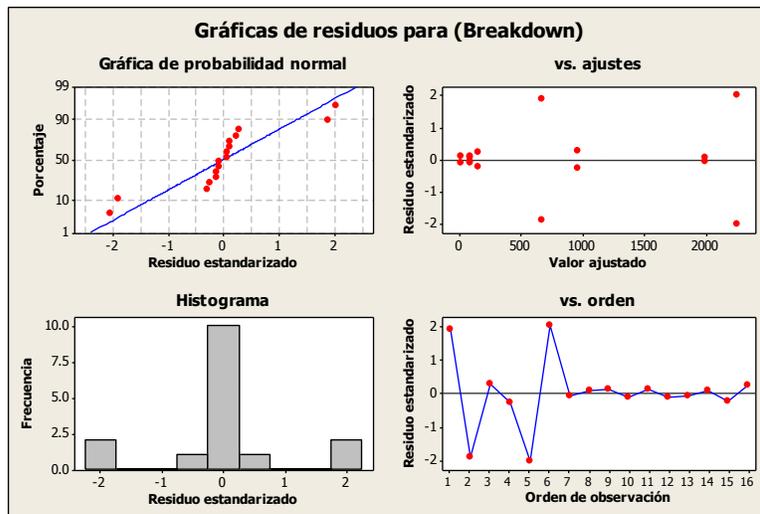


### Correlación de Pearson

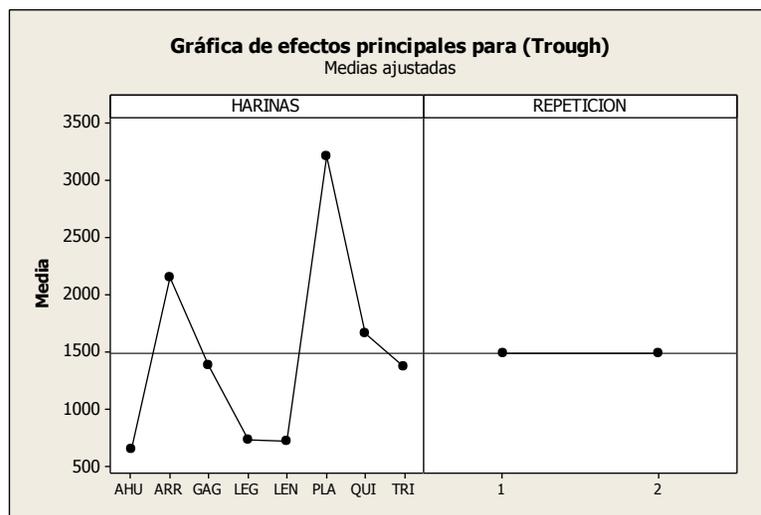
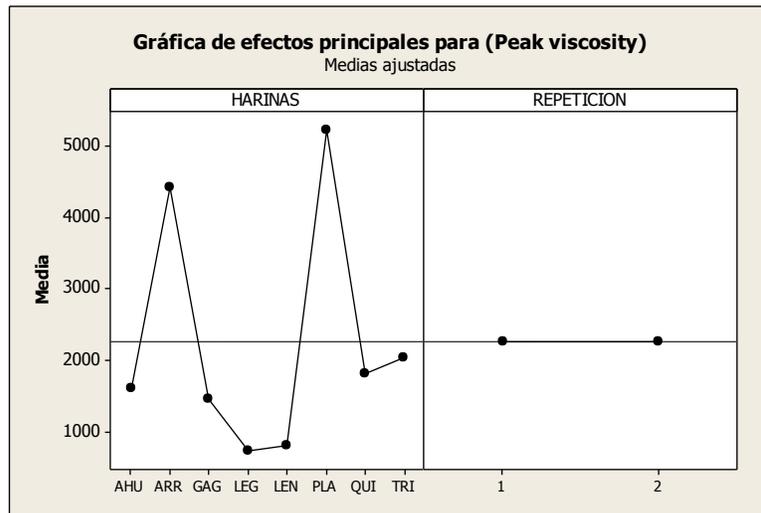
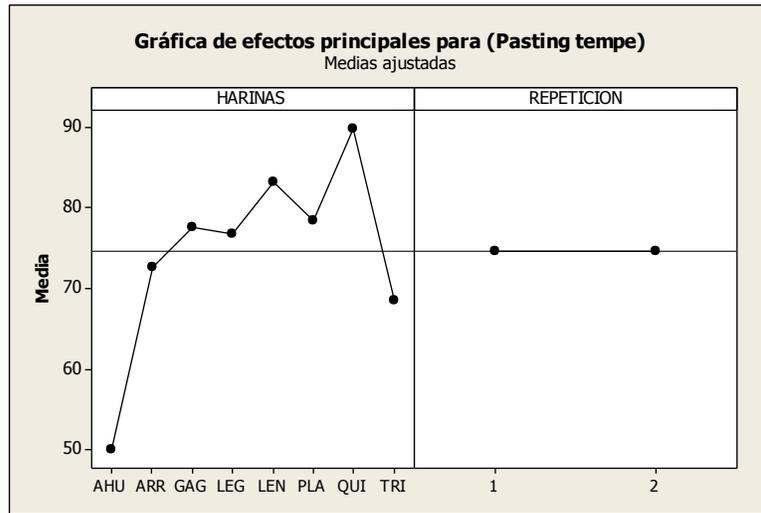
variables	Descripción	(Pasting tempe)	(Peak viscosity)	(Trough)	(Breakdown)	(Final viscosity)
(Peak viscosity)	correlacion	-0,006				
	valor p	0,983				
(Trough)	correlacion	0,285	0,928			
	valor p	0,284	0			
(Breakdown)	correlacion	-0,286	0,933	0,731		
	valor p	0,282	0	0,001		
(Final viscosity)	correlacion	-0,283	0,915	0,815	0,887	
	valor p	0,288	0	0	0	
(Setback)	correlacion	-0,749	0,562	0,326	0,713	0,813
	valor p	0,001	0,023	0,217	0,002	0

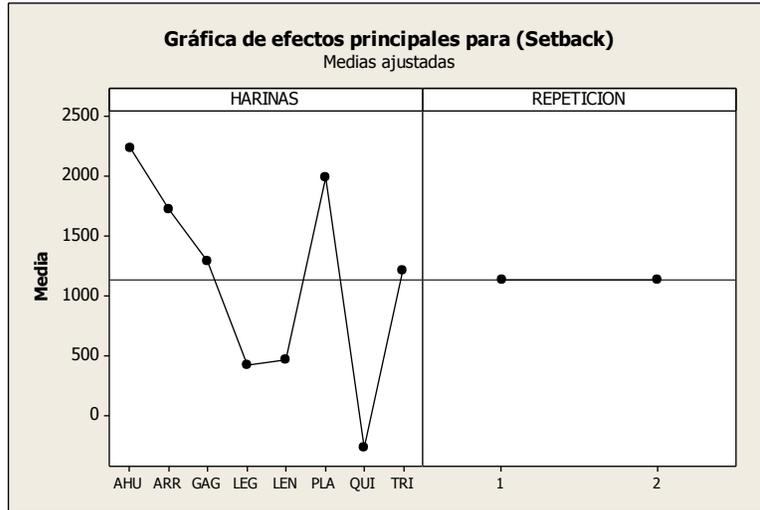
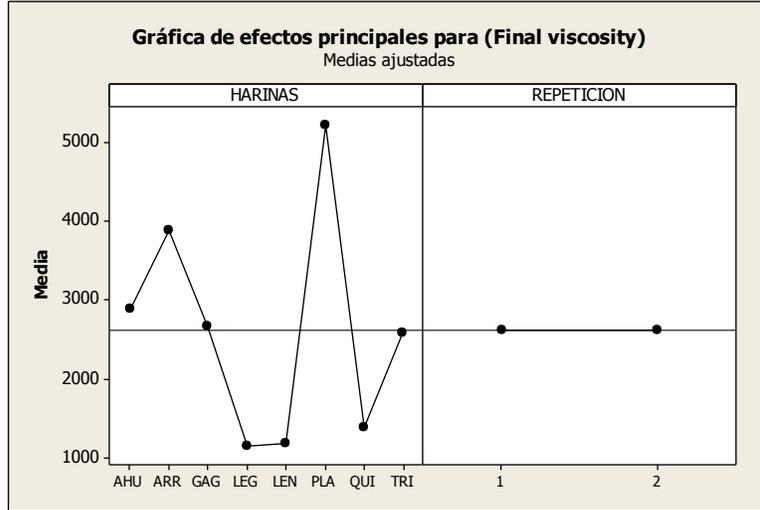
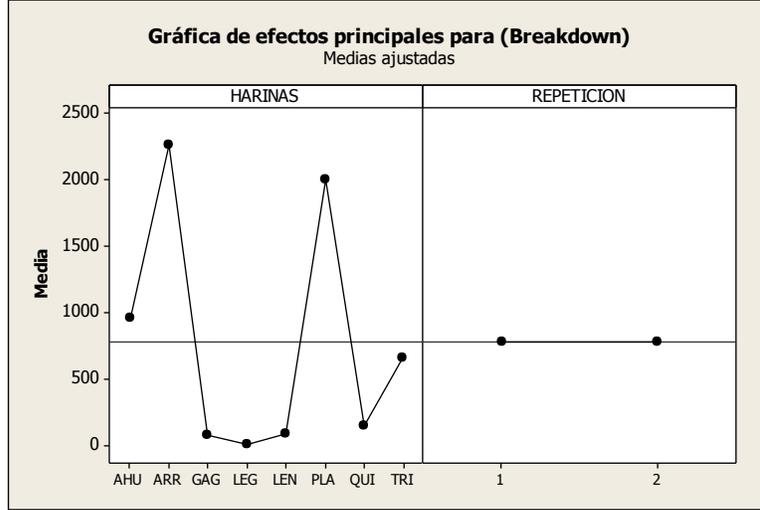
**Gráficas de residuo:** se cumplen los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia





## Graficas de efectos principales:





## ANEXO 7

### MODELO LINEAL GENERAL PARA DUREZA Y VOLUMEN ESPECÍFICO

