



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Efectos del procesamiento y la incorporación de harinas subvaloradas sobre las propiedades fisicoquímicas de productos alimentarios a base de maíz obtenidos mediante extrusión y laminación-tostado

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

Lic. Guido Rolandelli

Directora de tesis: Dra. María del Pilar Buera

Director adjunto: Dr. Abel Eduardo Farroni

Consejero de estudios: Dra. Marcela Tolaba

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ), UBA-CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 14 de diciembre de 2021

Efectos del procesamiento y la incorporación de harinas subvaloradas sobre las propiedades fisicoquímicas de productos alimentarios a base de maíz obtenidos mediante extrusión y laminación-tostado

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos de la inclusión de harinas de mijo, sorgo, quínoa y alpiste sobre las propiedades fisicoquímicas de productos alimentarios a base de maíz obtenidos mediante extrusión y laminación-tostado. Los procesos de elaboración fueron optimizados mediante diseños de experimentos, considerando propiedades físicas, organolépticas y visuales y la reducción del desarrollo de productos indeseados o reacciones de deterioro. Se realizó la caracterización fisicoquímica de los productos finales, incluyendo propiedades microestructurales, térmicas, mecánicas, así como el desarrollo de reacciones de deterioro y estabilidad durante el almacenamiento.

Las transformaciones producidas por los procesos termo-mecánicos a nivel molecular se analizaron a través de metodologías espectroscópicas, microscópicas y cromatográficas. Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas relacionadas a la movilidad del agua y las transiciones térmicas. Se establecieron relaciones entre la composición de las formulaciones, las interacciones entre los componentes principales y las características del producto final impartidas por los procesos. Estas permiten predecir propiedades macroscópicas a partir de características a nivel microestructural.

Las mezclas de harina de maíz con mijo, sorgo, quínoa y alpiste permitieron lograr productos con características innovadoras y distintivas, mostrando una potencial aplicación de estos cultivos subvalorados para el desarrollo de alimentos diferenciados destinados al consumo humano.

Palabras claves: Harina de maíz; Harinas subvaloradas; Extrusión; Laminación-tostado; Propiedades fisicoquímicas

Effects of processing and incorporation of undervalued flours on physicochemical properties of corn-based products obtained by extrusion and lamination-toasting

Abstract

The objective of the work was to evaluate the effects of the inclusion of millet, sorghum, quinoa, and canary seed flours on the physicochemical properties of corn-based food products obtained by extrusion and lamination-toasting. The manufacturing processes were optimized by design of experiments, considering physical, organoleptic, and visual properties and the reduction of the development of undesired products or deteriorating reactions. The physicochemical characterization of the final products, including microstructural, thermal, and mechanical properties, as well as the development of deteriorating reactions and storage stability was performed.

The transformations produced by the thermo-mechanical processes at molecular level were analyzed through spectroscopic, microscopic, and chromatographic techniques. Water mobility-related physicochemical properties and thermal transitions were studied. Relationships between formulation composition, principal components interactions and final product characteristics imparted by the processes were established. These relationships allow to predict macroscopic properties from microstructural characteristics.

Corn flour mixtures with millet, sorghum, quinoa and canary seed generated products with innovative and distinctive characteristics, showing a potential application of these undervalued crops for the development of differentiated products for human consumption.

Keywords: Corn flour; Undervalued flours; Extrusion; Lamination-toasting; Physicochemical properties

Agradecimientos

A la Dra. María del Pilar Buera por abrirme las puertas de sus laboratorios, por guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, transmitirme sus valores y conocimientos. Por su confianza y libertad de trabajo.

Al Dr. Abel Farroni por sus contribuciones y respaldo en mi formación y aprendizaje, por su constante apoyo y entrega en todo el proceso de formación.

A todos mis compañeros de los laboratorios 211 y 14 por su amistad y por ayudarme, apoyarme y acompañarme en todos estos años. Especial agradecimiento a Leonardo Favre, Tatiana Aguirre Calvo y Rocío Corfield.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca doctoral que permitió mi educación y entrenamiento en la investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA) por brindar el espacio y las herramientas para el desarrollo de las actividades.

A los Dres. Gustavo Fidel Gutiérrez-López del Instituto Politécnico Nacional (Méjico) y Jessy van Wyk de la Cape Peninsula University of Technology (Sudáfrica) por recibirme en sus laboratorios y ser partes fundamentales de la realización de esta tesis.

A todos los organismos que financiaron las tareas de investigación y estadías de formación: Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCYT), CONICET, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), UBA, Red de Macrourniversidades de América Latina y el Caribe y el Centro Argentino-Sudafricano en Nanotecnología (ASACEN).

*A mi familia y amigos,
que son mi raíz y mi horizonte*

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1 El maíz como ingrediente alimentario: composición, usos y aplicaciones	1
1.1.1 Estructura y composición del grano de maíz.....	2
1.1.1.1 Almidón.....	3
1.1.1.2 Proteínas.....	4
1.1.1.3 Lípidos	5
1.1.1.4 Fibra	6
1.1.1.5 Pigmentos carotenoides.....	6
1.1.1.6 Compuestos polifenólicos	7
1.2 Cereales y pseudocereales de interés alimentario para combinar con maíz.....	8
1.2.1 Mijo perlado (<i>Pennisetum glaucum</i>).....	8
1.2.2 Sorgo colorado (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench).....	11
1.2.3 Quínoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd).....	14
1.2.4 Alpiste (<i>Phalaris canariensis</i> L.)	17
1.3 Obtención de alimentos a base de maíz: procesos de extrusión y de cocción-laminación-tostado	20
1.3.1 Extrusión: fundamentos y principios de la técnica	20
1.3.2 Cocción-laminación-tostado: descripción general del proceso	22
1.4 Transformaciones fisicoquímicas de los componentes alimentarios durante el proceso de elaboración	24
1.4.1 Cambios en el contenido y la conformación de los componentes	24
1.4.1.1 Almidón.....	25
1.4.1.2 Proteínas.....	26
1.4.1.3 Lípidos	27
1.4.1.4 Fibra	28
1.4.2 Reacciones químicas asociadas a características organolépticas	29
1.4.2.1 Reacción de Maillard	29
1.4.2.2 Oxidación de lípidos	32
1.4.2.3 Descomposición de compuestos polifenólicos y carotenoides.....	35
1.4.3 Propiedades térmicas y procesos asociados al agua	36
1.4.3.1 Gelatinización.....	36
1.4.3.2 Retrogradación.....	37

1.4.3.3	Transición vítreo	38
1.4.3.4	Relajaciones entálpicas	40
1.4.3.5	Isotermas de adsorción de agua	41
1.4.3.6	Relajación magnética nuclear y movilidad molecular	42
2.	Objetivos	45
2.1	Objetivo general.....	45
2.2	Objetivos específicos	45
3.	Materiales y métodos	46
3.1	Sistemas extrudidos.....	46
3.1.1	Obtención de materias primas y preparación de mezclas de harinas	46
3.1.2	Extrusión: definición de condiciones del proceso	46
3.1.3	Composición proximal de materias primas y productos finales.....	48
3.1.4	Evaluación de propiedades físicas	48
3.1.4.1	Grado de expansión	48
3.1.4.2	Densidad aparente.....	48
3.1.4.3	Índices de solubilidad y absorción de agua (ISA e IAA)	49
3.1.5	Medición objetiva del color.....	50
3.1.6	Propiedades mecánicas.....	50
3.1.7	Evaluación de parámetros de forma y tamaño mediante análisis de imágenes ..	51
3.1.8	Difracción de rayos X (DRX).....	51
3.1.9	Microscopía de barrido electrónico (SEM)	52
3.1.10	Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)	52
3.1.11	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	53
3.1.12	Determinación de propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)	54
3.1.13	Movilidad molecular por resonancia magnética nuclear (¹ H-RMN).....	56
3.2	Productos laminados	59
3.2.1	Optimización del proceso mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) ..	59
3.2.1.1	Preparación de muestras.....	60
3.2.1.2	Evaluación del color mediante análisis de imágenes	61
3.2.1.3	Determinación del contenido de agua.....	62

3.2.1.4	Contenido de hidroximetilfurfural (HMF) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	62
3.2.1.5	Optimización y verificación del modelo.....	64
3.2.2	Preparación de mezclas	65
3.2.3	Pruebas de almacenamiento	65
3.2.3.1	Cambios de color	66
3.2.3.2	Actividad antioxidante	66
3.2.3.2.1	Obtención de extractos para evaluación de contenido de polifenoles y actividad antioxidante.....	66
3.2.3.2.2	Cuantificación de compuestos polifenólicos totales (CPT) por método de Folin-Ciocalteau	67
3.2.3.2.3	Método de captura de radicales por el reactivo de DPPH•	68
3.2.3.2.4	Método FRAP de evaluación de poder reductor	69
3.2.3.3	Extracción y evaluación de carotenoides	70
3.2.3.4	Determinación de absorbancia a 294 y 420 nm.....	71
3.2.3.5	Cuantificación de hidroperóxidos.....	71
3.3	Medición de contenido y actividad de agua	73
3.4	Modelado de isothermas de adsorción de agua	73
3.5	Espectroscopía infrarroja y Raman con transformada de Fourier (FT-IR y FT-Raman).....	75
3.5.1	Sistemas extrudidos	75
3.5.2	Sistemas laminados	76
3.6	Ánálisis estadístico.....	76
4.	Resultados y discusión	78
4.1	Sistemas extrudidos.....	78
4.1.1	Composición proximal	78
4.1.2	Caracterización de propiedades físicas y mecánicas	81
4.1.3	Evaluación de color.....	84
4.1.4	Parámetros de forma y tamaño medidos por análisis de imágenes	87
4.1.5	Difracción de rayos X (DRX).....	88
4.1.6	Modelado de las isothermas de adsorción de agua.....	91
4.1.7	Propiedades térmicas.....	96
4.1.8	Movilidad molecular por resonancia magnética nuclear (¹ H-RMN).....	105

4.1.8.1	Decaimiento libre de la inducción (FID)	106
4.1.8.2	Ecos de espín de Hahn	112
4.1.8.3	CPMG	122
4.1.9	Microscopía de barrido electrónico (SEM)	124
4.1.10	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	127
4.1.11	Espectroscopía Raman con transformada de Fourier (FT-Raman)	133
4.1.12	Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)	138
4.1.13	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	143
4.2	Sistemas laminados	147
4.2.1	Optimización del proceso de obtención mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)	147
4.2.1.1	Modelado matemático de las variables respuesta.....	147
4.2.1.2	Modelado matemático para los parámetros de color CIELAB	149
4.2.1.3	Modelado matemático para el contenido final de agua	155
4.2.1.4	Modelado matemático para la formación de HMF.....	157
4.2.1.5	Condiciones óptimas, función de deseabilidad y validación del modelo	159
4.2.1.6	Discusión general.....	160
4.2.2	Isotermas de adsorción de agua	164
4.2.3	Pruebas de estabilidad durante almacenamiento	168
4.2.3.1	Actividad de agua (a_w)	168
4.2.3.2	Compuestos intermediarios y pardos	172
4.2.3.3	Color	174
4.2.3.4	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	179
4.2.3.5	CPT y actividad antioxidante	186
4.2.3.6	Carotenoides	189
4.2.3.7	Cuantificación de hidroperóxidos.....	191
5.	Resultados destacados y discusión final.....	195
6.	Conclusiones.....	202
7.	Referencias	207

1. Introducción

1.1 El maíz como ingrediente alimentario: composición, usos y aplicaciones

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes a nivel mundial, junto con el arroz y el trigo. Pertenece a la familia *Poaceae*, forma parte de la alimentación básica en muchos países de América Latina, África y Asia, donde se consume directamente de la mazorca o cuyos granos se utilizan para la elaboración de una variedad de platos tradicionales (Ai y Jane, 2016).

En Argentina el maíz es el segundo cultivo más importante, detrás de la soja y antes que el trigo. Durante la campaña 2020/2021, del total de la superficie sembrada (36,6 millones de hectáreas), se destinaron 7,3 millones a la producción de maíz, generando un total de 51 millones de toneladas de granos, con un precio que ronda los U\$S 150 por tonelada. Sin embargo, aproximadamente un 67 % del total se destina al mercado externo en su venta como grano, 25 % para el consumo animal como forraje y sólo el 8 % restante es aprovechado por la industria para su transformación y agregado de valor, de los cuales alrededor del 45 % se utilizan para la producción de etanol y derivados. Esto deja sólo un total aproximado de 2 millones de toneladas destinadas a la molienda seca, molienda húmeda y otras industrias (Ministerio de Desarrollo Productivo, 2021; Bolsa de Comercio de Rosario, 2021).

La molienda húmeda es la vía de industrialización principal del grano de maíz, a partir de la cual se obtienen principalmente el almidón y aceite de maíz, y productos derivados como jarabes y otros endulzantes calóricos. Como subproductos de esta molienda se obtienen los llamados gluten *meal* y gluten *feed*, que se utilizan como forraje en la nutrición animal. Por su parte, la molienda seca, que representa un porcentaje muy pequeño de la transformación industrial de maíz, produce harina de maíz, sémola, *grits* y salvado, que son utilizados para la

elaboración de alimentos tales como cereales para el desayuno, *snacks* (bocaditos o aperitivos), productos panificados, entre otros.

1.1.1 Estructura y composición del grano de maíz

Existen distintas variedades de maíz, con características diferenciadas, incluyendo coloración, forma, tamaño, dureza y composición, entre otros, utilizados con distintos fines (Suriano y col., 2021). La variedad “*Flint*” o amarillo es muy valorada a nivel industrial por su dureza y contenido de pigmentos, y se utiliza para la elaboración de harinas y productos derivados, como barras de cereal, copos para el desayuno, etc. (Farroni, 2011; Cueto, 2016). Esta variedad surgió como un híbrido a partir de germoplasmas de las variedades tipo Plata originarias y Argentina es una de las principales productoras y exportadoras a nivel mundial (Farroni, 2011). En la Figura 1 se muestra la estructura general del grano de maíz colorado.

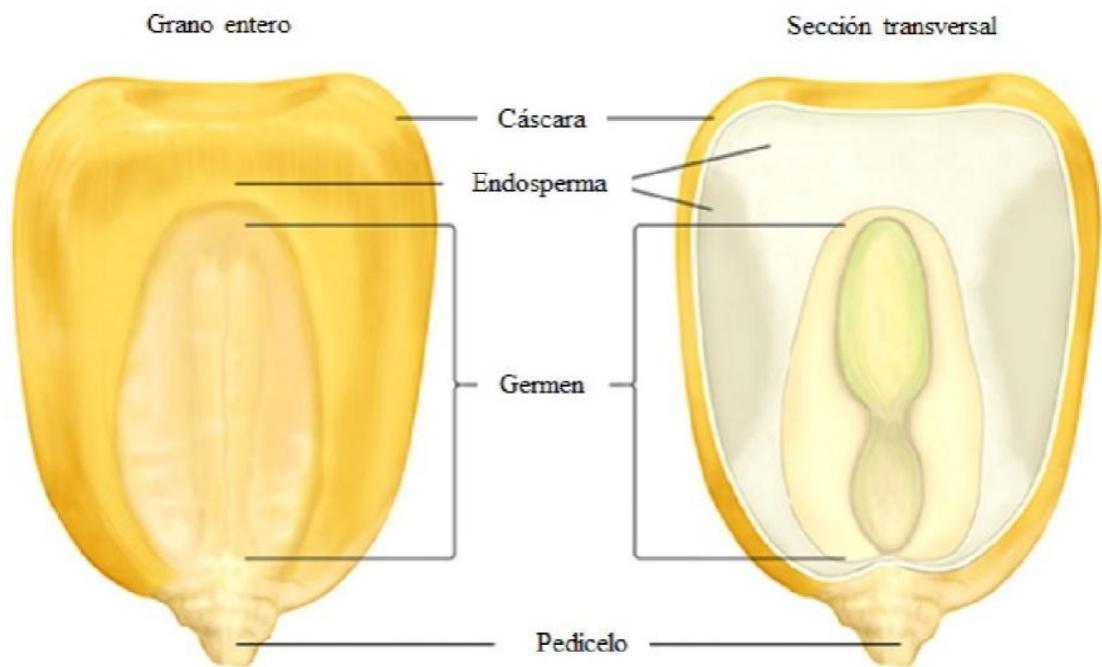


Figura 1: Estructura general del grano de maíz (adaptado de Ai y Jane, 2016).

Según puede verse en la Figura 1, se diferencian cuatro secciones principales: el endosperma, que representa aproximadamente el 80-85 % del peso del grano, el germen, responsable del 10-12 % de la masa total, la cáscara y el pedicelo, que reúnen el 5 % y 1 % del peso total del grano, respectivamente (Shah, Prasad y Kumar, 2016; Ai y Jane, 2016).

1.1.1.1 Almidón

El almidón es el componente principal del grano de maíz, siendo responsable del 70-80 % del peso total, según la variedad, y se encuentra predominantemente en el endosperma en forma de gránulos poligonales de 2-30 μm (Mir y col., 2016). Los gránulos se encuentran rodeados por las proteínas de reserva de maíz, zeínas y glutelinas. Las asociaciones entre los gránulos de almidón y las proteínas de reserva son las principales responsables de las propiedades mecánicas, texturales y microestructurales de los productos a base de maíz (Batterman-Azcona y Hamaker, 1998; Chanvrier y col., 2005; Chaunier, Della Valle y Lourdin, 2007).

Al igual que en la mayoría de los cereales, el almidón de maíz se encuentra formado por dos tipos de polisacáridos de elevado peso molecular: amilosa y amilopectina. La amilosa es mayoritariamente un polisacárido lineal formado por moléculas de α -D-glucosa unidas mediante enlaces α -1,4, con muy pocas ramificaciones dadas por enlaces α -1,6. Esta disposición estructural de la amilosa, favorecida por enlaces de hidrógeno entre moléculas de glucosa adyacentes, promueve la formación de una estructura helicoidal, en cuyo interior se disponen átomos de hidrógeno y carbono (Zobel, 1988; Mua y Jackson, 1997). Esta estructura tridimensional infiere características hidrofóbicas en el interior de la hélice y favorece la asociación de la amilosa con ácidos grasos u otros componentes hidrofóbicos (Zobel, 1988). Por su parte, la amilopectina es un polisacárido con cadenas lineales de menor extensión que

la amilosa, pero con un mayor número de ramificaciones dadas por enlaces α -1,6. La disposición más compacta de las dobles hélices de amilopectina entre sí confiere al almidón de maíz la forma cristalina tipo A (Mir y col., 2016; Singh y col., 2003). En promedio, el almidón de maíz se compone por 27 % de amilosa y 73 % de amilopectina, aunque los valores cambian según la variedad y las condiciones de cultivo (Zobel, 1988; Mua y Jackson, 1997).

En el interior del gránulo, el almidón se presenta en regiones semicristalinas y amorfas alternadas (Farroni, 2011). La porción cristalina corresponde a asociaciones de las cadenas lineales de amilosa, mientras que la región amorfá corresponde a las ramificaciones y es más susceptible al ataque enzimático o hidrolítico, por su menor densidad. Las modificaciones que sufra el almidón como consecuencia de la manipulación del grano de maíz (molienda, cocción, asociaciones con otros componentes, etc.) se verán reflejadas en cambios estructurales, que serán utilizados para monitorear y evaluar los impactos del procesamiento (Chanvrier y col., 2005).

1.1.1.2 Proteínas

El maíz contiene 8-9 % de proteínas, de las cuales aproximadamente un 60 % corresponde a las zeínas, que son las proteínas de almacenamiento, ubicadas principalmente en el endosperma del grano en forma de cuerpos proteicos. Si bien el maíz presenta distintos tipos de zeínas, las que se encuentran en mayor proporción son las α -zeínas, que constituyen el 75-85 % del total. Éstas se conforman de dos polipéptidos con una masa molecular relativa de 19,000 y 22,000 kDa y se ubican en el centro de los cuerpos proteicos. De naturaleza altamente hidrofóbica, las α -zeínas contienen elevadas cantidades de glutamina y leucina, además de otros aminoácidos hidrofóbicos (Batterman-Azcona y Hamaker, 1998). Al igual que en la

mayoría de los cereales, el maíz es deficiente en lisina, que es su aminoácido limitante (Ai y Jane, 2016), pero tiene buena proporción de aminoácidos esenciales azufrados. Por su naturaleza y asociaciones con el almidón, las proteínas también son responsables de las propiedades mecánicas, texturales y estructurales del maíz y sus productos derivados (Chaunier y col., 2007; Chanvrier y col., 2005). Por lo tanto, y de manera similar al almidón, las modificaciones que sufran las proteínas durante el procesamiento repercutirán no sólo a nivel nutricional, sino también en la definición de las características finales de los productos.

1.1.1.3 Lípidos

El contenido total de lípidos en los granos de maíz alcanza valores de 3-6 %, y se ubican mayoritariamente en el germen. Los triglicéridos se encuentran compuestos por 55 % de ácido linoleico (18:2), que es un ácido graso esencial, 28 % de ácido oleico (18:1), 13 % de ácido palmítico (16:0) y 2 % de ácido esteárico (18:0) (Strocchi, 1982). Al igual que el resto de los componentes del grano, pueden sufrir transformaciones como consecuencia del procesamiento durante la elaboración de alimentos. Entre ellas se encuentra la formación de complejos amilosa-lípidos, en los cuales el material lipídico se incluye en el interior de la hélice de amilosa, que tiene propiedades hidrofóbicas (Cueto y col., 2018; Jafari y col., 2017) (Sección 1.1.1.1). En la mayoría de los casos, para la elaboración de alimentos a base de maíz con bajo contenido de humedad, el germen del grano suele eliminarse para evitar el proceso de rancidez oxidativa que se encuentra favorecido en estas condiciones (Labuza y Dugan, 1971). Por ello, en la elaboración de productos con estas características, suelen utilizarse las porciones del endosperma de maíz partido, que recibe el nombre de *grit* de maíz (Cueto y col., 2018; Farroni y col., 2012).

1.1.1.4 Fibra

El maíz contiene hasta 6 % de fibra, compuesta principalmente por celulosa (22 %) y hemicelulosa (70 %), que se encuentran en la cáscara del grano. La celulosa es un polisacárido lineal, compuesto por moléculas de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces β -1,4. Por su parte, la hemicelulosa está formada por unidades de arabinoxilanos y glucuronoxilanos, con diferentes sustituyentes en la cadena, incluyendo arabinosa, xilosa, galactosa, entre otros (Ai y Jean, 2016). El salvado o la cáscara de maíz se incluye en las formulaciones alimentarias para aumentar el contenido de fibra dietaria de los productos, que tiene beneficios en la salud, tales como disminución del índice glucémico, así como control de los niveles de triglicéridos y colesterol, prevención del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, sobrepeso y obesidad (Sheng, Li, y Liu, 2018).

1.1.1.5 Pigmentos carotenoides

Los maíces coloreados, y en particular la variedad *Flint*, contienen elevadas cantidades de luteína, zeaxantina y, en menor proporción, β -criptoxantina. Estos compuestos, a diferencia del α - y β -caroteno que se encuentran en menor proporción en este tipo de maíz, son xantofilas que no presentan actividad pro-vitamina A, pero que tienen propiedades antioxidantes y protegen al ojo del daño oxidativo dado por la luz azul (Rouf Shah, Prasad, y Kumar, 2016; Sheng y col., 2018). En promedio, el maíz contiene 22 $\mu\text{g/g}$ de xantofilas, de las cuales 15,5 $\mu\text{g/g}$ corresponden a luteína, 6 $\mu\text{g/g}$ a zeaxantina y 0,5 $\mu\text{g/g}$ a β -criptoxantina. Estos pigmentos son los responsables de la coloración amarillenta del grano, ubicándose mayoritariamente en la cáscara. Dada su disposición, asociaciones con otros componentes del grano y por su naturaleza hidrofóbica, ciertos procesos tecnológicos que involucren aporte de energía

mecánica y procesos térmicos suelen favorecer la exposición y biodisponibilidad de estos carotenoides (Ortak y col., 2017). Si bien su contenido total suele disminuir frente a estas condiciones (Cueto y col., 2017), el trabajo mecánico y el aporte energético pueden favorecer la ruptura de la estructura celular que los contiene o también facilitar la disociación con las zeínas, con quienes interactúan por su carácter hidrofóbico, aumentando su liberación o exposición (Ortak y col., 2017; Rolandelli y col., 2021).

1.1.1.6 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos presentan estructuras con uno o más anillos aromáticos y uno o varios grupos oxhidrilo. Se caracterizan por su actividad fisiológica antioxidante, antiinflamatoria y protectora frente al desarrollo de ciertas enfermedades (Rouf Shah y col., 2016), pero tienen, además, implicancias en la conservación de alimentos, ya que cumplen función protectora de estructuras oxidables. Dentro de ellos, en el maíz se encuentran mayormente ácidos fenólicos y flavonoides, que se ubican preferentemente en la cáscara del grano. En el primer grupo se destacan los derivados del ácido benzoico y ácido cinámico, tales como el ácido ferúlico y *p*-cumárico, mientras que en el segundo priman las antocianinas, como cianidin-3-glucósido o perlagonidin-3-glucósido. Si bien su contenido cambia según la variedad, en los maíces amarillos se encuentran los valores más altos de compuestos polifenólicos totales (CPT), con 280-300 mg de equivalente de ácido gálico cada 100 g de maíz, en base seca (Sheng y col., 2018). De todos modos, es importante destacar el elevado contenido de antocianinas en los maíces azules-violáceos o rojos-rosáceos, responsables de su pigmentación distintiva. En el grano los compuestos polifenólicos pueden encontrarse libres o unidos a otros componentes, tales como fibra o proteínas. Por este motivo, y de manera similar a los carotenoides, el procesamiento tecnológico puede favorecer la liberación de estos

compuestos y/o exaltar las propiedades antioxidantes del alimento (Kim y col., 2020; Călinoiu y Vodnar, 2020).

1.2 Cereales y pseudocereales de interés alimentario para combinar con maíz

1.2.1 Mijo perlado (*Pennisetum glaucum*)

El mijo es un cereal que pertenece a la familia *Poaceae* y comprende un grupo de 7 tipos de cultivos, con diferentes colores, formas, tamaños y regiones de procedencia (Figura 2).



Figura 2: Los siete tipos de cultivos de mijo (adaptado de Mahajan y col., 2021).

India es el mayor productor con 10 millones de toneladas anuales, seguido por Nigeria y Sudán, con 7 y 4 millones de toneladas, respectivamente (Yousaf y col., 2021). La gran mayoría del área sembrada se ubica en países de Asia y África ya que presentan las mejores condiciones para el crecimiento del grano. El mijo se adapta a ambientes áridos o semi-áridos con elevadas temperaturas, tiene cortos períodos de cultivación y bajos requerimientos hídricos, lo cual representa una ventaja respecto al maíz u otros cultivos tradicionales (Mahajan y col., 2021; Sruthi y Rao, 2021). Por este motivo también resulta una fuente de energía de bajo costo para las poblaciones africanas y asiáticas, quienes lo consumen en platos típicos como sopas, guisos, ensaladas, panes, galletitas, *snacks* o pastas (Yousaf y col., 2021).

De las siete variedades, el mijo perlado (*Pennisetum glaucum*) es la más cultivada y contiene mayores niveles de proteínas y lípidos que el resto (Dias-Martins y col., 2018; Yousaf y col., 2021). Sus granos presentan forma ovalada similar a una perla, de la cual deriva su nombre, con un tamaño de 3 o 4 mm. La composición nutricional aproximada del mijo perlado es: 65-75 % de carbohidratos, 9-15 % de proteínas, 5-10 % de lípidos, 3-8 % de fibra dietaria y 2-3 % de cenizas (Sruthi y Rao, 2021; Yousaf y col., 2021; Dias-Martins y col., 2018). Se destaca su menor contenido de carbohidratos y mayores niveles de proteínas y lípidos que el maíz, pero con un germen de mayor tamaño (≈ 21 % del peso del grano), responsable de su alto contenido lipídico, que resulta difícil de separar (Mahajan y col., 2021). Similarmente al maíz, en el endosperma se destaca la presencia de los gránulos de almidón, con un 26 % de amilosa, de forma redondeada y empacados dentro de una matriz proteica (Taylor y Emmambux, 2008).

En particular, el mijo perlado presenta un contenido relativo elevado de proteínas del tipo albúminas y globulinas (25-26 %), que son ricas en aminoácidos esenciales, principalmente leucina e isoleucina, y una menor proporción de proteínas del tipo prolamina (31-44 %), con

reducida calidad nutricional (Taylor y Emmambux, 2008). Su contenido de metionina y lisina es bajo, al igual que en la mayoría de los cereales. Esto hace que la proteína del mijo perlado cumpla con los requisitos de la FAO para adultos, pero no para infantes o niños (Dias-Martins y col., 2018).

Respecto a la composición de los lípidos, predomina el ácido linoleico (43-45 %), ácido oleico (26-27 %) y ácido palmítico (20-21 %). Como en la mayoría de los granos con elevado contenido lipídico, también se encuentran cantidades abundantes de vitamina E (Taylor y Emmambux, 2008). Sin embargo, el mijo perlado es altamente susceptible a sufrir deterioro por oxidación de sus ácidos grasos insaturados, principalmente durante la molienda y el procesamiento, dado su elevado porcentaje de aceite.

Al igual que para el resto de los cereales, es aconsejable la utilización del grano de mijo perlado de forma integral, con el objetivo de aprovechar los beneficios de la fibra y los compuestos polifenólicos presentes en la cáscara, de forma libre o unida. Los polifenoles se generan como productos secundarios del metabolismo de la planta y son los responsables de la coloración del grano. Además, tienen reportados beneficios en la salud, ya que reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas al estrés oxidativo (Lestienne y col., 2007). En comparación con el maíz, el mijo perlado presenta mayores contenidos de compuestos polifenólicos y también mayor capacidad antioxidante (Dias-Martins y col., 2018). Si bien sus niveles de factores antinutricionales son considerables, el procesamiento térmico disminuye significativamente estos valores, lo que hace seguro su consumo.

1.2.2 Sorgo colorado (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

El sorgo también es un cereal de la familia *Poaceae* y es el quinto cultivo de mayor producción en el mundo, luego del maíz, arroz, trigo y cebada. Típicamente el grano de sorgo es de 4 mm de longitud, conformado por el pericarpio, el germen y el endosperma, de forma mayormente esférica pero achata en la región del germen (Taylor y Emmambux, 2008). Existen sorgos de distintas coloraciones, variando del blanco al negro, pasando por tonalidades rojas y marrones (Figura 3), que se atribuyen principalmente a la composición de los pigmentos presentes en la porción externa de la semilla, principalmente del grupo de los polifenoles (Rashwan y col., 2021).



Figura 3: Las distintas variedades de sorgo (adaptado de Rashwan y col., 2021).

De manera similar al maíz, se adapta a condiciones de crecimiento en ambientes áridos, con pocas precipitaciones, elevadas temperaturas y bajos requerimientos nutricionales, lo que representa una ventaja respecto a otros cereales tradicionales. Por estos motivos, la principal

región de producción es en África, América y Asia, con aproximadamente 60 millones de toneladas anuales (Rashwan y col., 2021).

La utilización del sorgo como ingrediente para consumo humano, aunque crece anualmente, continúa siendo muy limitada, ya que su principal aprovechamiento es como alimento para animales o para la producción de etanol (Awika y Rooney, 2004). Entre sus aplicaciones como ingrediente se utiliza el sorgo en la preparación de *snacks*, galletitas, sopas, panificados, malta para cerveza y como cereal para desayuno o barras de cereal en su versión de grano inflado (Althwab y col., 2015).

El grano de sorgo se compone principalmente de un 75-77 % de carbohidratos, 11-12 % de proteínas, 6-7 % de fibra, 3-4 % de lípidos y 1-3 % de cenizas, sin grandes diferencias entre las distintas variedades (Taylor y Emmambux, 2008; Althwab y col., 2015). Las proteínas del sorgo, llamadas α -karfirinas, se encuentran en el interior de cuerpos proteicos conformados por karfirinas del tipo β - y γ - que se entrecruzan mediante puentes disulfuro, dificultando el acceso de las proteasas correspondientes y disminuyendo su digestibilidad. Al igual que en la mayoría de los cereales, las α -karfirinas presentan bajos niveles de aminoácidos esenciales como lisina o metionina (Taylor y col., 2014). Respecto al perfil de ácidos grasos, los lípidos del sorgo se componen principalmente de ácido linoleico (30-50 %), ácido oleico (30-40 %) y ácido palmítico (10-20 %) (Mehmood y col., 2008).

Las mayores diferencias entre las variedades de sorgo se dan en el contenido y tipo de compuestos bioactivos presentes, como compuestos polifenólicos totales, flavonoides, pro-antocianinas (taninos condensados), entre otros, donde el sorgo rojo o colorado presenta los mayores niveles (Rashwan y col., 2021; Awika y Rooney, 2004). Existen numerosos estudios que demuestran los efectos benéficos del consumo de sorgo, atribuidos a los compuestos

bioactivos presentes y sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, etc. (Taylor y col., 2014; Awika y Rooney, 2004; Althwab y col., 2015).

Una de las principales limitantes en el uso del sorgo es su elevado contenido de factores anti nutricionales en algunas variedades, entre ellos el ácido fítico (que reduce la biodisponibilidad de minerales por su habilidad de quelar metales multivalentes), inhibidores de tripsina y, de mayor relevancia, los taninos, que reducen la digestibilidad de las proteínas. El mecanismo inhibitorio de los taninos radica en su capacidad para formar complejos con las proteínas a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, a la vez que los grupos fenólicos actúan como moléculas donadoras de hidrógeno a los grupos carboxílicos de las proteínas. Estas interacciones pueden llevar a la precipitación de las proteínas cuando los taninos se encuentran en exceso (Rashwan y col., 2021). De todas maneras, durante el procesamiento tecnológico del grano, en etapas de fermentación, remojo, cocción, entre otras, se reducen significativamente los niveles de factores anti nutricionales, haciendo seguro su consumo.

1.2.3 Quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

La quínoa es un pseudocereal perteneciente a la familia *Chenopodiaceae*, cultivada principalmente en la región andina de Sudamérica, en países como Bolivia y Perú, que concentran la mayor producción mundial, seguidos por Chile y Ecuador (Taylor y Emmambux, 2008). En Argentina la producción es incipiente, pero está en aumento. Tiene una amplia adaptación a distintas condiciones climáticas, hídricas, salinas y de suelo, lo que la distingue del resto de los cultivos y ha facilitado su distribución al resto de las regiones del mundo (Scanlin y Lewis, 2017). Sus principales formas de consumo incluyen la preparación de sopas,

o como grano expandido como cereal para desayuno o barras de cereales. Su harina se utiliza para la preparación de productos de panadería como galletitas, pastas, panificados o también, a través de procesos de fermentación, se obtienen bebidas alcohólicas a base de quínoa (Navruz-Varli y Sanlier, 2016; Nowak, Du y Charrondière, 2016).

La semilla corresponde al grupo de las dicotiledóneas y presenta forma de disco, con un tamaño que varía entre 1 y 3 mm. Consiste en un pericarpo, una cubierta de semilla que está por debajo del pericarpo, un embrión y una radícula que se encuentra enrollada alrededor del perisperma (Taylor y Emmambux, 2008) (Figura 4). El perisperma representa el 52 % del peso de la semilla y se encuentra constituido principalmente por almidón, mientras que, en el pericarpo, la cubierta y el embrión se concentran las proteínas, lípidos, fibra y cenizas (Scanlin y Lewis, 2017).

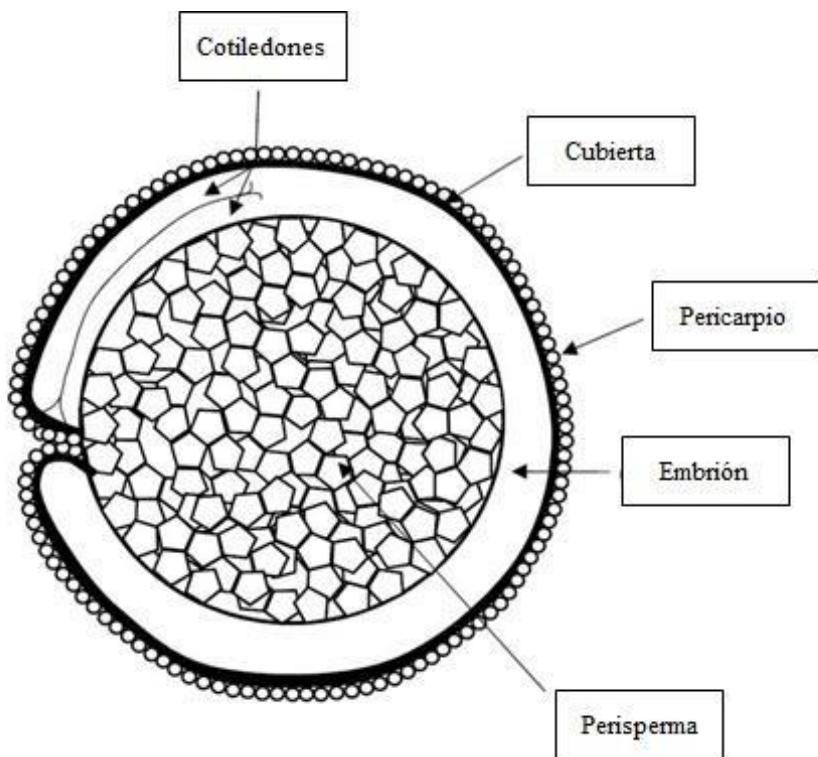


Figura 4: Esquema de la semilla de quínoa (adaptado de Alonso-Miravalles y O'Mahony, 2018).

Típicamente el valor nutricional y funcional de la quínoa es superior al de los cereales, por su elevado contenido proteico, de fibra y lípidos y buen perfil de aminoácidos esenciales. La composición centesimal incluye 60-70 % de carbohidratos, 13-15 % de proteínas, 5-7 % de lípidos, 7-12 % de fibra y 2-4 % de cenizas (Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017; Navruz-Varli y Sanlier, 2016). El almidón es el principal carbohidrato de la quínoa y se ubica principalmente en el perisperma en forma de pequeños gránulos de 1-2,5 μm de diámetro (Taylor y Emmambux, 2008). Su menor contenido de amilosa (3-20 %) respecto a otros cultivos tradicionales le otorga mayor estabilidad al proceso de congelación-descongelación, resistencia a la retrogradación y menores temperaturas de gelatinización, lo cual permite su uso como agente espesante y para generar texturas cremosas en productos con bajo contenido graso (Scanlin y Lewis, 2017; Navruz-Varli y Sanlier, 2016). Por su parte, las proteínas de la quínoa se ubican en el embrión y pertenecen al tipo globulinas (37 %) y albúminas (35 %), siendo la de mayor importancia la globulina 11S. La calidad proteica es similar a la caseína y, a diferencia de los cereales, es rica en lisina y otros aminoácidos esenciales como cisteína, metionina, treonina, histidina y arginina (Taylor y Emmambux, 2008; Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017). Los lípidos de la quínoa se concentran en el germen de la semilla y se encuentran en proporciones mayores al de los cereales. Se componen mayoritariamente de ácido linoleico (50-55 %), ácido oleico (20-30 %), α -linolénico (9-12 %) y ácido palmítico (10 %) (Navruz-Varli y Sanlier, 2016; Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017). Del contenido total de fibra de la quínoa, un 78 % corresponde a la porción insoluble, compuesta principalmente por homogalacturonanos, xiloglucanos y celulosa, mientras el 22 % restante de fibra soluble la componen homogalacturonanos y arabinanos (Scanlin y Lewis, 2017).

Una de las características distintivas de la quínoa es la presencia de saponinas en la porción más externa de la semilla, que es responsable de sabores amargos y de la reducción de

la palatabilidad y digestibilidad del grano. Para eliminarlas, la semilla debe ser pulida o lavada con abundante agua previo a su utilización (Nickel y col., 2016). Además, en la quínoa también se encuentran cantidades considerables de compuestos polifenólicos, tales como ácidos fenólicos y flavonoides, con propiedades antioxidantes y de reducción del riesgo de sufrir diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otros (Repo-Carrasco-Valencia y col., 2010), que resultan muy valorados por los consumidores actuales. Sin embargo, el procesamiento al que se someta el grano, como lavado, cocción, tostado, etc., puede afectar a los niveles de estos compuestos, limitando la extensión de sus propiedades benéficas (Nickel y col., 2016).

1.2.4 Alpiste (*Phalaris canariensis* L.)

El alpiste es un cereal perteneciente a la familia *Poaceae*, cultivado principalmente en Canadá y Argentina, con una producción anual de 250,000 toneladas. El cultivo de alpiste no se encuentra muy explotado ni desarrollado a nivel mundial, ya que se destina en su mayoría como alimento para aves (Abdel-Aal y col., 2011 a, b). La principal limitante en su uso a nivel industrial es la presencia de pequeños pelos de sílice llamados tricomas que se encuentran en la superficie del grano (Figura 5 A). La exposición o el consumo de estos pelos de sílice se asociaron al desarrollo de cáncer de esófago e irritación en la piel y los pulmones (Abdel-Aal, 2021). Sin embargo, el problema se resuelve con la eliminación de los tricomas, ya sea de manera mecánica o por modificación genética (Abdel-Aal, Hucl y Sosulski, 1997), haciendo seguro su consumo en los humanos (Figura 5 B) (Magnuson y col., 2014). Si bien el uso de alpiste para el desarrollo de alimentos es limitado, se ha utilizado para la preparación de productos de panadería como galletitas, pan, tortas, cereales para el desayuno, barras de cereales y pastas (Patterson y col., 2018).

Se han desarrollado cinco variedades de alpiste sin sílice, cuatro de coloración marrón (CDC Maria, CDC Togo, CDC Bastia y CDC Calvi) y una amarilla (CDC Cibo) (Patterson y col., 2018) (Figura 5 B). Típicamente las semillas presentan forma elíptica, con 4 mm de largo y 2 mm de ancho y se conforman por la cáscara, el germen o embrión y el endosperma (Mason y col., 2018; Abdel-Aal y col., 2011a).

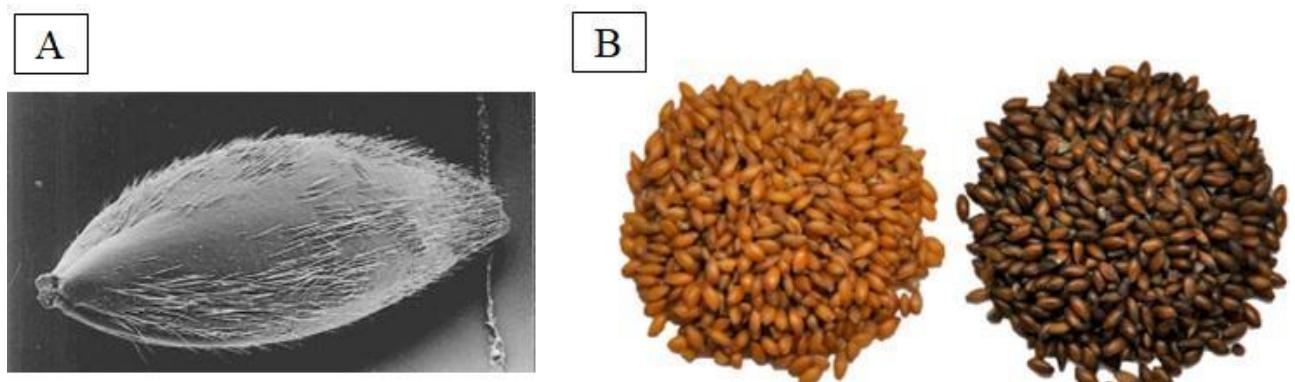


Figura 5: Semilla de alpiste con pelos de sílice o tricomas (A) y semillas de alpiste amarillo y marrón sin tricomas desarrollados genéticamente (B) (adaptado de Abdel-Aal y col., 1997 y Mason y col., 2018).

El valor nutricional del alpiste es superior al del resto de los cereales, por su mayor contenido de proteínas, fibra y lípidos. La semilla se compone por 50-55 % de almidón, 15-20 % de proteínas, 5-15 % de fibra, 8-10 % de lípidos y 2-3 % de cenizas, sin diferencias entre las variedades marrones y amarilla (Abdel-Aal, 2021; Mason y col., 2018; Patterson y col., 2018).

En el interior del endosperma se encuentran los gránulos de almidón, de tipo A, con formas poligonales y de tamaños variables entre 0,5 y 7,5 μm . El porcentaje de amilosa del almidón de alpiste es similar al del resto de los cereales (20-22 %). Las proteínas del alpiste se encuentran tanto en el endosperma como en la cáscara y pertenecen mayoritariamente al grupo de prolaminas (45 %) y glutelinas (32 %), aunque también presenta menores proporciones de proteínas del tipo albúminas y globulinas (13 %) (Abdel-Aal y col., 1997). Al igual que el resto

de los cereales, son deficientes en lisina, pero se distinguen por presentar mayores contenidos de triptófano, fenilalanina, arginina y cisteína (Patterson y col., 2018; Abdel-Aal y col., 2011a). Respecto a los lípidos, se ubican principalmente en la cáscara y el germen y se componen de 54 % de ácido linoleico, 24 % de ácido oleico, 12 % de ácido palmítico y sólo un 3 % de ácido linolénico (Abdel-Aal y col., 2020). Del total de la fibra del alpiste, que se ubica mayoritariamente en la cáscara, sólo una porción menor al 1 % corresponde a fibra soluble (Patterson y col., 2018).

La cáscara de la semilla también presenta cantidades considerables de compuestos polifenólicos, en su mayoría ácidos fenólicos y flavonoides, con propiedades funcionales, principalmente antioxidantes, antiinflamatorias y protectoras contra enfermedades cardíacas o cáncer. Los ácidos fenólicos pueden encontrarse libres (ácido protocatéquico, *p*-cumárico y sinápico) o unidos (ácido ferúlico, cafeico y *p*-cumárico) a proteínas, fibra o lípidos, siendo predominante la forma unida en el alpiste (90 % del total) (Abdel-Aal y col., 2011b) y sin diferencias entre las variedades. Por su parte, los flavonoides que se encontraron en el alpiste son derivados de glucosa, ramnosa y arabinosa de la apigenina (Li y col., 2011).

Otros de los compuestos de interés presentes en el alpiste son los carotenoides (11 mg/kg), con reportados beneficios antioxidantes, antienvejecimiento y de mejoras en la respuesta inmune. Entre ellos, la cáscara del grano contiene cantidades considerables de β -caroteno (4900 μ g/kg), luteína (2300 μ g/kg) y zeaxantina (500 μ g/kg), sin diferencias significativas entre las variedades marrón y amarilla (Li y Beta, 2012; Abdel-Aal y col., 2021; Mason y col., 2018). Más aún, los niveles de β -caroteno, precursor de la vitamina A y con efectos protectores de la piel y la vista, son superiores a los hallados en maíz (Li y Beta, 2012).

1.3 Obtención de alimentos a base de maíz: procesos de extrusión y de cocción-laminación-tostado

1.3.1 Extrusión: fundamentos y principios de la técnica

La extrusión es un método de elaboración de alimentos a partir de la cocción termomecánica de los ingredientes, caracterizada por el mezclado, calentamiento y cizallamiento simultáneo del material, que ocurre en un corto período de tiempo (Boye, 2015; Bisharat y col., 2013). Existen diferentes tecnologías de extrusores, con simple o doble tornillo, que pueden ser co o contrarrotantes, de diferentes longitudes y diámetros de tornillos. Un esquema de un extrusor de simple tornillo se muestra en la Figura 6.

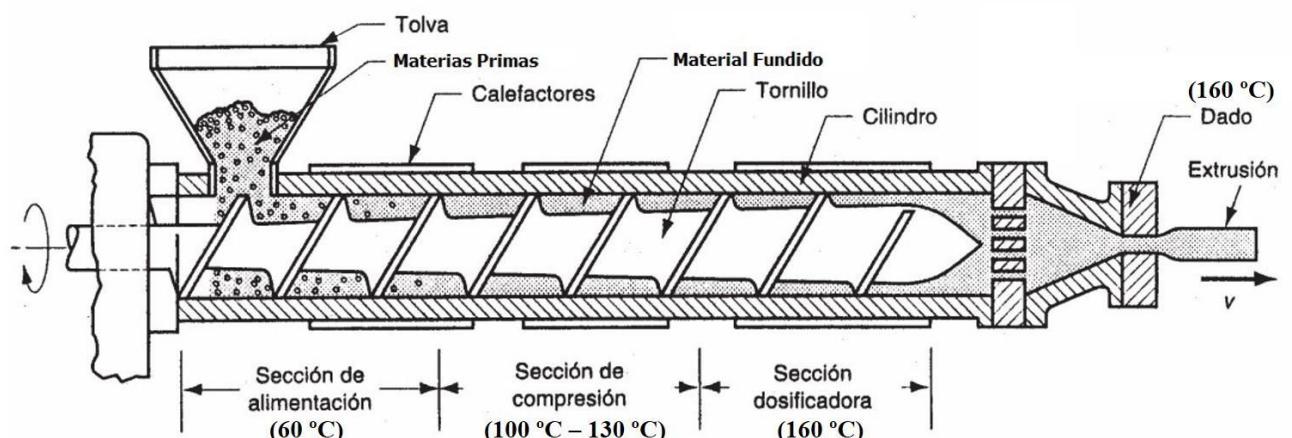


Figura 6: Esquema de un extrusor de simple tornillo (adaptado de www.fido.palermo.edu).

El proceso se inicia con la alimentación de los ingredientes con un contenido acuoso previamente definido hacia la tolva, que puede hacerse de manera mecánica o manual. Durante la alimentación, que puede estar forzada por un pistón, se favorece el mezclado inicial de los ingredientes, que llegan hacia la primera porción del extrusor que es la sección de alimentación. Allí se inicia el proceso de cocción, ya que la sección se encuentra a unos 60-100 °C, y la mezcla toma contacto con el o los tornillos que imparten la energía mecánica a través del

cizallamiento, lo que genera un aumento de la presión. Posteriormente, el material continúa hacia la sección de compresión, donde las temperaturas y presiones aumentan, y la mezcla empieza a fundirse. Finalmente, el material fundido, ya en la tercera sección del extrusor, atraviesa una boquilla de diámetro muy reducido a la salida del equipo. Esta boquilla puede estar acompañada por accesorios y/o cuchillas giratorias que le darán las formas y tamaños variados a los productos. A la salida del equipo se producirá la expansión del producto como consecuencia de la diferencia de presión en el interior del extrusor y la presión ambiental. Esta expansión está favorecida, también, por la liberación del vapor de agua generado durante la cocción de los ingredientes en las diferentes secciones del equipo.

En esta metodología las variables de procesamiento que pueden controlarse son: la humedad inicial de los ingredientes, la velocidad de rotación del o los tornillos, la temperatura de las diferentes secciones del extrusor, la presión o torque aplicados, entre otros. Esta combinación de elevadas temperaturas (que pueden llegar hasta los 200 °C) y presiones (hasta 20 MPa) produce modificaciones fisicoquímicas que definen las características y la calidad del producto final. De la adecuada combinación de las diferentes variables del proceso se pueden obtener alimentos de variadas formas y tamaños, según se requiera. Estas características de versatilidad y rapidez, junto con su continuidad y bajo costo, destacan a la extrusión por sobre el resto de las tecnologías desarrolladas para la elaboración de alimentos (Kręcisz, Wójtowicz y Oniszczuk, 2015).

La fácil incorporación y combinación de ingredientes permite la utilización de una amplia variedad de materias primas (harinas, extractos con componentes de interés, residuos de otras líneas de producción, subproductos agroindustriales, entre otros) para el desarrollo de alimentos con diferentes finalidades. En este sentido, el proceso genera productos que se adaptan a las necesidades actuales de los consumidores: productos naturales, de fácil

preparación y consumo, con adecuado perfil nutricional y propiedades funcionales. La versatilidad del método permite la elaboración de alimentos expandidos, cereales para el desayuno, texturizado de proteínas vegetales, pastas, barras energéticas, entre otros (Ačkar y col., 2018; Morales y col., 2015).

1.3.2 Cocción-laminación-tostado: descripción general del proceso

El proceso de cocción-laminación-tostado es un método tradicional en la elaboración de alimentos a base de cereales y ha sido la tecnología utilizada durante muchos años para el desarrollo de cereales para el desayuno como los copos de maíz, entre otros aperitivos o *snacks* (Farroni, 2011; Cueto y col., 2017). Dada las características de los productos que se obtienen (elevada superficie de exposición, bajo contenido acuoso), se utilizan *grits* de maíz (trozos grandes de endosperma libres de germen y pericarpio) en lugar del grano entero para eliminar la mayor parte de los lípidos presentes en el germen y minimizar el desarrollo de la oxidación, que es la reacción de degradación predominante. Durante el proceso, los *grits* de maíz se transforman en hojuelas o copos de maíz individuales.

Sin embargo, es posible obtener otros tipos de *snacks* a partir de la harina del *grit* de maíz. El procesamiento a partir de la harina permite, entre otras cosas, la inclusión y mezcla con otros ingredientes para obtener productos con diferentes características fisicoquímicas, mejoras en el perfil nutricional, calidad final, propiedades sensoriales y/o de estabilidad en el almacenamiento.

El proceso inicia con la mezcla de los diferentes ingredientes y su acondicionamiento para alcanzar los porcentajes de humedad deseados. La mezcla se somete a una etapa de cocción con vapor a presión, que puede alcanzar los 230 KPa, durante tiempos variables pero

que rondan entre una y dos horas. En el agua de cocción pueden agregarse jarabes, azúcares y sal para potenciar el desarrollo del color y *flavor* deseados. Las principales modificaciones que ocurren durante esta etapa son la gelatinización del almidón y el desarrollo de aromas y colores característicos. El siguiente paso es el secado y temperado de la mezcla cocida, para lograr que baje la temperatura y la humedad de la mezcla y también que el contenido de agua se distribuya de manera homogénea. Sin embargo, hay que evitar el secado excesivo que podría llevar a un endurecimiento de la superficie, que pueda afectar a la manipulación del material o la posterior eliminación de agua. La duración de esta etapa es variable según las características de la mezcla cocida, pudiendo abarcar desde unos pocos minutos hasta una hora. Posteriormente, la mezcla se lamina para dar forma a la hojuela. Para ello, la mezcla se coloca entre dos rodillos de acero que giran en sentido contrario, con una separación que se regula y define según las características deseadas. El espesor del producto es un aspecto importante para considerar, ya que si es muy grueso puede volverse muy rígido o duro, mientras que si el espesor no es suficiente, el producto se vuelve frágil y quebradizo para las etapas posteriores. Finalmente, el material laminado atraviesa una etapa de tostado, en el que se utiliza aire caliente (hasta 230 °C) con circulación forzada, durante varios minutos. Por la forma del material, es difícil conseguir un tostado uniforme, ya que en general los bordes se tuestan más que el centro. El producto final presenta contenidos de agua variables, según el tiempo y la temperatura de tostado seleccionados, pero se recomienda sea menor al 5 % para asegurar adecuadas propiedades mecánicas y sensoriales, además de favorecer su calidad y estabilidad microbiológica durante su largo período de vida útil.

1.4 Transformaciones fisicoquímicas de los componentes alimentarios durante el proceso de elaboración

Durante los procesos de extrusión y/o cocción-laminación-tostado, la harina o mezcla utilizada se expone a condiciones de altas temperaturas, presiones y procesos mecánicos en presencia de agua que favorece la movilidad molecular de los componentes. Esto promueve la ocurrencia de una serie de transformaciones fisicoquímicas de los sistemas y sus estructuras, así como también cambios en las asociaciones entre los componentes que los conforman. La calidad final de los productos, sus características organolépticas y la percepción sensorial de los consumidores dependerán de la magnitud de estas transformaciones y del grado de avance de las reacciones que se desencadenan durante el procesamiento y almacenamiento, las cuales se encuentran íntimamente relacionadas a su composición (Arora y col., 2020; Reyes Moreno y col., 2018). Estas modificaciones dadas por el proceso pueden analizarse a través de diferentes metodologías instrumentales complementarias, tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía Raman con transformada de Fourier (FT-Raman), resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$), microscopía de barrido electrónico (SEM), microscopía láser de barrido confocal (CLSM), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), entre otras, que permiten estudiar de manera integral las transformaciones fisicoquímicas de los componentes de la matriz.

1.4.1 Cambios en el contenido y la conformación de los componentes

La exposición de carbohidratos, proteínas, lípidos y fibra a elevadas temperaturas, presiones y energías mecánicas conlleva a modificaciones en su estructura y conformación y

afecta las interacciones y las asociaciones moleculares que establezcan con el resto de los componentes de la matriz. En conjunto se producirán pérdidas nutricionales, dadas por la destrucción de componentes de interés, aunque también se inducen modificaciones de la microestructura que pueden generar aumento de la exposición superficial o biodisponibilidad de nutrientes. Los cambios en la microestructura a su vez afectan las propiedades mecánicas, estabilidad fisicoquímica y calidad final (Reyes Moreno y col., 2018).

1.4.1.1 Almidón

Considerando que el componente más importante de las harinas estudiadas es el almidón, es importante destacar las transformaciones más importantes que sufre este polisacárido durante el procesamiento. En principio, el procesamiento tecnológico permite la cocción de los gránulos de almidón, que a través del proceso de gelatinización (Sección 1.4.3.1), se funden y forman una matriz continua de almidón gelatinizado que constituye la estructura base de los productos formados (Dalbhagat, Mahato y Mishra, 2019). Durante este proceso, disminuye considerablemente la cristalinidad del almidón, que se vuelve un material con una mayor porción amorfa que en su estado nativo (Cueto y col., 2018). Es a través de este mecanismo que el almidón se torna digerible para el ser humano (Gulati, Brahma y Rose, 2020), lo que puede verse reflejado también como una disminución del contenido de fibra luego del procesamiento (Wang y col., 2021; Reyes Moreno y col., 2018). Sin embargo, de manera paralela puede ocurrir la formación de complejos entre moléculas de amilosa y lípidos. Estos complejos tienen carácter cristalino, con estructura tipo V, y disminuyen la digestibilidad del almidón (se convierte en almidón resistente) y del lípido involucrado (Krishnan y col., 2021; Arora y col., 2020; Dalbhagat y col., 2019). También es una vía de protección de ácidos grasos poliinsaturados, de especial importancia para ácidos grasos esenciales, que son altamente susceptibles a la oxidación. La inclusión se genera por el carácter hidrofóbico del interior de la

hélice de amilosa, dada por la disposición espacial de las moléculas de glucosa que la componen (Sección 1.1.1.1). Además de la gelatinización, puede ocurrir la dextrinización, en la cual se producen fragmentaciones del polisacárido y liberación de fragmentos pequeños, favorecida principalmente por el cizallamiento en condiciones de baja humedad que puede darse durante la extrusión (Arora y col., 2020). Los fragmentos resultantes se encuentran más fácilmente disponibles para las enzimas digestivas.

1.4.1.2 Proteínas

Una de las modificaciones más importantes durante el procesamiento de cereales es la desnaturización proteica, que permite la apertura de su estructura por ruptura de enlaces covalentes y no covalentes, aumentando su digestibilidad, con la consecuente exposición de grupos funcionales que se encontraban ocultos en la conformación nativa (Gulati y col., 2020; Arora y col., 2020). Esto favorecerá la asociación de las proteínas con otros componentes de la matriz, como el almidón, los lípidos y/o los carotenoides, modificando las características de la matriz (Jebalia y col., 2019) o influyendo en las propiedades antioxidantes y/o estabilidad del producto (Ortak y col., 2017). Contrariamente, el proceso también puede generar la ruptura de los complejos que se encontraban formados naturalmente entre proteínas y componentes de la pared celular o con otros susceptibles al tratamiento térmico, como los compuestos polifenólicos, aumentando la funcionalidad, aunque también su susceptibilidad a oxidarse (Gulati y col., 2020; Arora y col., 2020).

Los cambios conformacionales de las proteínas dadas por el proceso, tales como pérdidas de conformaciones α -hélice o giros β y aumento de conformaciones aleatorias, afectan a la estabilidad de los complejos (Song y col., 2021). A su vez, la exposición de grupos funcionales puede facilitar la ocurrencia de reacciones como la reacción de Maillard (Gulati y col., 2020), con los correspondientes desarrollos de los aromas y colores típicos y las consecuentes pérdidas

nutricionales, principalmente de aminoácidos esenciales como la lisina (Sección 1.4.2.1), también se generan compuestos reductores que juegan un papel en la estabilidad lipídica. La desnaturalización proteica también puede promover la formación de enlaces covalentes (puentes disulfuro) y no covalentes (interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno) entre cadenas polipeptídicas adyacentes, lo que conlleva a la formación de agregados de diversos tamaños, que afectan a la microestructura, las propiedades mecánicas del producto y sus características sensoriales (Dalbhagat y col., 2019; Arora y col., 2020; Chanvrier y col., 2015). Los efectos del procesamiento sobre las proteínas son sumamente complejos y tienen consecuencias tanto positivas como negativas para el producto.

1.4.1.3 Lípidos

La reacción principal de deterioro de los lípidos es la oxidación, siendo particularmente susceptibles aquellos ácidos grasos que presentan alguna o varias insaturaciones. Como consecuencia de esta reacción, se generan compuestos que afectan negativamente a las características organolépticas del producto, y determinan su estabilidad y aceptación sensorial (Sección 1.4.2.2). Durante el procesamiento de las harinas, el tratamiento termo-mecánico puede romper estructuras o enlaces entre compuestos, liberando o exponiendo los lípidos y favoreciendo su isomerización u oxidación, lo cual conduce a una reducción en su contenido final (Dalbhagat y col., 2019). Sin embargo, de manera simultánea también ocurren procesos que pueden protegerlos frente al deterioro (Ilo, Schoenlechner y Berghofe, 2000): desnaturalización de lipasas, lipooxigenasas u otras enzimas oxidativas, formación de complejos amilosa-lípidos que disminuye la disponibilidad o exposición de ambos componentes (Krishnan y col., 2021), liberación de compuestos antioxidantes que se encontraban retenidos por estructuras o asociaciones con otros componentes de la matriz previo al procesamiento y/o la generación de productos de la reacción de Maillard (Sección 1.4.2.1),

que tienen reportadas actividades protectoras frente a la oxidación (Reyes Moreno y col., 2018; Gulati y col., 2020).

1.4.1.4 Fibra

El tratamiento tecnológico de las mezclas de harinas mediante los procesos de extrusión o cocción-laminación-tostado suele afectar poco el contenido de fibra de los productos y sus características. Sin embargo, esto dependerá de varios factores, incluyendo tipo de material, contenido de fibra, asociación con otros componentes, disposición y estructura de la matriz, condiciones de tratamiento, etc. (Robin, Schuchmann y Palzer, 2012). Algunas transformaciones que se llevan a cabo incluyen la gelatinización del almidón, que en su conformación nativa no puede ser digerido y por lo tanto se considera como fibra, o la formación de los complejos amilosa-lípido que por su estructura y conformación no pueden ser degradados por las enzimas digestivas. También se ha reportado un aumento en el contenido de fibra dietaria por modificación de la fibra insoluble o por ruptura de enlaces que presentaban los componentes de la fibra con otros nutrientes de la matriz, facilitando su extracción y cuantificación por los métodos convencionales (Gulati y col., 2020). Esto supone una ventaja dado que aumenta el volumen de material disponible para la fermentación en el intestino, con la generación de ácidos grasos de cadena corta u otros compuestos con beneficios en la salud (Robin y col., 2012). Por otro lado, el mayor consumo de fibra disminuye el índice glucémico del alimento, ayudando a prevenir el desarrollo de enfermedades como diabetes tipo II, sobrepeso u obesidad (Reyes Moreno y col., 2018). Contrariamente, la degradación de los componentes de la fibra por la energía térmica o mecánica en fracciones más pequeñas genera una disminución en su contenido, dado que las porciones de menor tamaño resultantes no podrán ser cuantificadas por los métodos habituales (Robin y col., 2012). Sin embargo, estas porciones pequeñas generadas pueden tener función prebiótica.

1.4.2 Reacciones químicas asociadas a características organolépticas

El tratamiento de los alimentos en condiciones de elevadas temperaturas durante tiempos considerables y en presencia de agua y oxígeno favorece el desarrollo de reacciones de deterioro. La reacción de Maillard, la oxidación de lípidos y la descomposición de los compuestos polifenólicos y carotenoides son las de mayor relevancia en el procesamiento de harinas de cereales y pseudocereales. Estas influyen directamente sobre las características nutricionales y organolépticas de los productos, ya que sea por la pérdida de nutrientes de interés (aminoácidos esenciales, ácidos grasos o compuestos bioactivos), por la formación de variados compuestos algunos no deseados y otros que determinan aspectos como el color, la apariencia y el aroma, que impactan sobre la calidad fisicoquímica y sensorial de los alimentos. Si bien cierto grado de desarrollo es favorable para la generación de los colores y aromas típicos de los productos, un exceso conlleva a obtener características indeseables, se pueden desarrollar compuestos potencialmente peligrosos o carcinogénicos y, por lo tanto, su grado de desarrollo es un tema importante de estudio y control en el diseño de procesos.

1.4.2.1 Reacción de Maillard

La reacción de Maillard pertenece al grupo de reacciones de pardeamiento no enzimático, junto con la oxidación del ácido ascórbico y la caramelización. El proceso se acelera en condiciones de elevada temperatura y se favorece por un pH básico y valores de actividad de agua medios a bajos (Rufián-Henares y Pastoriza, 2016). Como resultado de la reacción se obtienen compuestos pardos y otros productos de bajo peso molecular que imparten aromas y sabores a los alimentos (Rufián-Henares, Delgado-Andrade y Morales, 2009). Un esquema simplificado de la reacción de Maillard se muestra en la Figura 7.

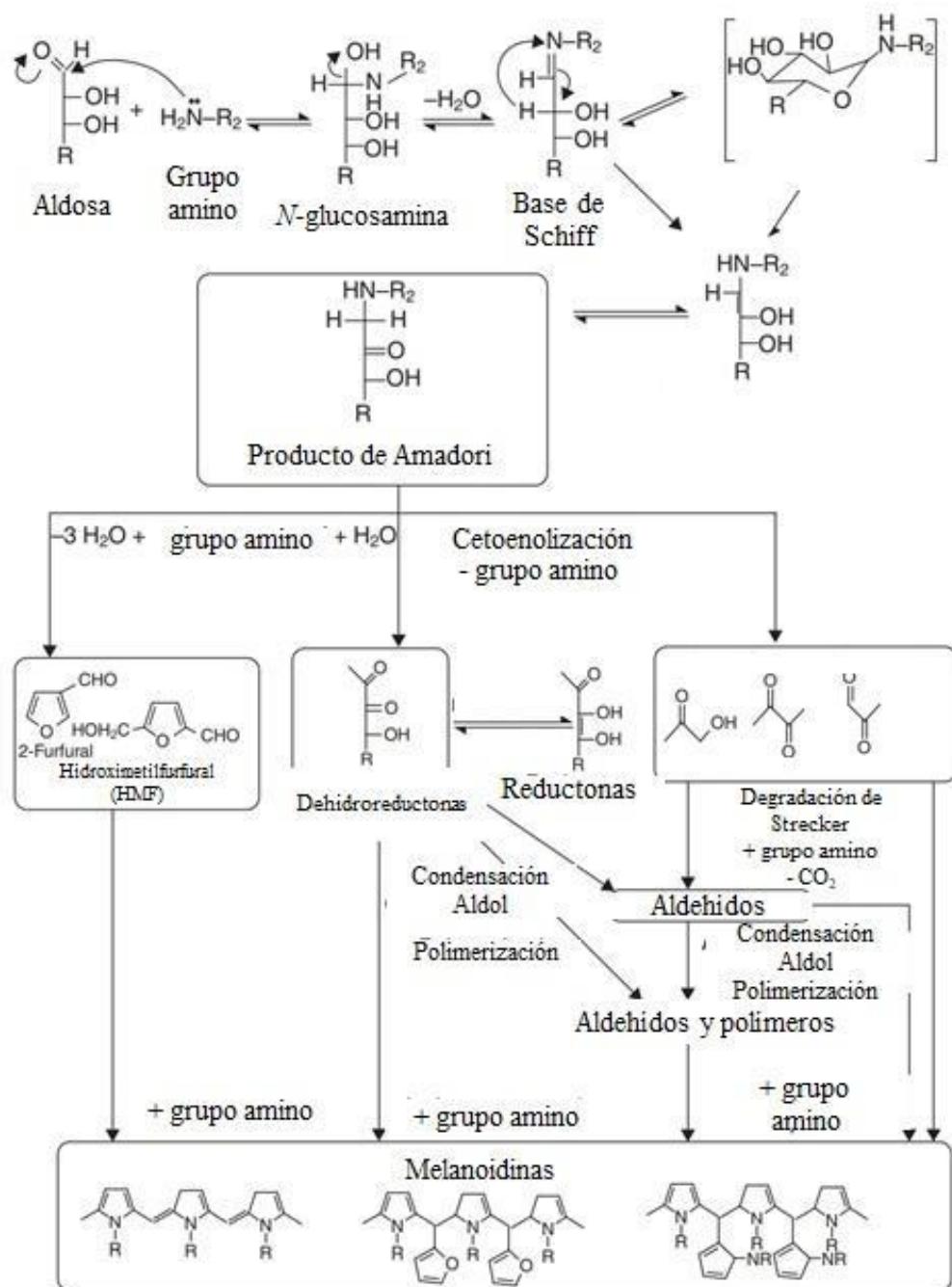


Figura 7: Esquema de la reacción de Maillard (adaptado de Pérez-Lucas y Yaylayan, 2010).

El proceso se inicia por el ataque nucleofílico de un grupo amino a un azúcar reductor o un compuesto con un grupo carbonilo libre, generando una base de Schiff inestable que rápidamente se convierte a una glucosamina sustituida (Rufián-Henares y Pastoriza, 2016). El grupo amino puede pertenecer a un aminoácido libre, un grupo amino de una cadena lateral de

un péptido o proteína (por ejemplo, de lisina) o el grupo amino terminal de una proteína (Martins, Jongen y van Boekel, 2000). Por su parte el grupo carbonilo puede pertenecer a un azúcar reductor o algún compuesto de oxidación, ya sea de lípidos, ácido ascórbico, compuestos polifenólicos, entre otros (Rufián-Henares y col., 2009; Rannou y col., 2016). Hasta este punto la reacción es reversible, ya que en condiciones ácidas pueden regenerarse los grupos amino y carbonilo (Pérez-Lucas y Yaylayan, 2010).

El siguiente paso es el reacomodamiento de Amadori o de Heyns, según la base de Schiff se trate de una aldosaamina o cetosaamina, respectivamente. Esta etapa ya es irreversible y de acuerdo con las condiciones del medio (pH, temperatura) la reacción puede ramificarse generando una amplia variedad de productos intermedios (Cui y col., 2021; Martins y col., 2000). Los más habituales incluyen compuestos α -dicarbonílicos, formados por enolización 1-2 en condiciones de pH < a 7, quienes son precursores del hidroximetilfurfural (HMF) o furfural, según se trate de hexosas o pentosas, respectivamente (Rufián-Henares y Pastoriza, 2016). Estos compuestos son muy utilizados como indicadores del daño térmico por reacción de Maillard. Otros productos habituales son las reductonas, que se forman a pH > a 7 por enolización 2-3 (Cui y col., 2021). Con el progreso de la reacción las reductonas se deshidratan y polimerizan (degradación de Strecker), formando compuestos pardos nitrogenados de diferente peso molecular que reciben el nombre de melanoidinas e imparten el color típico de la reacción (Pérez-Lucas y Yaylayan, 2010; Rannou y col., 2016). Estos productos pueden ser cuantificados espectrofotométricamente a 280 nm y 420 nm en el espectro ultravioleta y visible, respectivamente. De manera complementaria, la evaluación del color mediante análisis de imágenes o técnicas colorimétricas es útil para medir el grado de avance de la reacción (Farroni y Buera, 2012; Cueto y col., 2017). Otros productos típicos de la reacción, como el HMF u otros furfurales, pueden determinarse mediante técnicas cromatográficas y su

cuantificación se ha relacionado con los cambios de color del alimento (Rufián-Henares y col., 2009). Por otro lado, se ha demostrado también que algunos productos de la reacción de Maillard tienen propiedades antioxidantes, por lo que su formación resulta beneficiosa.

Durante el transcurso de la reacción se van produciendo etapas de ciclación, deshidratación, isomerización, condensación y aldolización, denotando su complejidad y la variedad de productos generados (Rufián-Henares y col., 2009). Como resultado se van generando, entre otros, nuevos compuestos carbonílicos que pueden condensarse con otros grupos amino presentes, potenciando el desarrollo de la reacción (Cui y col., 2021; Martins y col., 2000). Los compuestos aromáticos volátiles se generan en etapas medianas y avanzadas de la reacción, y son principalmente aldehídos y cetonas de bajo peso molecular (Rufián-Henares y Pastoriza, 2016). Paralelamente a los cambios organolépticos ocurre la pérdida nutricional, ya que en las etapas irreversibles los grupos amino presentes no pueden recuperarse, lo que implica una disminución del valor proteico del alimento (Pérez-Lucas y Yaylayan, 2010). Si bien un grado moderado de avance de la reacción es favorable para obtener aromas, sabores y colores agradables, en exceso pueden obtenerse características indeseables en los alimentos. Dentro de la variedad de productos generados durante el avance de la reacción se incluyen furanos, aminas heterocíclicas, pirroles, acrilamida y otros con reportados efectos negativos sobre la salud (Rannou y col., 2016; Cui y col., 2021), por lo que las condiciones de procesamiento deben ser controladas para minimizar la formación de estos compuestos dañinos.

1.4.2.2 Oxidación de lípidos

La oxidación de los lípidos puede ser catalizada por enzimas (lipooxigenasas) o darse mediante autooxidación. Durante el procesamiento de alimentos farináceos, el mecanismo predominante es la autooxidación (Hall, 2010). Se trata de un proceso radicalario en cadena

que ocurre en presencia de oxígeno y se favorece por factores tales como exposición a la luz, bajos valores de actividad de agua, elevadas temperaturas, presencia de metales catalizadores u otros agentes prooxidantes (Schaich, 2013).

La susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación aumenta con el número de insaturaciones (Barden y Decker, 2013). Esto se explica por la menor energía de sustracción del átomo de hidrógeno de un grupo metíleno de un sistema pentadieno que de un grupo alilo aislado, ya que el radical generado en el primer caso se estabiliza por resonancia (Belitz, Grosch y Schieberle, 2012). Así, a igual número de átomos de carbono, los ácidos grasos se pueden ordenar por susceptibilidad decreciente a la oxidación como linolénico > linoleico > oleico > esteárico (Belitz y col., 2012). Como consecuencia de esta reacción se produce la destrucción de ácidos grasos, lo que implica una disminución del valor nutricional del alimento, principalmente si se trata de ácidos grasos esenciales. En el proceso oxidativo se forman productos de bajo peso molecular, mayormente aldehídos, alcoholes, ácidos y cetonas, que imparten aromas desagradables o rancios a los productos, disminuyendo considerablemente su calidad y vida útil (Schaich, 2013; Belitz y col., 2012). Simultáneamente los productos radicalarios de oxidación también pueden establecer enlaces o interacciones con otros componentes del sistema, principalmente proteínas, afectando su disponibilidad y funcionalidad. En etapas avanzadas de la reacción ocurre el entrecruzamiento o polimerización, que trae aparejados cambios en el color (Barden y Decker, 2013). Los compuestos polifenólicos, carotenoides u otros agentes antioxidantes presentes en el alimento pueden interferir en algunas de las etapas enlenteciendo este proceso (Hall, 2010).

La reacción de oxidación de lípidos se puede dividir en 3 etapas: iniciación, propagación y terminación (Belitz y col., 2012). En la iniciación se forman radicales de ácidos grasos ($L\cdot$) que se unen a moléculas de oxígeno, formando radicales peroxi ($LOO\cdot$). Como se mencionó

anteriormente, la susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación aumenta con el número de insaturaciones, dado que el radical resultante puede estabilizarse por resonancia en los dobles enlaces conjugados. Durante la propagación, los radicales peroxy sustraen átomos de hidrógeno que pueden provenir de una nueva molécula de ácido graso, generando un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical $L\cdot$, que iniciará nuevamente la reacción (Schaich, 2013). Es por este motivo que la oxidación de lípidos se trata de una reacción radicalaria en cadena. Los hidroperóxidos constituyen, entonces, los productos primarios de la reacción, pero sin afectar las características organolépticas del alimento (Barden y Decker, 2013). Cuando se produce la β -escisión de los hidroperóxidos, favorecida por las altas temperaturas, exposición a la luz o la presencia de metales de transición, se forman los radicales alcoxi ($LO\cdot$), favoreciendo nuevamente la propagación de la oxidación (Hall, 2010). Estos radicales tienen la energía suficiente para romper la cadena alifática de los ácidos grasos, generando los productos carbonílicos de bajo peso molecular responsables de los aromas rancios de los alimentos (Barden y Decker, 2013). Para evaluar el grado de oxidación de un producto, suelen cuantificarse hidroperóxidos y también compuestos carbonílicos, de forma tal de analizar la formación tanto de productos primarios como secundarios de la reacción (Schaich, 2013). Finalmente, en la terminación, dos radicales se unen para formar una única molécula no radicalaria, tales como dímeros, trímeros o incluso polímeros (LL, LOL, LOOL, etc.) (Belitz y col., 2012). Sin embargo, esta etapa es difícil de alcanzar dada la alta disponibilidad de oxígeno en las condiciones habituales de tratamiento de alimentos. Paralelamente, llegado el punto, el grado de rancidez en esta instancia es tal que el producto no será consumido o comercializado (Hall, 2010).

Respecto a la cinética de la reacción, en general se observa una fase *lag* o período de inducción en la cual la formación de productos de oxidación es mínima (Schaich, 2013).

Durante esta etapa se estarán formando los primeros radicales, cuya acumulación dependerá no sólo de las condiciones del proceso sino también de la presencia y concentración de antioxidantes, que estarán evitando el progreso de la reacción (Barden y Decker, 2013). Luego de la fase *lag*, el desarrollo de la oxidación es exponencial. Por lo tanto, lo que se busca es maximizar la duración de esta fase *lag*, que definirá el tiempo de vida útil y/o la estabilidad del producto, dado que no se generarán sustancias que afecten la calidad sensorial del alimento. Sin embargo, factores como elevados tiempos de almacenamiento pueden favorecer el progreso de la reacción, por lo que resulta necesario cuantificar la formación de estos productos de oxidación y definir el tiempo de vida útil del alimento.

1.4.2.3 Descomposición de compuestos polifenólicos y carotenoides

El proceso tecnológico puede tener efectos positivos o negativos sobre la estructura y, por lo tanto, funcionalidad de los compuestos polifenólicos y carotenoides y sus propiedades antioxidantes. Por un lado, durante las etapas de extrusión, cocción o tostado se produce la descarboxilación, oxidación, isomerización o polimerización de compuestos termosensibles, que conlleva a una reducción en sus correspondientes niveles (Cueto y col., 2017; Dalbhagat y col., 2019). Paralelamente, en estos procesos ocurre también la formación/ruptura de enlaces que establecen estos compuestos bioactivos con otros componentes de la matriz, tales como fibra, proteínas, almidón y lípidos, o su liberación por ruptura de estructuras celulares, modificando su exposición, disponibilidad y funcionalidad (Debelo, Li y Ferruzzi, 2020; Călinoiu y Vodnar, 2020). El resultado dependerá del balance entre ambos fenómenos, el cual estará íntimamente asociado a las condiciones del proceso y las características de la matriz alimentaria y su contenido inicial de estos compuestos (Reyes Moreno y col., 2018; Debelo y col., 2020). Condiciones de elevadas temperaturas y presiones, en sistemas con bajos contenidos acuosos y en presencia de oxígeno, como ocurre durante la extrusión o cocción-

laminación-tostado, favorecen los procesos degradativos. Además de las propiedades antioxidantes, el contenido de estos compuestos definirá también el color resultante de los productos alimentarios (Cueto y col., 2017), que repercute en la percepción sensorial de los consumidores y la calidad final del material. De manera similar, productos de oxidación de polifenoles como las quinonas pueden participar en la reacción de Maillard (Sección 1.4.2.1), potenciando las pérdidas nutricionales y los cambios de color en el producto.

1.4.3 Propiedades térmicas y procesos asociados al agua

1.4.3.1 Gelatinización

La gelatinización es la transformación más importante que se produce durante la elaboración de alimentos a base de cereales. De manera general, es el proceso en el cual los gránulos de almidón pasan de una estructura ordenada a una desordenada, dada por el calentamiento en presencia de suficiente agua, que garantiza su consumo y digestibilidad (Wang y col., 2021; Singh y col., 2003).

Se puede dividir el proceso en 3 etapas. En la primera, cuando las temperaturas todavía son bajas, las moléculas de agua ingresan por la superficie de los gránulos y se unen a los grupos oxhidrilos libres de la región amorfa. En esta etapa reversible, el grado de hidratación o adsorción de agua es pequeño, no se producen cambios significativos en la viscosidad y los gránulos mantienen su identidad y patrón de birrefringencia. Durante la segunda etapa, y con el aumento progresivo de la temperatura, las moléculas de agua ingresan a las regiones cristalinas del almidón, se rompe la organización helicoidal de la amilopectina, comienza la fusión de los gránulos, quienes pierden su identidad y patrón de birrefringencia, con una lenta liberación de su contenido de amilosa al exterior, lo que produce un aumento de la viscosidad

del sistema. Este punto de la gelatinización ya es irreversible. Finalmente, durante la tercera etapa y con el aumento de la temperatura, los gránulos de almidón absorben agua hasta alcanzar un volumen máximo, punto donde la viscosidad del sistema también es máxima. Posteriormente, los gránulos se fragmentan completamente, pierden su morfología original y se libera todo el contenido hacia el medio, con la consecuente disminución de la viscosidad (Wang y col., 2021). La temperatura de gelatinización varía según el origen botánico del almidón, por diferencias en la composición, cristalinidad, estructura, entre otros factores, pero suele encontrarse en el rango 60-70 °C (Zhang y col., 2021; Singh y col., 2003).

La matriz de almidón fundida es la estructura base de los alimentos farináceos. Como consecuencia de la gelatinización se producen modificaciones estructurales, como disminución de la cristalinidad, y cambios conformacionales y de asociación entre macro componentes, que definirán propiedades mecánicas, texturales, microestructurales y sensoriales de los productos (Jebalia y col., 2019; Chaunier y col., 2007; Chanvrier y col., 2005).

1.4.3.2 Retrogradación

Cuando el almidón gelatinizado se enfriá, disminuye la energía térmica del sistema y las moléculas de amilosa y amilopectina tienden a re-asociarse a través de enlaces puente de hidrógeno. Esto genera un entrecruzamiento de moléculas y la reaparición de regiones cristalinas que pueden, en última instancia, llevar a la formación de un gel o a la precipitación (Wang y col., 2021). Este proceso recibe el nombre de retrogradación y puede dividirse en 2 etapas. En la primera, que ocurre inmediatamente luego de la gelatinización, las moléculas de amilosa se alinean a través de puentes de hidrógeno y forman una estructura tipo gel. Cuando las moléculas de amilopectina se re-asocian y recristalizan ocurre la segunda etapa de la retrogradación. Es en esta instancia donde la calidad de los productos amiláceos comienza a deteriorarse, ya que se afectan las propiedades organolépticas del alimento (Gulati y col.,

2020). El almidón retrogradado no es digerible y constituye parte del almidón resistente. Si se vuelve a calentar el almidón retrogradado, se observará nuevamente la fusión del almidón. Dado que el nivel de organización cristalina no es equivalente al del almidón nativo, la fusión del almidón retrogradado ocurre a temperaturas más bajas que las de la gelatinización (Zhang y col., 2021; Singh y col., 2003).

1.4.3.3 Transición vítreo

Los materiales alimentarios pueden encontrarse en estado amorfo o cristalino. El primero se describe como una estructura molecular desordenada o aleatoria metaestable, mientras que el estado cristalino es altamente organizado y sus propiedades no dependen del tiempo (Roos, 2010). El estado vítreo puede obtenerse por enfriamiento rápido de un material a una temperatura muy por debajo de su temperatura de fusión, sin cristalización, donde se mantiene el desorden molecular al azar en una estructura que recibe el nombre de vidrio (Roos, 2010). En el estado vítreo las moléculas se encuentran en una determinada posición y sus movimientos se limitan a vibraciones o movimientos rotacionales de corto rango, lo que le da aspecto de sólido y lo convierte en frágil o quebradizo (Fan y Roos, 2017). Los movimientos traslacionales empiezan a aumentar en magnitud e importancia cuando se produce la transición a líquido sobre enfriado, donde el material se ablanda y adopta características de fluido muy viscoso (Roos, 2010). El rango de temperatura a la cual se produce este cambio de estado de vidrio a líquido sobre enfriado, que es un proceso reversible, se llama temperatura de transición vítreo (T_g) y depende de varios factores, principalmente de la composición del alimento y su contenido acuoso. El agua incrementa la movilidad molecular y ejerce un rol plastificante, es decir, aumenta la flexibilidad y extensibilidad del material (Shogren, 1992). Como consecuencia, disminuye la T_g de un material con el aumento de su contenido acuoso, pudiendo alcanzar valores de T_g cercanos a la temperatura ambiente si el contenido de agua es suficiente

(Fan y Roos, 2017; Cova y col., 2012). Por este motivo también es posible obtener materiales vítreos por eliminación rápida del agua de un sistema. En productos de baja humedad, como los *snacks* a base de cereales, el control del contenido de agua es importante no sólo para limitar el desarrollo de reacciones de deterioro o el crecimiento microbiano, sino para evitar la transición vítreo.

La ecuación de Gordon-Taylor (Sección 3.1.12) se utiliza para describir el rol del agua en la disminución de la T_g , de forma tal de poder establecer condiciones de procesamiento o almacenamiento adecuadas y/o de predecir la estabilidad según las variaciones en la actividad de agua o el contenido acuoso (Masavang, Roudaut y Champion, 2019; Cova y col., 2012; Porras-Saavedra y col., 2019). Típicamente la transición vítreo se analiza mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde se reconoce la T_g como la temperatura donde se observa un cambio caracterizado por disminución de la capacidad calorífica (ΔC_p) cuando el material pasa del estado vítreo al de líquido sobre enfriado. Dado que, como consecuencia del cambio de estado se modifican las propiedades mecánicas, reológicas, dinámicas y dieléctricas del material, también es posible evaluar la T_g mediante resonancia magnética nuclear, análisis mecánico o termo-mecánico dinámico (DMA/DMTA) y análisis térmico dieléctrico (DEA/DETA) (Roos, 2010; Fan y Roos, 2017). En particular, en los sistemas con alto contenido de almidón, proteínas o ciertos biopolímeros, la detección de la T_g por DSC se hace muy complicada y se recurre a estas técnicas con fines confirmatorios.

El aumento de la movilidad molecular y los cambios de estado como consecuencia de la transición vítreo favorecen la ocurrencia de ciertas reacciones de deterioro o modificaciones fisicoquímicas asociadas al aspecto o propiedades mecánicas del material (Farroni, 2011). De esta manera es importante estudiar la transición vítreo o el estado físico de un alimento ya que

va a repercutir sobre las características macroscópicas o el grado de desarrollo de reacciones químicas durante su procesamiento y almacenamiento.

1.4.3.4 Relajaciones entálpicas

Algunos sistemas alimentarios presentan una transición endotérmica en un rango de temperaturas de 50-65 °C (Fan y Roos, 2017). A diferencia de la transición vítrea, los valores de temperatura a los cuales ocurre esta transición no se modifican con el contenido acuoso del producto y tampoco reaparecen en el termograma en un segundo calentamiento (Appelqvist y col., 1993; Masavang y col., 2019). Esta endoterma reaparece tras varios días de almacenamiento y se observa un aumento de la entalpía asociada con la humedad del producto (hasta valores cercanos al 25 %, b.s.) (Gonzalez y col., 2010; Farroni, 2011).

La causa de esta transición no se encuentra completamente establecida, pero la teoría mayormente aceptada es la ocurrencia de relajaciones moleculares dada por reordenamientos de enlaces de corto rango establecidos entre moléculas de agua y grupos hidrofílicos de carbohidratos (Appelqvist y col., 1993; Shogren, 1992; Busch y col., 2019). Estos reacomodamientos se facilitan con el aumento del contenido de agua ya que se incrementa la movilidad molecular; esto explica el aumento de la entalpía asociada con el contenido acuoso. Como esta transición puede ocurrir incluso por debajo de la T_g (Busch y col., 2019; Farroni, 2011), da cuenta de la movilidad molecular incluso en el estado vítreo.

Se ha relacionado la relajación entálpica con cambios en las propiedades mecánicas de los productos, tales como menor crocancia (Masavang y col., 2019; Appelqvist y col., 1993). De esta manera, y al igual que para la transición vítrea, el estado físico o los cambios moleculares gobernados por el contenido acuoso y las asociaciones entre componentes pueden influir en propiedades macroscópicas y definir parámetros de calidad.

1.4.3.5 Isotermas de adsorción de agua

Las isoterma s de adsorción de agua son la representación gráfica de la relación entre el contenido de agua de un alimento y su actividad de agua (a_w) a una determinada temperatura. La actividad de agua se define como la relación entre la presión de vapor del agua en el producto y la presión de vapor del agua pura a una determinada temperatura y toma valores entre 0 y 1 (Van den Berg y Bruin, 1981; Katz y Labuza, 1981). Es un parámetro relacionado con la disponibilidad del agua del alimento o movilidad molecular ya que indica el grado de asociación de las moléculas de agua con los sólidos de la matriz. Por este motivo suele utilizarse el valor de a_w más que el del contenido de agua como índice de calidad para evaluar la estabilidad de un alimento y predecir su susceptibilidad frente al desarrollo de reacciones de deterioro o el crecimiento microbiano (Labuza y Dugan, 1971).

Las isoterma s de adsorción surgen de evaluar la modificación en el contenido de agua cuando un alimento se expone a condiciones de a_w creciente. Típicamente se construyen a partir del método isopiéstico, que consiste en exponer pequeñas porciones del material de estudio en recipientes cerrados herméticamente que contienen soluciones saturadas de sales específicas que imparten al ambiente una humedad relativa o actividad de agua determinada y se evalúa el contenido acuoso luego del equilibrio (Greenspan, 1977).

Según las características de los sistemas existen diferentes tipos de isoterma s. En alimentos predomina el tipo II, de forma sigmoidea, en la cual es posible determinar tres zonas asociadas a diferentes relaciones entre el agua y los sólidos (Van den Berg y Bruin, 1981). En la primera ($a_w \approx 0-0,25$) se ubica el agua íntimamente asociada a los sólidos, que puede incluso formar parte de la estructura de los compuestos más hidrofílicos. Esta agua no está disponible para actuar como solvente ni plastificante. El porcentaje de agua asociado al límite superior de a_w de esta zona se conoce como agua límite de hidratación, también llamada de monocapa, e

indica el contenido de agua que cubre completamente los grupos polares de la superficie expuesta del alimento (Furmaniak y col., 2009). Este parámetro es importante ya que las reacciones de deterioro a esta humedad son mínimas, con excepción de la oxidación de lípidos (Labuza y Dugan, 1971). En la segunda zona ($a_w \approx 0,25-0,75$) se ubica el agua que tiene un grado de interacción con los sólidos menos intenso que en la primera zona, por efecto de apantallamiento de las moléculas más comprometidas con el sólido. A las moléculas de agua que conforman esta zona se le suele atribuir el nombre de “multicapa”, ya que se ubican por encima de la primera porción de moléculas de agua íntimamente asociadas a los sólidos. Según las características y composición del alimento, en estas condiciones puede favorecerse el desarrollo del pardeamiento no enzimático y la actividad de ciertas enzimas (Labuza y Dugan, 1971). Finalmente, en la última zona ($a_w \approx 0,75-1$) se ubica el agua con menor grado de asociación a los sólidos y con mayor libertad de movimiento. Se trata de moléculas de agua que actúan como solvente, pueden congelarse y permiten el crecimiento microbiano. Por este motivo, para garantizar la adecuada conservación de los alimentos a temperatura ambiente el a_w de un producto no debería encontrarse en este rango.

Existen modelos matemáticos ampliamente utilizados para caracterizar a las isotermas de adsorción en todo el rango de actividad de agua, que son la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) (Van den Berg y Bruin, 1981) y la ecuación de D'arcy y Watt (GDW) (D'arcy y Watt, 1970) (Sección 3.4). A partir de estos modelos matemáticos se pueden obtener parámetros de control y caracterización microestructural de los sistemas alimentarios para conocer su relación con el agua frente a la calidad fisicoquímica y estabilidad microbiológica.

1.4.3.6 Relajación magnética nuclear y movilidad molecular

Para que los procesos físicos y las reacciones químicas se lleven a cabo durante los procesos de transformación de alimentos es necesario garantizar condiciones que permitan suficiente movilidad molecular de los componentes presentes (Kovrlija, Goubin & Rondeau-Mouro, 2020). Esta movilidad estará limitada por el grado de asociación entre las moléculas de agua y los sólidos y sus modificaciones con la temperatura y el contenido acuoso (Hemdane y col., 2017). El análisis de la movilidad molecular puede realizarse mediante resonancia magnética nuclear de protones resuelta en el tiempo ($^1\text{H-RMN}$) a través de la evaluación de los tiempos de relajación espín-espín (T_2). Los T_2 surgen de evaluar el tiempo que tarda una población de protones en decaer o relajarse tras ser expuestos a un pulso de radiofrecuencia en presencia de un campo magnético y disipar la energía absorbida, que dependerá de su movilidad molecular o libertad de movimiento. Valores altos de T_2 indican relajaciones lentas, mientras que T_2 más cortos representan relajaciones más rápidas y eficientes. Por lo tanto, las variaciones de los valores de T_2 reflejan los grados de interacción entre las distintas poblaciones de protones, incluidas moléculas de agua y los sólidos de la matriz (almidón, proteínas, lípidos, etc.) durante el calentamiento, adsorción de agua y/o cualquier otro proceso tecnológico al que se exponga el alimento (Kovrlija y Rondeau-Mouro, 2017). Esto permite evaluar no sólo el rol del agua en las transformaciones fisicoquímicas, sino las modificaciones de las distintas poblaciones de protones como consecuencia de esas transformaciones (Chen y col., 2017; Lin y col., 2006).

Se puede analizar la relajación después de un solo pulso de radiofrecuencia, lo que se llama decaimiento libre de la inducción (FID), pero esto sólo permite evaluar el proceso de los protones de los sólidos y aquellos del agua que interactúan fuertemente con los sólidos, que son aquellos de contenido acuoso por debajo del límite de hidratación o “monocapa”. Para poder evaluar las distintas poblaciones de protones de mayor movilidad se requiere evitar los efectos de las inhomogeneidades del campo magnético, ya que estos se magnifican a tiempos

superiores al orden de los microsegundos. Para ello se han establecido secuencias de pulsos, y mediante ecos de espín se pueden analizar aspectos de las interacciones de los sólidos con el agua y las correspondientes modificaciones tecnológicas (Sección 3.1.13).

A partir de estos resultados se logra profundizar en el conocimiento de las cinéticas de los procesos y los cambios conformacionales de los componentes para establecer estrategias de procesamiento y almacenamiento adaptadas a las necesidades de cada sistema alimentario.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Analizar las relaciones entre la composición de las mezclas de harinas, las transformaciones sufridas por los componentes principales durante los procesos de extrusión y cocción-laminación-tostado y las características fisicoquímicas de los productos obtenidos, su calidad final y estabilidad durante el almacenamiento.
- Establecer asociaciones entre las propiedades supramoleculares de los productos finales y las características microestructurales, interacciones intramoleculares y disposición tridimensional de los componentes luego del procesamiento.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la potencialidad del uso de harinas de mijo, sorgo, quínoa y alpiste en formulaciones alimentarias destinadas al consumo humano.
- Desarrollar productos alimentarios a base de maíz con la incorporación de harinas de cereales y pseudocereales mediante procesos de extrusión y cocción-laminación-tostado.
- Caracterizar las propiedades físicas, químicas, mecánicas, microestructurales y térmicas de los productos alimentarios obtenidos.
- Establecer relaciones entre la composición de las formulaciones y las características finales de los productos.
- Analizar los efectos de los procesos de elaboración sobre los componentes principales de las formulaciones alimentarias.
- Monitorear los cambios principales que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos desarrollados.

3. Materiales y métodos

3.1 Sistemas extrudidos

3.1.1 Obtención de materias primas y preparación de mezclas de harinas

Se prepararon harinas integrales a partir de granos enteros de maíz amarillo (*Zea mays* L., cv. Prisma, de Sinaloa – México), mijo perlado (*Pennisetum glaucum* L. Leeke, cv. ICMV-88903, de San Luis Potosí – México), sorgo colorado (*Sorghum bicolor* L. Moench, cv. PIONEER 82G63, de Tamaulipas – México), quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd, cv. ‘real’, de Bolivia) y alpiste sin sílice (*Phalaris canariensis* L., cv. CDC Maria, de Canadá), los cuales se adquirieron en un mercado local de la ciudad de México. Los granos se molieron en un molinillo industrial (Veyco, modelo mpv 150, México) y luego se tamizaron a través de una malla número 14, con un tamaño de apertura de 1,41 mm.

Se prepararon cinco sistemas de muestras a extruir, un control de 100 % harina de maíz (M) y 4 mezclas con el agregado de 25 % de harinas integrales de mijo perlado (M-M), sorgo colorado (M-S), quínoa (M-Q) y alpiste (M-A). Este porcentaje de sustitución es el habitualmente utilizado a nivel industrial en formulaciones alimentarias y también a nivel de investigación para evaluar los efectos de la sustitución de ingredientes en las interacciones entre componentes (Téllez-Morales y col., 2020; Cueto y col., 2018).

3.1.2 Extrusión: definición de condiciones del proceso

Se utilizó un extrusor de simple tornillo (Brabender, modelo AEV 330, Alemania), con una relación de longitud/diámetro (L/D) de 20:1 y una boquilla de salida de 4 mm de diámetro,

con tres zonas de calentamiento (alimentación, cocción y salida). Las primeras dos zonas del extrusor se fijaron en 90 °C y 135 °C, respectivamente. Las condiciones de procesamiento restantes se definieron utilizando únicamente el sistema control (M), donde se evaluaron las siguientes variables: humedad inicial de las muestras (24 – 28 %, base húmeda), temperatura de zona de salida del extrusor (125 – 135 °C) y velocidad de rotación del tornillo (140 – 160 rpm). Los rangos de evaluación de las variables de procesamiento fueron considerados teniendo en cuenta las recomendaciones de uso del fabricante del equipo y también las características visuales y texturales generales de los productos. Para la definición de la combinación de variables de procesamiento se consideraron propiedades físicas del producto, tales como el grado de expansión, humedad final, color, densidad aparente e índices de solubilidad y absorción de agua, que son evaluaciones habituales de este tipo de productos (Saldanha do Carmo y col., 2019; Kasprzak y col., 2013). La combinación que condujo a los mejores resultados (máxima expansión, mínima densidad aparente, parámetros de color en rango con otros *snacks*, mayores índices de absorción, mínimos índices de solubilidad en agua y bajos valores de humedad finales) fue: 28 % de humedad inicial (base húmeda), 135 °C como temperatura de la zona de salida del extrusor y velocidad de rotación de tornillo de 160 rpm. Por lo tanto, se utilizaron estos parámetros para la preparación de todos los sistemas evaluados. Luego de la extrusión, todas las muestras se dejaron enfriar por 12 horas, se guardaron en envases de polietileno de baja densidad y se almacenaron a 25 °C en la oscuridad hasta realizar análisis posteriores.

3.1.3 Composición proximal de materias primas y productos finales

Para evaluar los efectos de la extrusión sobre la composición proximal, ésta se determinó antes y después del procesamiento. Para ello, los extrudidos fueron previamente molidos en un molinillo de impacto (IKA, modelo M 20, China) durante un minuto.

Las determinaciones de humedad, proteínas, lípidos, fibra dietaria y cenizas se realizaron siguiendo métodos oficiales de la AOAC (métodos 930.15, 920.87, 945.38, 985.29 y 923.03, respectivamente) (AOAC, 2005) y el contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. Para el cálculo del contenido de proteínas por el método Kjeldahl se utilizó un factor de conversión de 6,25. El contenido de fibra dietaria se analizó en muestras que fueron previamente desgrasadas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.4 Evaluación de propiedades físicas

3.1.4.1 Grado de expansión

El grado de expansión (GE) se define como la relación entre el diámetro del extrudido y el diámetro de la boquilla del extrusor (4 mm, Sección 3.1.2). Para cada sistema se realizaron 15 determinaciones usando un calibre con Vernier y se calculó el GE de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1: } GE = \frac{\text{Diámetro de extrudido}}{\text{Diámetro de boquilla}}$$

3.1.4.2 Densidad aparente

La densidad aparente (DA) se define como la relación entre la masa y el volumen del extrudido (Beck y col., 2018). Se realizaron 10 determinaciones para cada sistema, fijando una

longitud de 2 cm para cada muestra analizada, de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$\text{Ecuación 2: } DA (g/L) = \frac{M_e}{V_e} = \left(\frac{M_e}{\pi x \frac{d^2}{4} xl} \right)$$

donde M_e , V_e , d y l son la masa, el volumen, diámetro y longitud del extrudido, respectivamente.

3.1.4.3 Índices de solubilidad y absorción de agua (ISA e IAA)

Para la determinación de ISA e IAA se siguieron las indicaciones reportadas por Moisio y col. (2015) y Jafari y col. (2017), con pequeñas modificaciones. Brevemente, 1,25 gramos de las muestras molidas se colocaron en tubos de 15 mL, se llenaron con agua destilada a 20 °C y se agitaron durante 5 minutos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. Los sobrenadantes se recogieron en recipientes de aluminio que se secaron en estufa a 105 °C, hasta peso constante. Cada sistema se analizó por triplicado. Los ISA e IAA se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Ecuación 3 y Ecuación 4, respectivamente):

$$\text{Ecuación 3: } ISA (\%) = \left(\frac{\text{Peso de sobrenadante seco}}{\text{Peso de muestra seca}} \right) \times 100$$

$$\text{Ecuación 4: } IAA (g/g) = \frac{\text{Peso de sedimento húmedo}}{\text{Peso de muestra seca}}$$

3.1.5 Medición objetiva del color

El análisis del color se realizó con un espectrocolorímetro triestímulo (Konica Minolta, modelo CR-10, Japón), con un iluminante estándar D65, observador de 10 grados y componente especular incluida. Las muestras molidas (Sección 3.1.3) se colocaron en una cabina oscura a 25 °C y se obtuvieron los parámetros en el espacio de color CIELAB (CIE, 2001) L^* , a^* y b^* . L^* está asociado a la luminosidad y toma valores del 0 (negro) al 100 (blanco), mientras a^* y b^* son componentes cromáticas con valores entre -120 y +120 asociados al verde (-)/rojo (+) y azul (-)/amarillo (+), respectivamente. Las muestras molidas se colocaron sobre la superficie oscura de la cabina, presentadas en forma de discos de 4 mm de altura. Se realizaron dos lecturas por muestra con tres disparos por cada una. El colorímetro se colocó a 90° de los sistemas. De esta manera se leyó la misma cantidad de muestra para cada sistema y se homogenizaron los efectos del fondo. Este procedimiento se repitió tres veces para cada formulación.

3.1.6 Propiedades mecánicas

La dureza de los extrudidos se determinó mediante un texturómetro (Brookfield Engineering Labs., modelo CT-3, Estados Unidos) equipado con una celda de carga de 50 kg. Se realizó una prueba de corte utilizando una cuchilla Craft de 9 mm de espesor. La fuerza umbral se estableció en 7 g. Todas las muestras analizadas tenían la misma longitud (2 cm) y se colocaron en la misma posición para que las mediciones fueran comparables entre los distintos sistemas. La velocidad inicial de la sonda fue de $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ y una vez que la cuchilla tomó contacto con la muestra, la velocidad se redujo a $0,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta el corte total del extrudido. La dureza (g) se definió como la fuerza máxima necesaria para cortar las muestras.

Los resultados se analizaron mediante el software Brookfield Texture PRO CT V1.6. Se realizaron 10 determinaciones para cada sistema y se informó el resultado promedio.

3.1.7 Evaluación de parámetros de forma y tamaño mediante análisis de imágenes

Mediante análisis de imágenes (ADI) obtenidas mediante cámara digital (Source DFK23U274, Alemania) se evaluaron distintos parámetros de forma y tamaño de los sistemas, siguiendo el método reportado por Blasco y col. (2012). Las muestras, de un centímetro de largo, se colocaron de manera perpendicular a la superficie en el interior de una cabina oscura, a 15 cm de distancia de la cámara digital. La cabina estaba iluminada con lámparas LED de color blanco y la cámara se ubicaba de manera perpendicular a las muestras. La escala utilizada fue de 23.559 píxeles/mm, definida mediante calibración previa del software, y las imágenes tuvieron una resolución de 3264 x 2448 pixeles. Las imágenes, en formato RGB, fueron convertidas a escala de grises (8-bits) y analizadas mediante el software gratuito Image J versión 1.50f (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Las imágenes se transformaron a un formato binario mediante un algoritmo propio del software para separar las muestras del fondo y poder ser analizadas. Posteriormente se seleccionó y cortó el borde de cada imagen binaria para determinar área, perímetro, circularidad y diámetro de Feret. Este último se define como la máxima distancia entre dos puntos del borde de la muestra. Para cada sistema se analizaron como mínimo 50 muestras y se informan los resultados promedio.

3.1.8 Difracción de rayos X (DRX)

Las muestras se Trituraron utilizando un molino de impacto (Sección 3.1.3) y luego un mortero para obtener partículas finas. Posteriormente, se extendió una alícuota de cada sistema

en un soporte de vidrio y se apisonó con una espátula para asegurar una superficie uniforme y plana y se cargó en el difractómetro de rayos X Rigaku MiniFlex 600 (Rigaku, Japón). Se observaron patrones de difracción de rayos X a un voltaje de 40 kV y una corriente de 15 mA. La radiación dispersa se detectó en el rango angular de 2° - 60° (2θ), con una velocidad de escaneo de 2° (2θ) min^{-1} . Los resultados se analizaron utilizando el software MiniFlex Guidance.

3.1.9 Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Para el análisis de la microestructura las muestras extrudidas se cortaron transversalmente con una cuchilla filosa, generando discos de 2-3 mm de espesor, que se pegaron sobre portaobjetos. Se obtuvieron imágenes mediante un microscopio de barrido electrónico de emisión de campo (FEI Quanta 3D FEG Dual Beam (SEM/FIB), FEI Company, Estados Unidos), operando con un haz de electrones de 3 kV.

3.1.10 Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)

La microscopía de barrido láser confocal permite obtener imágenes de diferentes componentes de una muestra utilizando fluorocromos específicos para su tinción. Esta técnica se utilizó para evaluar las interacciones de los componentes y sus distribuciones en las diferentes mezclas después del procesamiento termo-mecánico. Para ello, se cortaron los extrudidos transversalmente utilizando un cuchillo afilado y se observaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal 710 NLO (Carl Zeiss, Alemania), con un objetivo EC Plan-Neofluar 10x/0.3. Dado que todas las muestras mostraron autofluorescencia, se aplicó una

solución de heparina (1000 UI) durante 10 min para contrarrestar este efecto y el exceso se lavó con agua destilada.

Se agregaron tres fluorocromos diferentes para la observación de la distribución de carbohidratos, lípidos y proteínas entre las muestras, siguiendo la metodología reportada por Moisio y col. (2015). En primer lugar, se añadió una solución de 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0,1 % m/v en etanol al 70 %) para teñir las proteínas. Después de 10 minutos en la oscuridad, el exceso se lavó con agua destilada. Luego, para la tinción de carbohidratos, se añadió una solución de rodamina (0,01 % m/v en etanol al 70 %) y después de 10 minutos en la oscuridad, se lavó el exceso con agua destilada. Finalmente, se añadió una solución de Rojo Nilo (0,5 % m/v en etanol al 70 %) para teñir los lípidos y después de 5 minutos en la oscuridad se lavó el exceso con agua destilada. Luego, las muestras se pegaron a portaobjetos y se observaron simultáneamente utilizando longitudes de onda de excitación de 488 nm (para FITC), 561 nm (para rodamina) y 633 nm (para rojo Nilo). Todas las muestras se analizaron por triplicado y las imágenes se adquirieron con una resolución de 1025 x 1025 píxeles.

3.1.11 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Durante la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), la muestra se expone a un haz de rayos X de cierta energía y aquellos electrones con energía de enlace menor a la que están siendo expuestos, son expulsados del átomo. Su energía cinética será aproximadamente igual a la diferencia entre la energía del fotón y la energía de enlace. Dado que la energía de enlace es característica del átomo del que se expulsa, es posible identificar los elementos presentes en la muestra (Fälldt y col., 1993). Así, se identificaron y cuantificaron C, O y N en la superficie externa, sección media y centro de las diferentes mezclas después de la extrusión.

Este se realizó mediante con un espectrómetro K-alpha (Thermo Scientific, Reino Unido) siguiendo el método descrito por Porras-Saavedra y col. (2015). Brevemente, las muestras cortadas transversalmente se colocaron en un portamuestras y se mantuvieron en una cámara de ultra alto vacío durante 24 h. Luego, las muestras se midieron usando una fuente monocromática de rayos X Al K-alfa y un punto de rayos X de 400 μm y los espectros se analizaron usando el software Thermo Scientific Avantage (versión 5.9).

3.1.12 Determinación de propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las diferentes propiedades térmicas y parámetros asociados de los sistemas (gelatinización de almidón, temperatura de transición vítrea, T_g , y relajaciones entálpicas) se determinaron en un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo, modelo 822, Suiza) equipado con un sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido a una presión en el tanque de 150 kPa. Una corriente continua de nitrógeno gaseoso de 200 mL/min, medido con un caudalímetro (Bruno Shillig, Argentina), fue utilizada para evitar la condensación de agua sobre las cápsulas y sobre el sensor. Los termogramas obtenidos se analizaron con el software STARE versión 6.1.

Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra, que se colocaron en cápsulas de aluminio de 40 μL de capacidad y se sellaron herméticamente. El equipo se calibró previamente con indio y zinc (puntos de fusión de 156,6 °C y 419,6 °C, respectivamente) y una cápsula vacía fue utilizada como referencia en todas las determinaciones. Los rangos de temperaturas de las determinaciones se ajustaron para cada experimento según las transiciones a evaluar. El rango máximo utilizado fue desde los -100 °C a los 120 °C, a una velocidad de calentamiento

de 10°C/min. Para asegurar la correcta visualización de las transiciones térmicas, se estableció un margen de temperatura inferior y superior de aproximadamente 30 °C para evitar cualquier distorsión provocada por el calentamiento/enfriamiento. En los sistemas con elevados contenidos de agua, la temperatura máxima de calentamiento no superó los 120 °C de forma tal de evitar la ruptura de la cápsula provocada por el aumento de la presión de vapor. En todos los casos se realizaron mediciones por duplicado y se informa el resultado promedio.

Particularmente, para la evaluación de la gelatinización completa del almidón se colocaron las muestras molidas en exceso de agua (relación 3:1) y las determinaciones se realizaron en el rango -30 °C a 120 °C. La gelatinización completa del almidón se confirma tras la ausencia de transiciones térmicas en el rango de 55 °C – 70 °C, que es el habitual para los almidones de cereales y pseudocereales en estudio (Farroni y Buera, 2014; Suma y Urooj, 2015; Jafari y col., 2017; Irani y col., 2017; Gerrano y col., 2014).

Por otro lado, durante el análisis de la temperatura de transición vítrea (T_g), las relajaciones entálpicas asociadas y su relación con el contenido de agua, las muestras se equilibraron a diferentes humedades relativas (Sección 3.4). Una vez equilibradas, se colocaron en las cápsulas de aluminio y se llevaron a cabo las determinaciones, ajustando los rangos de temperatura en cada caso según el contenido acuoso del sistema. La T_g se estableció como la temperatura de inicio de la discontinuidad en la curva de flujo térmico vs. temperatura, que indica un cambio en la capacidad calorífica (C_p) de la muestra. Para describir los efectos del agua sobre la T_g , se modelaron los resultados siguiendo la ecuación de Gordon y Taylor (Gordon y Taylor, 1952) (Ecuación 5):

$$\text{Ecuación 5: } T_g = \frac{W_1 T_{g1} + k W_2 T_{g2}}{W_1 + k W_2}$$

donde T_{g1} y T_{g2} son las temperaturas de inicio de la transición vítrea de la porción amorfa y el agua (-135 °C), respectivamente, W_1 y W_2 es la fracción en masa de la porción sólida y el agua, respectivamente, y k es una constante asociada al efecto del agua sobre la T_g .

3.1.13 Movilidad molecular por resonancia magnética nuclear (¹H-RMN)

La movilidad molecular del agua y los sólidos se evaluó mediante resonancia magnética nuclear de protones resuelta en el tiempo (¹H-RMN) con un equipo Bruker minispec mq 20 (Alemania), con un campo de 0,47 T y operando a 20 MHz a una temperatura constante de 40 °C. La movilidad de protones se analizó por medición de los tiempos de relajación espín-espín (T_2) de muestras equilibradas a diferentes valores de humedad relativa (Sección 3.4) y en el rango de temperatura de 10 °C a 80 °C, con mediciones cada 10 °C. Para ello las muestras se colocaron en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta una altura de 5 cm, se comprimieron para evitar la presencia de aire y finalmente los tubos se taparon y sellaron para evitar cambios en los valores de humedad relativa o la salida de vapor de agua durante el calentamiento. El calentamiento se llevó a cabo en un baño térmico (Haake, modelo Phoenix II C35P, Thermo Electron Corporation, Alemania).

Se evaluaron los tiempos de relajación T_2 mediante tres secuencias de pulsos diferentes, de forma tal de analizar los protones de distintas movilidades en todo el rango de temperatura y humedad relativa de las muestras. Para medir los tiempos de relajación más cortos (unos pocos microsegundos), los cuales están relacionados con los sólidos de la matriz y las poblaciones de agua que tienen fuertes interacciones con los sólidos, se analizó el decaimiento libre de la inducción FID (*free induction decay* en inglés). El FID consiste en realizar las mediciones luego de un solo pulso de 90°. Se adquirieron 250 puntos de datos en un período

de 0,5 ms y se registraron suficientes puntos de manera que la línea de base fuera cero. El T_2 se determinó por el envolvente del decaimiento de la señal.

El decaimiento libre de la inducción es afectado por las inhomogeneidades en el campo magnético. Esto es, los núcleos en un sector de la muestra experimentan un campo levemente diferente que los de otro sector. El T_2 medido en estas condiciones se conoce como T_2 aparente. Sin embargo, cuando los tiempos de relajación son del orden de los microsegundos, el T_2 aparente es muy cercano al T_2 intrínseco (Fullerton y Cameron, 1988). Cuando los tiempos de relajación son más largos, la difusión hace que los núcleos se muevan de una parte a otra del campo magnético durante la medición. En estos casos las inhomogeneidades del campo afectan la amplitud de la señal observada. Para abordar este problema se han desarrollado técnicas que utilizan secuencias de pulsos de 180° para reenfocar la magnetización y poder medir el decaimiento con mayor precisión. Para el rango de T_2 entre microsegundos y milisegundos se utilizó la secuencia de eco de espín de Hahn (Hahn, 1950) que consiste en un pulso de 90° y uno de 180° separados por intervalos crecientes ($90^\circ-\tau-180^\circ$) con un intervalo de tiempo entre impulsos (τ) de 0,001 a 4 ms y se adquirieron 40 puntos de datos. Finalmente, para medir los tiempos de relajación desde 0,5 milisegundos y más, se utilizó la secuencia de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Ruan y Chen, 1998). Esta secuencia consiste en un pulso de 90° seguido de una serie de pulsos de 180° en el tiempo τ , 3τ , 5τ , etc. para reenfocar la señal, de la cual se obtienen ecos en los tiempos 2τ , 4τ , 6τ , etc. Esta secuencia está asociada a poblaciones de agua que presentan interacciones débiles con sólidos de matriz. Los ajustes de CPMG fueron: separación de pulsos de 0,04 ms para adquirir 256 puntos de datos con 3 ecos ficticios (o *dummy shots*). Para todas las secuencias, la longitud del pulso de 90° y 180° fue 2,74 y 5,12 μ s, respectivamente, se utilizaron 3 s como retardo de ciclo y se utilizaron 4 *scans* para mejorar la relación señal-ruido.

Las señales de ^1H -RMN fueron ajustadas a modelos de comportamiento mono-exponencial (Ecuación 6) o bi-exponencial (Ecuación 7), según los mejores resultados de ajuste:

$$\text{Ecuación 6: } I = Ae^{\frac{-t}{T_2}}$$

$$\text{Ecuación 7: } I = A_1e^{\frac{-t}{T_{21}}} + A_2e^{\frac{-t}{T_{22}}}$$

donde I es la intensidad de la señal al tiempo t , T_2 es tiempo de relajación de los protones y A es proporcional al número de protones asociados a la señal, T_{21} es el tiempo de relajación de los protones correspondientes a la fracción de menor movilidad, A_1 es proporcional al número de protones asociados a los tiempos T_{21} , T_{22} es el tiempo de relajación de los protones correspondientes a la fracción de mayor movilidad y A_2 es proporcional al número de protones asociados a los tiempos T_{22} .

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y los resultados promedio de las secuencias de FID y eco de espín de Hahn se graficaron usando el software GraphPad Prism versión 6. Además, los valores de T_2 de FID se graficaron vs. el contenido de agua de las muestras para analizar la movilidad molecular de la matriz y su asociación con la temperatura de transición vítrea (Farroni y col., 2008). Por otro lado, los tiempos de relajación de las secuencias de eco de espín de Hahn y CPMG también se procesaron con el software OpenWin (Alma Mater Studiorum, Bolonia, Italia), que convierte estas señales con una transformación de Laplace inversa para obtener la distribución de las poblaciones de protones, que se graficaron en una escala logarítmica utilizando el software OriginPro versión 2017 (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

3.2 Productos laminados

3.2.1 Optimización del proceso mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Las diferentes condiciones de procesamiento para la elaboración de los *snacks* o bocaditos se analizaron mediante un diseño de Box-Behnken (DBB), considerando únicamente la utilización de harina de maíz. Las variables independientes analizadas (X_i), con sus respectivos niveles, fueron: adición de agua (g/15 g de harina) (6 – 12 g), tiempo de tostado (7 – 12 min) y temperatura de tostado (200 – 270 °C). Los rangos considerados para cada variable independiente fueron definidos de acuerdo con evaluaciones previas en los cuales se consideraron el grado de cocción (gelatinización de almidón), color y aspecto general de los productos. Además, estos valores se encuentran en el mismo rango que los utilizados en condiciones domésticas o industriales para la elaboración de productos similares (Giovanelli y Cappa, 2021; Gökmen, Çetinkaya Aşar, Köksel, y Acar, 2007). Las variables dependientes o respuesta (Y_i) evaluadas en el DBB fueron: contenido de agua final (%), base seca (b.s.)), parámetros de color CIELAB (L^* , a^* y b^*) y contenido de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) (ppm). Las diferentes combinaciones de las variables y sus respectivas codificaciones de niveles del DBB se encuentran en la Tabla 12.

Para calcular los valores predichos de las variables respuesta se aplicó un modelo polinómico de segundo orden (Ecuación 8):

$$\text{Ecuación 8: } Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

donde Y es la variable respuesta o dependiente, b_0 es el término independiente, b_i , b_{ii} y b_{ij} es el término lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, y X_i y X_j son las variables independientes.

Las condiciones experimentales de las variables dependientes fueron evaluadas mediante análisis de varianza (ANOVA), análisis de regresión y de las figuras resultantes de las combinaciones (MSR). Todos los resultados, gráficos y coeficientes resultantes fueron analizados mediante el software Design-Expert® (versión 11) y el valor- F , respectivamente.

3.2.1.1 Preparación de muestras

Los productos laminados se prepararon utilizando *grits* de maíz (*Zea mays L.*) variedad *Flint*, que fueron provistos por una empresa local (Buenos Aires, Argentina). Para la obtención de harina de maíz, los *grits* se molieron con un molinillo de Butt (Molab-2, Decalab S.R.L, Argentina) que se tamizaron a través de una malla número 14, con un tamaño de apertura de 1,41 mm.

Los *snacks* se prepararon en condiciones similares a las utilizadas normalmente a nivel industrial, siguiendo las indicaciones reportadas por Cueto y col. (2017), con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron 15 g de harina de maíz que se colocaron en una placa de Petri, a la cual se le agregaron cantidades variables de agua, según el diseño experimental (Sección 3.2.1). Posteriormente se cocinaron en una olla a vapor durante 1 hora. Las muestras cocidas se desmoldaron y colocaron sobre papel aluminio, donde se enfriaron durante 5 min. A continuación, las muestras se laminaron usando una sobadora manual semi industrial de rodillos giratorios (RD, modelo S-300-M, Argentina), con una separación entre rodillos de 2 mm. Finalmente, las muestras laminadas se tostaron en un horno convectivo (A.E.W Imperial

Works, Inglaterra) utilizando flujo de aire forzado, a tiempos y temperaturas variables, según el diseño experimental (Sección 3.2.1). El mismo lote de *grits* se utilizó en todos los casos para evitar variaciones dadas por la materia prima.

3.2.1.2 Evaluación del color mediante análisis de imágenes

El color de los *snacks* se evaluó mediante análisis de imágenes, siguiendo la metodología reportada por Cueto y col. (2017) y Agudelo-Laverde y col. (2013). Se utilizó un sistema de visión computarizado (SVC) compuesto de una caja gris estándar de luminosidad 50 en escala de Munsell, un iluminante D65 ubicado en la parte superior, que es el más cercano para la representación de la luz diurna, y una cámara digital (EOS 40D, Canon Inc., Estados Unidos) controlada a través del software de captura remota EOS utility (Canon Inc., Estados Unidos). Las muestras se colocaron en el interior de la caja y la cámara se dispuso en ángulo de 45° con el plano de la muestra, a una distancia de 40 cm. Las fotografías se tomaron utilizando los siguientes parámetros: velocidad de obturación 1/8 segundos (sin *zoom*, ni *flash*), modo macro enfocado, apertura de $f = 6,3$ y sensibilidad ISO 100. Las imágenes tuvieron una resolución de 3888 x 2592 píxeles y se analizaron con el software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., Estados Unidos) para convertirlas en escala Lab. Finalmente, los valores Lab de cada muestra se convirtieron a los parámetros estándar del espacio de color CIELAB (L^* , a^* y b^*) (Sección 3.1.5) mediante fórmulas matemáticas (Ecuación 9, Ecuación 10 y Ecuación 11), descritas por Yam y Papadakis (2004):

$$\text{Ecuación 9: } L^* = \frac{L}{255} \times 100$$

$$\text{Ecuación 10: } a^* = \frac{240a}{255} - 120$$

$$\text{Ecuación 11: } b^* = \frac{240b}{255} - 120$$

La diferencia de color en el espacio CIELAB (ΔE_{ab}^*) se calculó a partir de la siguiente ecuación (Ecuación 12):

$$\text{Ecuación 12: } \Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son las diferencias entre los valores medidos de L^* , a^* y b^* de cada muestra y los correspondientes a los *grits* crudos ($L_g^* = 64$, $a_g^* = 19$, $b_g^* = 65$), tomados como referencia.

3.2.1.3 Determinación del contenido de agua

Los *snacks* se molieron con un molinillo Butt (Sección 3.2.1.1) y 1 g de cada muestra se calentó en estufa a 105 °C durante 24 h, hasta peso constante (método 930.15, AOAC, 2005). El contenido de agua (%, b.s.) se determinó por triplicado, mediante diferencia de peso.

3.2.1.4 Contenido de hidroximetilfurfural (HMF) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la extracción de HMF, los *snacks* se trajeron siguiendo el método propuesto por Ameur y col. (2006). Brevemente, se suspendió 1 g de las muestras molidas en 10 mL de agua mili-Q y se le añadieron 2,5 mL de solución de ácido tricloroacético al 40 % (m/v). Después de agitar durante 5 min, la mezcla se ajustó a un volumen final de 25 mL con agua mili-Q y se

centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 25 °C. Se tomó una alícuota de 200 μ L que se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 μ m (Waters, Estados Unidos).

Para la cuantificación de HMF se utilizó un sistema Alliance HPLC equipado con detector de arreglo de diodos (DAD) Waters 2995 (Waters, Estados Unidos). Para la separación de compuestos se usó una columna Waters X-Bridge C₁₈ de 2,1 mm x 100 mm con un diámetro de partícula de 3,5 μ m operando a 25 °C. La fase móvil consistió en una solución de acetonitrilo-agua 5:95 (v/v) con un gradiente lineal de 20 min y un caudal de 0,1 mL·min⁻¹ (Favre y col., 2020). El volumen de inyección fue de 10 μ L. La absorbancia se monitoreó a 284 nm y en estas condiciones el HMF presentó un tiempo de retención de 7,4 min (Cueto y col., 2017). La curva de calibración se obtuvo a partir de soluciones de HMF en el rango 0,02 – 23 ppm (Figura 8).

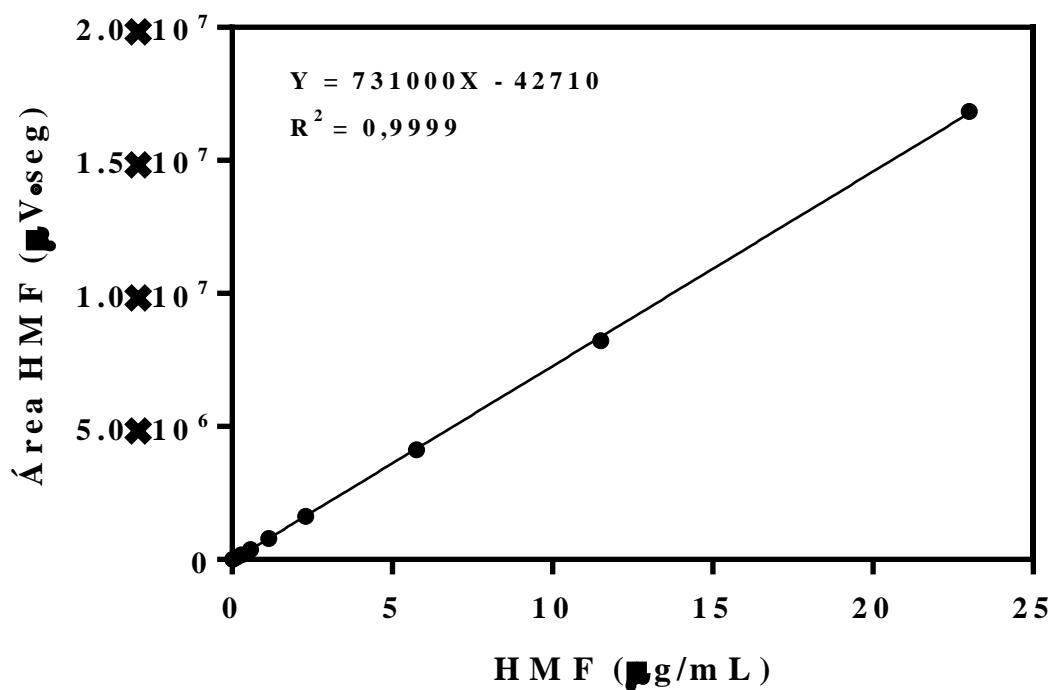


Figura 8: Curva de calibración del contenido de hidroximetilfurfural (HMF), utilizando soluciones estándar en el rango 0,02 – 23 ppm. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

3.2.1.5 Optimización y verificación del modelo

La función de deseabilidad D (Ecuación 13) se utilizó para optimizar múltiples respuestas de forma tal de obtener la combinación de las variables independientes que llevaron a los niveles de compromiso de las respuestas evaluadas (Derringer y Suich, 1980):

$$\text{Ecuación 13: } D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \dots d_i(Y_i))^{\frac{1}{i}}$$

donde $d_i(Y_i)$ son los valores normalizados (de 0 a 1) de cada respuesta estudiada. Los criterios aplicados para la optimización fueron: minimizar la formación de HMF para reducir el daño térmico, lograr un bajo contenido de agua final para asegurar la estabilidad de almacenamiento (3 – 8 %, b.s.), pero manteniendo las características de color adecuadas: valores de L^* entre 45 – 55, de a^* entre 10 – 30 y de b^* entre 35 – 50 (Cueto y col., 2017; Farroni y Buera, 2012; Sumithra y Battacharya, 2008). El recurso de optimización numérica del software Design-Expert® (versión 11) proporcionó un punto de combinación donde D se maximiza. Para verificar la adecuación del modelo para predecir los valores de las respuestas en el punto de combinación proporcionado para el D máximo, se prepararon los *snacks* en las condiciones dadas por el modelo. Se midieron los valores de las variables de respuesta y luego se compararon con los valores predichos. La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV), de la siguiente manera (Ecuación 14):

$$\text{Ecuación 14: } CV = \frac{\Delta X}{X_p} \times 100$$

donde ΔX indica la diferencia entre los valores observados y los predichos y X_p es el valor promedio de la respuesta.

3.2.2 Preparación de mezclas

De manera similar a los sistemas extrudidos, se evaluaron los efectos de la incorporación de 25 % de mijo perlado (*Pennisetum glaucum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor*), quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd, cv. ‘real’) y alpiste sin sílice (*Phalaris canariensis* L.) que se adquirieron en forma de harina o grano (según disponibilidad y forma de comercialización) en un mercado local de la ciudad de Buenos Aires. En el caso de que se tratara de granos, las harinas integrales de estos cereales se obtuvieron moliendo en un molinillo de Butt (Sección 3.2.1.1) y luego tamizando a través de una malla número 14, con un tamaño de apertura de 1,41 mm. Las harinas integrales se mezclaron con la harina de maíz y se elaboraron los *snacks* en las condiciones óptimas definidas por el diseño experimental (Sección 3.2.1) obteniéndose los 5 sistemas de estudio: control (M), maíz + mijo (M-M), maíz + sorgo (M-S), maíz + quínoa (M-Q) y maíz + alpiste (M-A).

3.2.3 Pruebas de almacenamiento

Con el fin de evaluar cambios en las propiedades físicas y químicas de los sistemas laminados en el tiempo, se elaboraron lotes de las diferentes mezclas que fueron almacenados a 25 °C durante 2, 4 y 6 meses en envases de polietileno de baja densidad cerrados. Estos se compararon con lotes recién preparados (tiempo 0 – T0) que se utilizaron como control. Al mismo tiempo, para evaluar los cambios generados durante el proceso, también se analizaron las mezclas de harinas crudas. De esta manera se logra evaluar en simultáneo los efectos que tienen tanto el proceso de obtención de los *snacks* como el tiempo de almacenamiento sobre características fisicoquímicas de estabilidad y calidad de interés.

3.2.3.1 Cambios de color

Como parte de las evaluaciones fisicoquímicas de los sistemas, se evaluó el cambio de color en coordenadas CIELAB generado por el procesamiento y el tiempo de almacenamiento mediante análisis de imágenes, siguiendo la metodología detallada en la Sección 3.2.1.2. Es importante aclarar que el color de las mezclas crudas se analizó directamente mediante fotocolorímetro Konica Minolta, modelo CM-700d (Konica Minolta Inc., Tokio, Japón) de igual manera a lo detallado en la Sección 3.1.5.

3.2.3.2 Actividad antioxidante

3.2.3.2.1 Obtención de extractos para evaluación de contenido de polifenoles y actividad antioxidante

La preparación de los extractos de los diferentes sistemas se realizó mediante adaptación de la metodología reportada por Félix-Medina y col. (2021). Brevemente, se tomó 1 g de muestra molida, a la cual se le agregaron 10 mL de etanol 80 % (v/v). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 350 rpm, seguido de centrifugación a 5000 rpm a 5 °C durante 10 minutos. Este proceso se repitió sobre el mismo gramo de muestra inicial en todos los casos. Luego de la segunda extracción, ambos sobrenadantes se juntaron, obteniéndose un volumen final de 20 mL de extracto en cada caso.

La actividad antioxidante de los sistemas crudos y almacenados a distintos tiempos se evaluó mediante cuantificación de compuestos polifenólicos totales (CPT) por método de Folin-Ciocalteau, método de captura de radicales por el reactivo de DPPH• (2,2-difenil-2-picrilhidracilo) y método FRAP de evaluación de poder reductor. Todas las determinaciones se realizaron mediante espectrofotómetro UV-Vis Jasco, modelo V-630.

3.2.3.2.2 Cuantificación de compuestos polifenólicos totales (CPT) por método de Folin-Ciocalteau

Para la cuantificación se tomaron 50 μ L de extracto previamente obtenido según lo indicado en Sección 3.2.3.2.1, al cual se le agregaron 800 μ L de agua, 125 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 125 μ L de solución de carbonato de sodio al 20 %. El sistema se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a 40 °C y posteriormente se evaluó la absorbancia a 765 nm. Se construyó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de ácido gálico (AG) y se expresó el resultado en mg de AG/g de muestra (Figura 9).

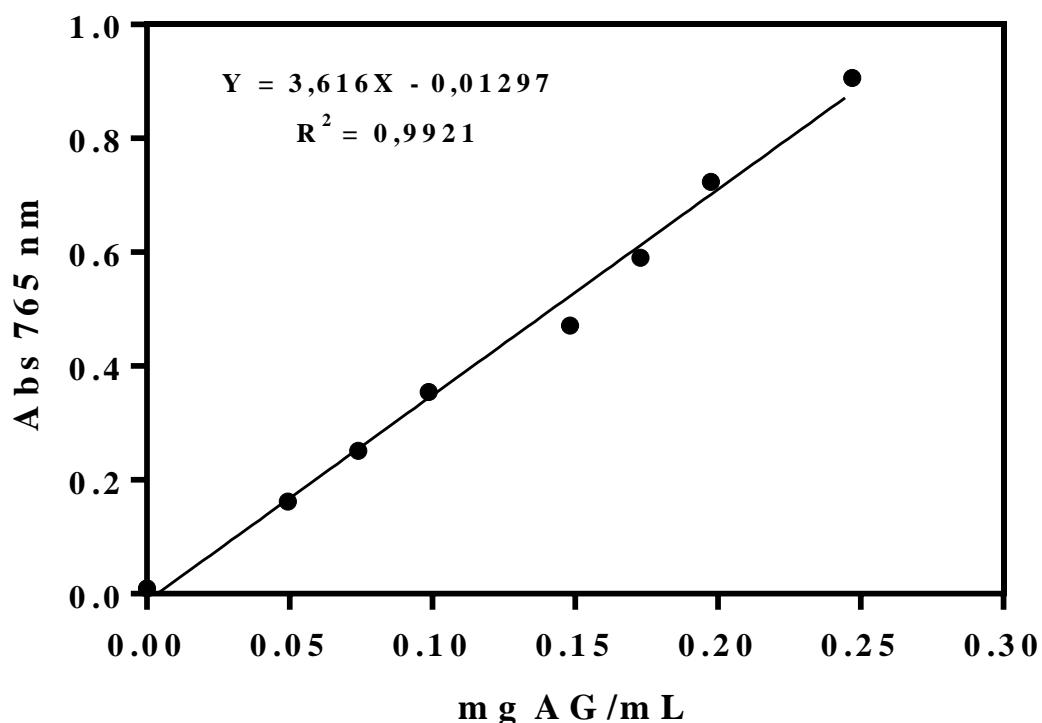


Figura 9: Curva de calibración del contenido de compuestos polifenólicos totales (CPT) mediante método de Folin-Ciocalteau, utilizando soluciones estándar de ácido gálico (AG). Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

3.2.3.2.3 Método de captura de radicales por el reactivo de DPPH•

Se tomaron 50 μL de extracto obtenido según Sección 3.2.3.2.1 que se mezclaron con 950 μL de una solución etanólica recién preparada de radical DPPH• (2,2-difenil-2-picrilhidracilo) con una absorbancia a 517 nm igual o cercana a 1, que se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (Chaillou y Nazareno, 2006). Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia de la mezcla a 517 nm y el porcentaje de inhibición, asociado a la actividad antioxidante de la muestra, se calculó de la siguiente manera (Ecuación 15):

$$\text{Ecuación 15: } \%I = 100 \times \left[1 - \frac{A_{30}}{A_0} \right]$$

donde $\%I$ es el porcentaje de inhibición del radical DPPH•, A_{30} es la absorbancia a 517 nm del sistema luego de los 30 minutos y A_0 es la absorbancia inicial a 517 nm de la solución etanólica de DPPH•. A partir de una curva de calibración con soluciones estándar de AG se expresaron los resultados en mg de AG/g de muestra (Figura 10).

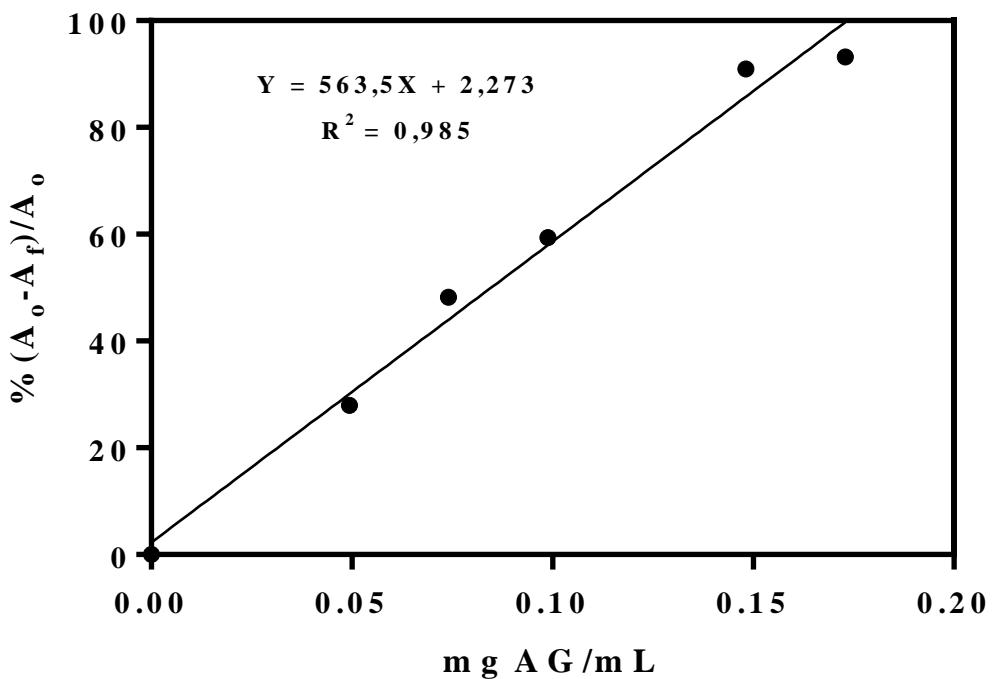


Figura 10: Curva de calibración del porcentaje de degradación del radical DPPH•, en asociación a la actividad antirradicalaria, utilizando soluciones estándar de ácido gálico (AG). Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

3.2.3.2.4 Método FRAP de evaluación de poder reductor

Para la evaluación del poder reductor se tomaron 60 μ L de extracto obtenido según Sección 3.2.3.2.1 y se agregaron 840 μ L de reactivo FRAP recién preparado (Benzie y Strain, 1996). El reactivo FRAP se prepara de la siguiente manera: 2,5 mL de una solución 10 mM de TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) disuelto en HCl 40 mM (Biopack, Argentina) se mezclan con 2,5 mL de una solución 20 mM de FeCl₃·6H₂O (cloruro férrico hexahidratado) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 25 mL de un buffer acetato (Biopack, Argentina) de 300 mM (pH 3.6). La muestra y el reactivo FRAP se dejan incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriores a los cuales se realiza la medición de

absorbancia a 595 nm. Con una curva de calibración construida a partir de soluciones estándar de AG, se expresó el resultado en mg de AG/g de muestra (Figura 11).

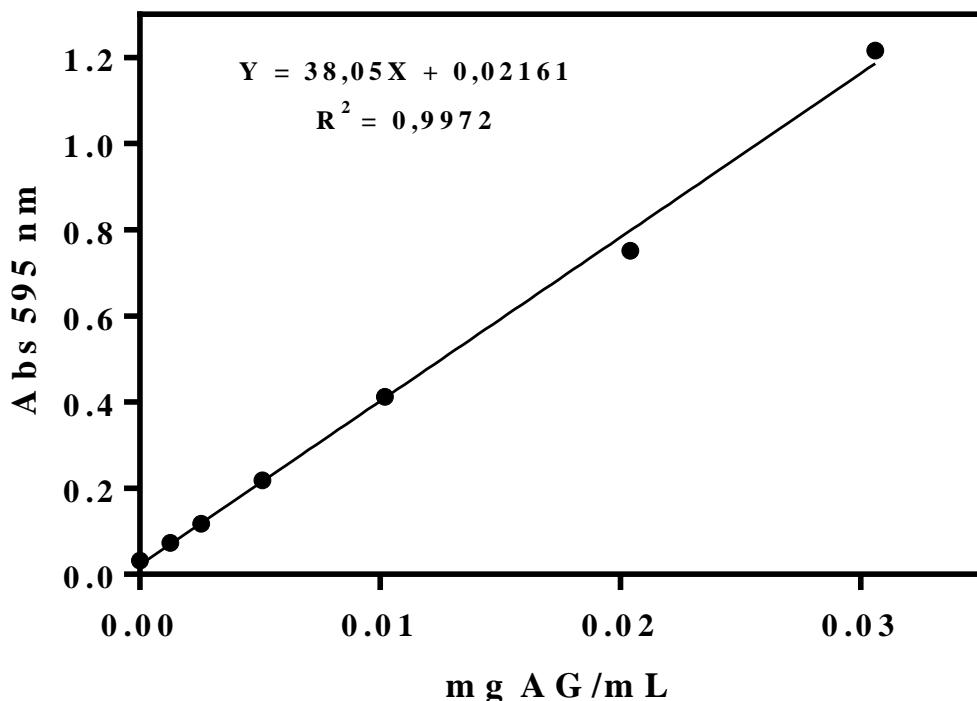


Figura 11: Curva de calibración del poder reductor, mediante técnica FRAP, utilizando soluciones estándar de ácido gálico (AG). Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

3.2.3.3 Extracción y evaluación de carotenoides

La extracción de carotenoides se realizó siguiendo indicaciones de Li y Beta (2012), con algunas modificaciones. A un gramo de muestra molida se le adicionaron 12,5 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de etanol-acetona. Luego de 15 minutos de agitación a 350 rpm, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm, durante 15 min y a 5 °C. La extracción se repitió sobre el mismo gramo inicial de muestra y ambos sobrenadantes se unificaron.

Con el objetivo de evaluar la presencia de carotenoides, así como las modificaciones debidas al procesamiento y almacenamiento de los sistemas, se realizó un registró del espectro de los extractos obtenidos de todos los sistemas en el rango 350-800 nm mediante espectrofotómetro UV-Vis (Jasco, modelo V-630, Estados Unidos). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.2.3.4 Determinación de absorbancia a 294 y 420 nm

Con el fin de hacer estimaciones del desarrollo de la reacción de Maillard, de manera complementaria a los cambios de color se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 294 y 420 nm, que corresponde a la región donde absorben compuestos intermediarios y finales de la reacción, respectivamente (Farroni y Buera, 2012). Estos últimos repercuten en el color de los sistemas. Para ello se tomó una alícuota de los extractos previamente obtenidos (Sección 3.2.3.2.1) y se evaluó la absorbancia a 294 y 420 nm. Cada sistema se analizó por triplicado.

3.2.3.5 Cuantificación de hidroperóxidos

Los hidroperóxidos se cuantificaron mediante el método colorimétrico de tiocianato férrico, adaptado de Shantha y Decker (1994). Se realizó la extracción de los hidroperóxidos mediante el agregado de 9,8 mL de una solución de cloroformo y metanol (7:3, v/v) a 0,1 g de muestra molida, seguido de una agitación en vórtex durante 5 segundos. A la mezcla se le agregaron 50 μ L de tiocianato de amonio al 30 % (m/v) y se volvió a agitar en vórtex por otros 5 segundos. Luego se añadieron 50 μ L de una solución de cloruro ferroso obtenida por la mezcla 1:1 (v/v) de sulfato ferroso (0,5 g en 50 mL de agua) y cloruro de bario (0,4 g en 50

mL de agua). La mezcla final se agitó 5 segundos en vórtex y se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm. Para la cuantificación de los hidroperóxidos presentes en los sistemas se realizó una curva de calibración con soluciones de hidroperóxido de cumeno en el rango 0,02 – 0,4 mg/mL (Figura 12).

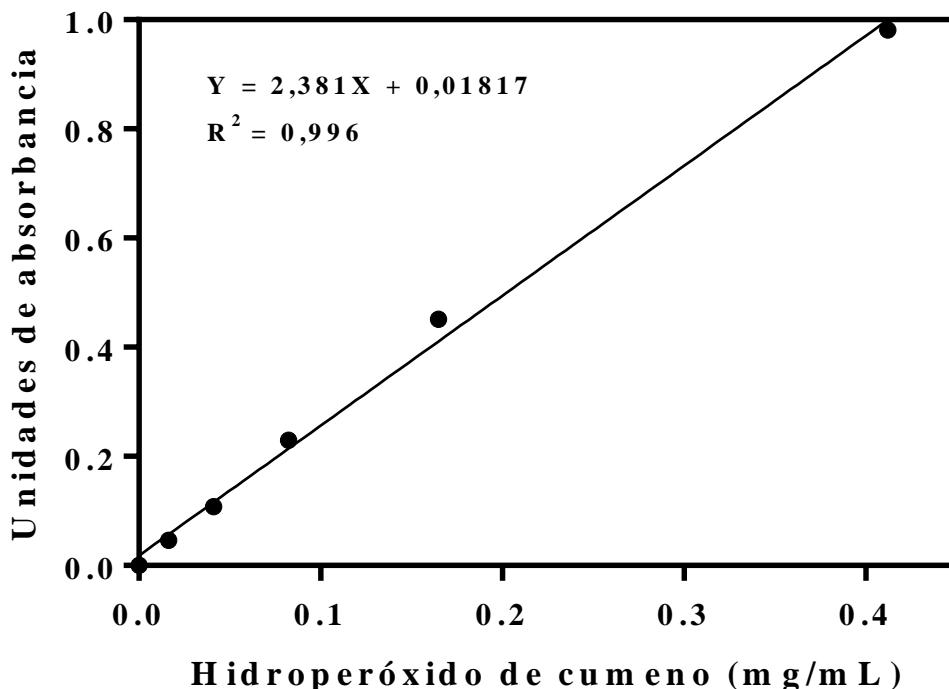


Figura 12: Curva de calibración de la concentración de hidroperóxidos, utilizando soluciones estándar de hidroperóxido de cumeno. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

A partir de los datos de la curva, se calculó la concentración de hidroperóxidos (meq de peróxido/kg muestra) según la Ecuación 16:

$$\text{Ecuación 16: } \text{Hidroperóxidos (meq/kg)} = \frac{A*m}{55,84*m_0*2}$$

donde A es la absorbancia de la muestra a 500 nm, m es la pendiente de la curva de calibración, 55,84 es el peso atómico del hierro, m_0 es la masa en gramos de la muestra y la división por 2 es necesaria para expresar los resultados en miliequivalentes de peróxido.

3.3 Medición de contenido y actividad de agua

El contenido de agua de los diferentes sistemas extrudidos y laminados se determinó por secado a 105 °C en una estufa de circulación forzada, hasta peso constante (método 930.15, AOAC, 2005). Los resultados se expresaron como gramos de agua cada 100 gramos de materia seca (% b.s.). Por otro lado, la actividad de agua se determinó mediante el punto de rocío utilizando un equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices, Washington, Estados Unidos). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se informa el promedio, junto con el desvío estándar.

3.4 Modelado de isotermas de adsorción de agua

Las muestras extrudidas y laminadas molidas se expusieron a diferentes humedades relativas (17-98 % HR) usando soluciones saturadas de sales a 25 °C en recipientes cerrados herméticamente, siguiendo el método isopiéstico (Greenspan, 1977). Los modelos matemáticos de D'arcy y Watt (GDW) (D'arcy y Watt, 1970) (Ecuación 17) y Guggenheim, Anderson y de Boer (GAB) (Van den Berg y Bruin, 1981) (Ecuación 18) se utilizaron para describir la relación actividad de agua (a_w) vs. contenido de agua:

$$\text{Ecuación 17: } M_e = \left(\frac{mKh_r}{1 + Kh_r} \right) \cdot \left(\frac{1 - k(1 - w)h_r}{1 - kh_r} \right) \quad (\text{GDW})$$

donde M_e es el contenido de humedad en equilibrio (% b.s.), m es el máximo valor de agua límite de hidratación, h_r es la humedad relativa (HR/100), K y k son las constantes de adsorción de la primera y posteriores capas de sitios activos de los sólidos, respectivamente, y w indica la relación de moléculas de agua adsorbidas en sitios primarios que se convierten en sitios secundarios de adsorción.

$$\text{Ecuación 18: } \frac{a_w}{m} = \left(\frac{1}{m_0 CK} \right) + \left(1 - \frac{2}{C} \right) a_w + \left(\frac{(1/C)-1}{m} k \right) a_w^2 \quad (\text{GAB})$$

donde m es el contenido de agua (% b.s.), a_w es la actividad de agua (HR/100), C es la constante de Guggenheim y está relacionada con el calor de sorción del agua a la primera capa de sitios activos del sólido, k es un factor que corrige las propiedades de las moléculas de agua de la multicapa respecto del agua libre y m_0 es el contenido de agua límite de hidratación.

Las ecuaciones se ajustaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 6). Para verificar el ajuste de los modelos se determinaron el coeficiente de determinación (R^2), la desviación porcentual relativa media (%DPRM, Ecuación 19) y el porcentaje de la raíz del error cuadrático medio (%RECM, Ecuación 20):

$$\text{Ecuación 19: } \%DPRM = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|h_i - h_{pi}|}{h_i} \right) * 100$$

$$\text{Ecuación 20: } \%RECM = \left(\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{h_i - h_{pi}}{h_i} \right)^2} \right) * 100$$

donde h_i y h_{pi} son los valores de humedad reales y predichos por el modelo, respectivamente, y N es el número de observaciones. En aquellos casos donde R^2 sea mayor a 0,85, valores de

%DPRM menores a 10 % y valores de %RECM cercanos a cero los ajustes son considerados adecuados (Wani y Kumar, 2016).

3.5 Espectroscopía infrarroja y Raman con transformada de Fourier (FT-IR y FT-Raman)

3.5.1 Sistemas extrudidos

Las muestras antes y después de la extrusión se analizaron mediante espectroscopías FT-IR y FT-Raman para evaluar los efectos del proceso sobre las interacciones de los componentes a nivel molecular. Las muestras extrudidas se molieron como se menciona en la Sección 3.1.3. Los espectros FT-IR se obtuvieron con un módulo FT-IR IR², equipado con un detector de arseniuro de indio y galio (InGaAs) y un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) con un cristal de diamante, acoplado a un espectrómetro LabRAM HR800 (Horiba Jobin Yvon, Japón). Las muestras se apisonaron con una espátula para asegurar una superficie uniforme y plana y se registraron espectros en la región de 400-4000 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ y una acumulación de 32 barridos por medición. Los espectros se trabajaron con el software LabSpec (Horiba Jobin Yvon, Japón), donde se les corrigió la línea de base, se convirtieron a unidades de absorbancia y se normalizaron utilizando el software Spekwin 32.

Los espectros FT-Raman se adquirieron utilizando un espectrómetro LabRAM HR800 (Horiba Jobin Yvon, Japón), acoplado a un microscopio Olympus BX 41 con un objetivo de 50x y un detector de dispositivo acoplado refrigerado por Peltier con 56,7 mW de potencia de salida. Los espectros se registraron utilizando una rejilla de 400 líneas·mm⁻¹ y con un láser de emisión de 784.12 nm. La resoluciónpectral fue de 2 cm⁻¹. Las mediciones se realizaron en el rango de números de onda de 100 cm⁻¹ a 3400 cm⁻¹, a temperatura ambiente. Los espectros

se registraron aplicando un tiempo de exposición de 3 s y escaneando cada muestra al menos seis veces. Todos los espectros FT-Raman se suavizaron dos veces utilizando un polinomio de segundo orden. Los espectros FT-IR y FT-Raman se graficaron usando el software GraphPad Prism (versión 6) para Windows (GraphPad Software, Estados Unidos).

3.5.2 Sistemas laminados

Con el fin de analizar cambios conformacionales o en las interacciones entre componentes, se evaluaron en todos los sistemas los espectros infrarrojos con un equipo de análisis infrarrojo (Perkin Elmer Inc., modelo Spectrum 400, Estados Unidos) equipado con un detector DTGS y un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) (PIKE Technologies Inc., Estados Unidos). Las muestras molidas se colocaron directamente sobre el cristal ATR (diamante/ZnSe, con reflectancia a 45°) y se presionaron hasta alcanzar la intensidad de señal deseada. Los espectros se obtuvieron en la región media, en el rango de 650 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y una acumulación de 64 espectros por muestra. En cada caso se corrigió la línea de base, se convirtieron las señales a unidades de absorbancia y se normalizó el espectro utilizando el software Spectrum (versión 6.3) (Perkin Elmer, Estados Unidos). Debido a la presencia del cristal de ATR, todos los espectros mostraron una región ruidosa en la región 1800-2500 cm^{-1} que no fue considerada en los análisis. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.6 Análisis estadístico

En todos los casos los análisis se realizaron al menos por triplicado y se informa el resultado promedio y el desvío estándar. Se llevaron a cabo análisis estadísticos del tipo análisis

de varianza (ANOVA) y test de comparación de Tukey (valor- $p \leq 0,05$) para encontrar diferencias significativas entre muestras y/o tratamientos.

4. Resultados y discusión

4.1 Sistemas extrudidos

4.1.1 Composición proximal

La Tabla 1 presenta los datos composicionales de humedad, contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos, fibra dietaria y cenizas de los sistemas de mezclas antes (A) y después (D) del proceso de extrusión (%), base seca (b.s.)):

Tabla 1: Composición proximal (%, b.s.) de los sistemas antes (A) y después (D) de la extrusión*

Sistema		Contenido de agua (%, b.s.)	Carbohidratos totales (%, b.s.)	Proteínas (%, b.s.)	Lípidos (%, b.s.)	Fibra dietaria (%, b.s.)	Cenizas (%, b.s.)
M	A	10,9 ± 0,1 ^{bc,B}	66,0 ± 0,3 ^{d,A}	9,5 ± 0,1 ^{a,B}	6,5 ± 0,1 ^{a,B}	5,9 ± 0,1 ^{b,B}	1,17 ± 0,01 ^{a,A}
	D	10,4 ± 0,1 ^{b,A}	69,1 ± 0,1 ^{d,B}	9,0 ± 0,1 ^{a,A}	6,1 ± 0,1 ^{d,A}	4,2 ± 0,1 ^{a,A}	1,15 ± 0,02 ^{a,A}
M-M	A	10,4 ± 0,1 ^{a,A}	62,9 ± 0,2 ^{b,A}	10,44 ± 0,05 ^{c,B}	6,5 ± 0,1 ^{a,B}	8,1 ± 0,1 ^{d,B}	1,65 ± 0,05 ^{c,A}
	D	10,60 ± 0,04 ^{bc,A}	67,2 ± 0,1 ^{b,B}	9,3 ± 0,1 ^{b,A}	5,30 ± 0,04 ^{b,A}	5,88 ± 0,01 ^{c,A}	1,64 ± 0,04 ^{c,A}
M-S	A	11,0 ± 0,1 ^{c,B}	65,9 ± 0,2 ^{d,A}	9,75 ± 0,1 ^{b,B}	6,4 ± 0,1 ^{a,B}	5,78 ± 0,02 ^{b,B}	1,16 ± 0,01 ^{a,A}
	D	10,8 ± 0,1 ^{c,A}	67,3 ± 0,3 ^{b,B}	9,4 ± 0,1 ^{b,A}	6,04 ± 0,04 ^{cd,A}	5,1 ± 0,1 ^{b,A}	1,28 ± 0,01 ^{b,B}
M-Q	A	10,7 ± 0,1 ^{b,A}	64,4 ± 0,1 ^{c,A}	10,83 ± 0,01 ^{d,B}	7,2 ± 0,1 ^{b,B}	5,41 ± 0,02 ^{a,B}	1,47 ± 0,05 ^{b,B}
	D	11,65 ± 0,01 ^{d,B}	68,4 ± 0,1 ^{c,B}	9,7 ± 0,1 ^{c,A}	4,74 ± 0,05 ^{a,A}	4,12 ± 0,05 ^{a,A}	1,31 ± 0,01 ^{b,A}
M-A	A	10,5 ± 0,03 ^{a,B}	61,2 ± 0,1 ^{a,A}	11,3 ± 0,1 ^{e,B}	6,99 ± 0,02 ^{b,B}	7,5 ± 0,2 ^{c,B}	2,21 ± 0,04 ^{d,A}
	D	8,9 ± 0,1 ^{a,A}	65,1 ± 0,3 ^{a,B}	12,7 ± 0,1 ^{d,A}	5,8 ± 0,2 ^{c,A}	5,3 ± 0,1 ^{b,A}	2,16 ± 0,01 ^{d,A}

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. A = antes de extrusión; D = después de extrusión.

*Los resultados están expresados como promedio ± desvío estándar ($n = 3$). El contenido de agua en los sistemas crudos fue determinado previo al acondicionamiento para la extrusión. Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre formulaciones, tanto en sistemas crudos como extrudidos, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias antes y después de la extrusión para cada formulación (valor- $p \leq 0,05$).

En la Tabla 1 se observa que el contenido de agua de los sistemas crudos estuvo en el rango de 10,4-11 % (b.s.), previo al acondicionamiento a 28 % (base húmeda) para la extrusión (Sección 3.1.2). Luego de la extrusión el contenido acuoso rondó entre los 8,9 y 11,65 % (b.s.), con diferencias significativas entre las formulaciones (Rolandelli y col., 2021; Rolandelli y col., 2020). Por otro lado, y a pesar de que los valores de los componentes fueron bastante similares en todas las formulaciones, se encontraron diferencias significativas entre los sistemas luego de la extrusión, especialmente en el contenido de proteínas, lípidos y fibra dietaria, y en particular para los sistemas que contenían harina de mijo (M-M), quínoa (M-Q) y alpiste (M-A). Estas diferencias entre componentes se deben a modificaciones ocurridas durante el proceso de extrusión, que condujeron a cambios en las reactividades durante las diferentes pruebas analíticas de cuantificación (Rolandelli y col., 2021).

Todas las mezclas de harina crudas presentaron mayor contenido de proteínas que el control (M); en particular, las harinas de quínoa y alpiste aportaron los mayores niveles de proteínas y lípidos entre las mezclas. La leve reducción en los valores de proteínas después de la extrusión puede atribuirse también a modificaciones ocurridas durante el proceso que pudieron haber limitado la determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl, tales como entrecruzamientos, formación de puentes disulfuro o el desarrollo de la reacción de Maillard (Félix-Medina y col., 2020; Téllez-Morales y col., 2020; Jebalia y col., 2019; Ramos Díaz y col., 2019). Sin embargo, se mantuvo el mayor contenido proteico en las mezclas extrudidas respecto del control con 100 % de harina de maíz. Particularmente, el sistema M-A presentó casi un 40 % más de proteínas que el control luego de la extrusión.

Respecto a la fibra dietaria, los sistemas crudos que contenían mijo (M-M) y alpiste (M-A) fueron los que presentaron los niveles más altos. Luego de la extrusión, el sistema M-M mantuvo los mayores niveles, seguido por M-A y M-S. La reducción en los niveles de fibra

dietaria de los extrudidos se debe a modificaciones producidas por el calentamiento en la susceptibilidad de los sustratos a las enzimas usadas durante las determinaciones analíticas (Félix-Medina y col., 2020). Por ejemplo, a medida que el almidón gelatiniza, su digestibilidad aumenta y, por lo tanto, los niveles de fibra dietaria se reducen (Zhao y col., 2020; Téllez-Morales y col., 2020).

En cuanto a los lípidos, los sistemas que contenían quínoa (M-Q) y alpiste (M-A) presentaron los mayores niveles entre las mezclas crudas, mientras que luego de la extrusión, los sistemas M-Q mostraron los menores niveles y el control (M) los valores más altos de lípidos. Esta leve reducción luego de la extrusión puede explicarse por la formación de complejos con amilosa o al entrecruzamiento de los lípidos con otros componentes que ocurren durante el procesamiento termo-mecánico (Rolandelli y col., 2021; Rolandelli y col., 2020; Cueto y col., 2018; Jafari y col., 2017), que los hacen menos solubles, contribuyendo a una reducción aparente en sus niveles (Félix-Medina y col., 2020).

Finalmente, los sistemas con harina de alpiste (M-A) y mijo (M-M) presentaron los mayores niveles de cenizas previos a la extrusión, mientras que todas las mezclas extrudidas presentaron valores de cenizas más altos que el control (M). Respecto a los carbohidratos, y dado que se calcularon por diferencia de masa respecto al resto (Sección 3.1.3), también se observaron cambios en sus niveles tanto entre formulaciones como antes y después de la extrusión.

4.1.2 Caracterización de propiedades físicas y mecánicas

Los aspectos principales que definen las propiedades físicas y mecánicas de los extrudidos son las condiciones del proceso termo-mecánico y la composición de las formulaciones (Ajita y col., 2017). Dado que los sistemas se obtuvieron en iguales condiciones

de procesamiento, las diferencias entre las propiedades estudiadas en los sistemas se pueden atribuir a su composición. En la Tabla 2 se encuentran los resultados del grado de expansión (GE), densidad aparente (DA, g/L), índice de solubilidad y absorción de agua (ISA, %, e IAA, g/g) y dureza (g) de los diferentes sistemas extrudidos:

Tabla 2: Propiedades físicas y mecánicas de los sistemas extrudidos*

Sistema	GE	DA (g/L)	ISA (%)	IAA (g/g)	Dureza (g)
M	$1,9 \pm 0,1^b$	916 ± 82^a	$4,7 \pm 0,2^a$	$3,9 \pm 0,1^d$	4177 ± 280^b
M-M	$1,8 \pm 0,1^b$	893 ± 68^a	$4,2 \pm 0,1^a$	$4,8 \pm 0,1^b$	3303 ± 242^d
M-S	$1,9 \pm 0,1^b$	933 ± 69^a	$4,3 \pm 0,2^a$	$4,4 \pm 0,2^c$	3777 ± 288^c
M-Q	$2,1 \pm 0,1^a$	956 ± 78^a	$3,1 \pm 0,3^b$	$5,4 \pm 0,1^a$	6227 ± 329^a
M-A	$1,9 \pm 0,1^{a,b}$	954 ± 67^a	$2,3 \pm 0,2^c$	$4,52 \pm 0,03^{b,c}$	3764 ± 278^c

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. GE: grado de expansión. DA: densidad aparente. ISA: índice de solubilidad en agua. IAA: índice de absorción de agua.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar. Los valores seguidos por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas entre los sistemas (valor-*p* $\leq 0,05$).

La gelatinización del almidón es el factor limitante en la definición del grado de expansión: cuanto mayor sea el grado de gelatinización, mayor será la expansión de la muestra (Wang y col., 2021). Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de todos los sistemas en exceso de agua después de la extrusión mostraron termogramas planos, indicando que durante el proceso se produjo la gelatinización completa del almidón (Sección 4.1.7). Algunos autores (Nikmaram y col., 2015; Oliveira y col., 2018) reportaron una relación inversa

entre el contenido de proteínas y fibra respecto al GE en extruidos a base de maíz. Por otro lado, la adición de harinas con elevados niveles de proteínas y fibra aumentó los niveles de expansión en extruidos a base de otros cereales (Philipp y col., 2017; Philipp y col., 2018; Cueto y col., 2015; Ačkar y col., 2018). En general no se observó una diferencia significativa en los valores de GE respecto del control, salvo para M-Q (maíz + quínoa) que presentó los valores más altos (Tabla 2). La mezcla con alpiste (M-A), con el mayor contenido de proteínas, pero a su vez con mayor contenido de fibra que M-Q, tampoco presentó diferencias en GE con el control. Esto también ocurrió en los sistemas con mijo (M-M), que mostraron los mayores contenidos de fibra y los menores niveles de proteínas y GE entre las diferentes formulaciones. Estos resultados indican que no sólo el contenido de uno de los componentes, sino que el de ambos, su interacción o incluso el tipo de proteína y/o fibra pueden afectar el grado de expansión de los extruidos. No se encontraron diferencias significativas en los resultados de densidad aparente entre las diferentes formulaciones, con valores que rondaron entre 893 g/L y 956 g/L. Sin embargo, una tendencia de mayor DA se pudo observar para los sistemas M-Q y M-A, que pudo estar asociado a sus mayores contenidos de proteína y fibra (Rolandelli y col., 2021; Nikmaram y col., 2015).

Por otro lado, los sistemas M-Q mostraron los mayores IAA, seguidos por M-M, M-A y M-S, mientras que el control (M) presentó los menores niveles. Los mayores contenidos de proteínas y fibra (Tabla 1) pudieron permitir una mayor retención de moléculas de agua en la estructura formada post extrusión en comparación con el control. M-Q también presentó el mayor contenido de agua final luego de la extrusión, lo cual también justificaría los mayores valores de IAA y GE, ya que una estructura más expandida permite una mayor superficie para la adsorción de agua. Además, mayores contenidos de fibra pudieron contribuir también a ligar mayores cantidades de agua, lo que podría justificar los resultados para las formulaciones M-

M, M-A y M-S. La misma tendencia se observó para el reemplazo de harina de maíz por sésamo (Nikmaram y col., 2015) o salvado de avena (Kasprzak y col., 2013). Respecto al ISA, los mayores niveles los presentaron los sistemas M, M-M y M-S, indicando mayor daño de almidón. Dado que el mijo y el sorgo presentan contenidos de almidón similares al maíz (Tabla 1), no se encontraron diferencias significativas en el ISA por el reemplazo de harina de maíz por los mencionados cereales.

Al analizar la dureza se observó que los menores valores (3303 g) correspondieron a los sistemas M-M, seguido por M-S y M-A (Tabla 2). Esto puede explicarse por el debilitamiento de la estructura porosa generada en los sistemas expandidos producida al incorporar ingredientes con elevados niveles de fibra (Oliveira y col., 2018, Kasprzak y col., 2013). Por el contrario, M-Q y M presentaron los resultados más altos de dureza, en coincidencia con sus menores niveles de fibra respecto al resto de las formulaciones (Tabla 1). También se ha demostrado que el reemplazo de cereales por harinas de legumbres (Philipp y col., 2017) u otros ingredientes ricos en proteínas genera estructuras más duras, con mayores valores de fuerza de ruptura en los *tests* de corte (Cueto y col., 2015). Esto fue particularmente confirmado para los sistemas con harina de quínoa; sin embargo, la formulación M-A, con elevado contenido proteíco, presentó bajos valores de dureza respecto al resto de las muestras, aunque esto puede deberse a un efecto predominante del contenido de fibra por sobre el de proteínas.

4.1.3 Evaluación de color

En la Figura 13 se muestran los valores de L^* , a^* y b^* para los diferentes sistemas extrudidos. La coordenada cromática predominante en todos los casos fue b^* , asociada al color

amarillo, con valores cercanos al 40 en todos los casos, que se pueden atribuir a la presencia dominante del maíz en todas las muestras. Por lo tanto, el reemplazo de harina de maíz por las demás harinas evaluadas produce una disminución en los valores de b^* , salvo en el sistema M-Q, dado que la quínoa también aporta coloraciones amarillentas, que hacen que el producto resultante presente valores de b^* aún mayores que el control. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre las distintas formulaciones, que se manifestaron por aumentos leves pero significativos de a^* , asociados al rojo, y disminución de luminosidad (L^*), indicando mayor oscurecimiento. El reemplazo de 25 % de harina de maíz por las otras harinas estudiadas produjo disminución de luminosidad en el siguiente orden: M > M-M > M-S > M-Q > M-A, siendo la última la muestra más oscura. Los valores de a^* en todos los productos fueron mayores que para el control, lo que indica que la adición de las harinas en estudio (particularmente sorgo) genera sistemas con mayor componente rojo.

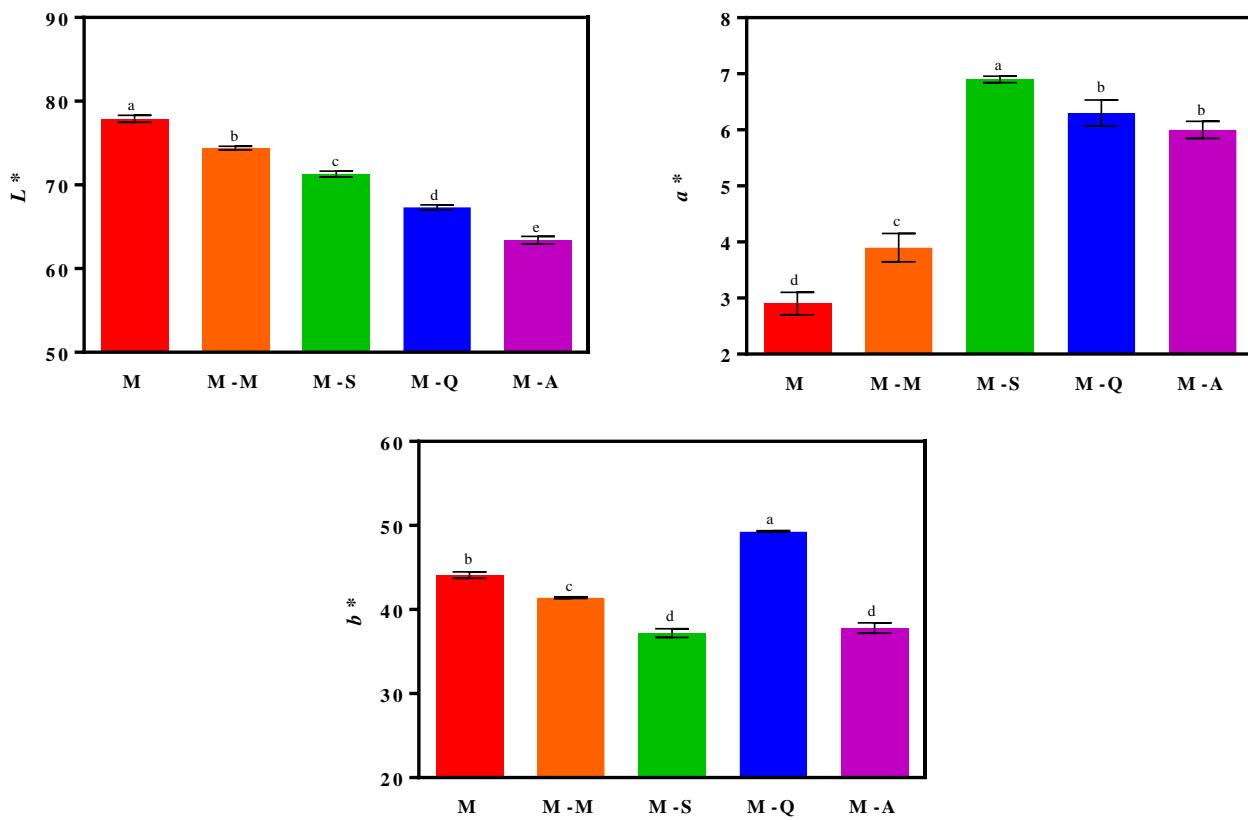


Figura 13: Valores de L^* , a^* y b^* de parámetros de color CIELAB para los sistemas extrudidos. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar. Los valores seguidos por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas (valor- $p \leq 0,05$) entre los sistemas. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

Todas las modificaciones de color observadas (menores valores de L^* y b^* y mayores valores de a^*) están asociadas a los colores naturales de los ingredientes, pero también responden a la formación de productos pardos típicos de la reacción de Maillard (Coulter y Lorenz, 1998; Singha y col., 2018; Aćkar y col., 2018), la cual se encuentra favorecida en los sistemas con mayores contenidos proteicos, M-Q y M-A (Tabla 1). Los procesos que se basan en la aplicación de importantes cantidades de energía mecánica, tales como la extrusión, generan, sin embargo, productos de Maillard en baja concentración en comparación con otros

donde se involucran mayores combinaciones de tiempos-temperaturas de elaboración, con etapas como cocción/tostado (Cueto, 2016).

4.1.4 Parámetros de forma y tamaño medidos por análisis de imágenes

En la Tabla 3 se resumen los resultados del área, perímetro, circularidad y diámetro de Feret que se obtuvieron a través de análisis de imágenes para los distintos sistemas extrudidos.

Tabla 3: Parámetros macroscópicos de sistemas extrudidos obtenidos por análisis de imágenes*

Sistema	Área	Perímetro	Circularidad	Diámetro de Feret
M	76 ± 9^c	39 ± 5^a	$0,6 \pm 0,1^a$	$10,7 \pm 0,8^a$
M-M	69 ± 5^b	38 ± 4^a	$0,6 \pm 0,1^a$	$10,4 \pm 0,7^a$
M-S	$68,2 \pm 5,5^{a,b}$	$43,7 \pm 6,5^b$	$0,5 \pm 0,1^a$	$10,35 \pm 0,55^a$
M-Q	65 ± 11^a	44 ± 10^b	$0,48 \pm 0,15^a$	$10,2 \pm 0,9^a$
M-A	74 ± 8^c	49 ± 8^c	$0,4 \pm 0,1^a$	$11,0 \pm 0,8^a$

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar. Los valores seguidos por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas entre los sistemas (valor- $p \leq 0,05$).

Considerando la definición de diámetro de Feret (Sección 3.1.6) se observa que aquellos sistemas con mayores áreas (M y M-A) también presentan los valores más altos de diámetro de Feret y que, de la misma manera, las muestras con menores áreas (M-Q y M-S) también presentan los menores diámetros de Feret. En particular, los extrudidos contenido alpiste (M-

A) también presentan los valores más altos de perímetro, aunque esto no ocurre para el sistema control, quien presenta los resultados más bajos. Por lo tanto, si bien existe una relación directa entre el área y diámetro de Feret, lo mismo no ocurre para el caso del perímetro.

Las variaciones entre los parámetros de forma de las diferentes muestras, tales como el perímetro o la circularidad, pueden atribuirse a los efectos de proteínas y/o fibra dietaria, que afectan estas propiedades visuales de los productos. Por ejemplo, tanto M-Q como M-A presentan los menores valores de circularidad, lo cual coincide con sus mayores contenidos proteicos o de fibra dietaria (Tabla 1). De la misma manera, M-A, M-Q y M-M presentan los mayores perímetros, en línea con sus mejores perfiles proteicos y/o contenidos de fibra dietaria. De esta manera, y con relación a lo discutido en la Sección 4.1.2, la composición de los sistemas define no sólo aspectos nutricionales, sino que también influyen sobre las propiedades físicas y visuales de los productos obtenidos.

4.1.5 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X de los cinco sistemas extrudidos, previamente molidos, se presentan en la Figura 14. Todas las formulaciones presentaron estructura del tipo V_h , asociada a los picos típicos a $2\Theta = 7,8^\circ$, $13,2^\circ$ y 20° , en concordancia con otros autores (Cueto y col., 2018; Zhang y col., 2016; Ramos Díaz y col., 2013), siendo el pico principal en todos los casos el que se encuentra a $2\Theta = 20^\circ$. Esta estructura cristalina se genera comúnmente como resultado de una asociación entre las hélices de amilosa y las moléculas de lípidos durante el proceso de extrusión (Cueto y col., 2018; Zhang y col., 2016). Realizando una comparación entre los sistemas, se puede observar que los productos M-A presentaron las mayores intensidades de picos, seguido por M-M y M, con pequeñas diferencias entre ellos, luego M-S

y, finalmente, M-Q presentó los picos más bajos. Se encontraron algunos desplazamientos de 2Θ de $\pm 0,3^\circ$ en las diferentes muestras, pero este hecho no afectó la comparación directa entre ellas. Estos resultados muestran que cuando se agregan harina de alpiste y mijo se forman y preservan mayores estructuras cristalinas asociadas a los complejos amilosa-lípidos, en comparación con el control. Por otro lado, tanto la adición de harina de quínoa como de sorgo generó estructuras más amorfas. Es importante destacar que las muestras M-A y M-M fueron las que presentaron mayores niveles de fibra dietaria (Tabla 1, Sección 4.1.1). Otros autores (Kumar y col., 2018; Guimarães y col., 2010) también reportaron mayor cristalinidad con la adición de ingredientes con elevados niveles de fibra dietaria.

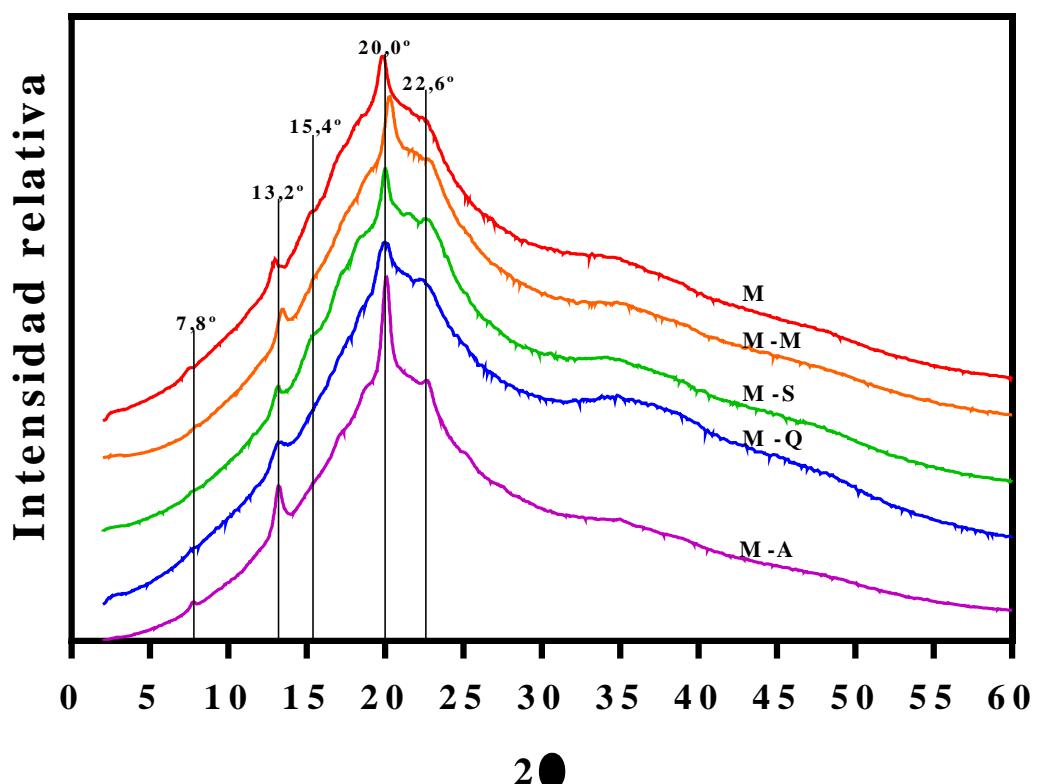


Figura 14: Patrones de difracción de rayos X de los sistemas extrudidos. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

Los picos a $2\Theta = 15,4^\circ$ y $22,6^\circ$ están asociados a estructuras cristalinas del tipo A provenientes del almidón nativo (Cueto y col. 2018; Zhang y col., 2016). Comparando las formulaciones entre sí, se puede notar que sólo M-S y M presentaron picos a $2\Theta = 15,4^\circ$, siendo de mayor intensidad en el primer caso. Respecto al pico a $2\Theta = 22,6^\circ$, las formulaciones se pueden ordenar de la siguiente manera: M-S > M-Q > M-A > M-M, mientras que el control no presentó señales. Estos resultados indican que la adición de harina de sorgo tuvo mayor impacto en el mantenimiento de la estructura cristalina. De hecho, Jafari y col. (2017) también reportaron estructuras cristalinas del tipo A para extrudidos de harina de sorgo. Sin embargo, durante la extrusión y debido a las fuerzas de cizallamiento y las elevadas presiones y temperaturas a las que se someten los sistemas, las estructuras tipo A, asociadas a las porciones cristalinas del almidón nativo, se convierten al tipo V_h (Jafari y col., 2017), indicando la gelatinización del almidón, con la consecuente pérdida de sus estructuras cristalinas. Esta puede ser la principal razón de las menores intensidades o incluso desapariciones de estos picos en comparación con los previamente descritos. Esto, junto con la formación de complejos amilosa-lípidos responsables de las estructuras cristalinas del tipo V_h en todos los productos, demuestra que durante el proceso de extrusión se produce la cocción completa de los sistemas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cueto y col. (2018), quienes demostraron la desaparición de picos asociados a las estructuras cristalinas del almidón nativo y formación de nuevos picos luego de la extrusión en harina de maíz y formulaciones conteniendo harina de quínoa y chía.

4.1.6 Modelado de las isotermas de adsorción de agua

En la Tabla 4 se presentan los parámetros obtenidos cuando dos modelos matemáticos de sorción de agua (GDW y GAB) se ajustaron a los datos experimentales para las diferentes formulaciones de los sistemas extrudidos.

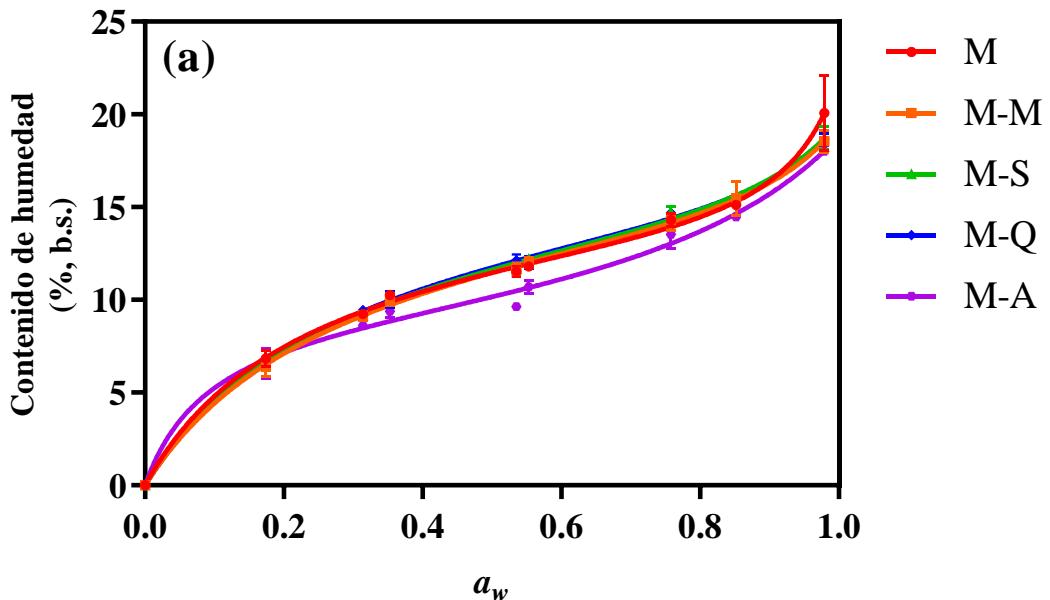
Tabla 4: Parámetros de los modelos de D'Arcy & Watt (GDW) y Guggenheim, Anderson y de Boer (GAB) para las isotermas de adsorción de agua de los diferentes sistemas extrudidos a 25 °C.

Modelo	Constantes	M	M-M	M-S	M-Q	M-A
GDW	m	16,08	17,23	17,01	17,85	9,91
	K	4,22	3,42	3,61	3,36	10,56
	k	0,92	0,86	0,85	0,87	0,74
	w	0,06	0,07	0,08	0,06	0,37
	R^2	0,986	0,994	0,996	0,997	0,989
	%DPRM	1,649	0,952	1,952	2,204	7,784
	%RECM	1,973	1,418	2,24	2,601	8,302
GAB	m_o	8,25	9,87	9,96	10,3	7,35
	C	35,23	17,85	18,71	17,93	46,02
	k	0,59	0,5	0,5	0,48	0,61
	R^2	0,976	0,99	0,993	0,995	0,987
	%DPRM	4,183	2,78	2,976	3,343	8,434
	%RECM	5,134	3,441	4,055	4,166	9,086

M = control; $M-M$ = maíz + mijo; $M-S$ = maíz + sorgo; $M-Q$ = maíz + quínoa; $M-A$ = maíz + alpiste. m y m_o son los contenidos de agua límite de hidratación (% b.s.); K , k , w , C y K son constantes de los modelos; R^2 es el coeficiente de determinación; %DPRM es la desviación porcentual relativa media y %RECM es el porcentaje de la raíz del error cuadrático medio.

Ambos modelos presentaron valores de R^2 mayores que 0,97 y %DPRM menores que 10 % para todos los sistemas, lo que indica un buen ajuste de los datos experimentales (Wani y Kumar, 2016). Los valores de k y C del modelo de GAB se presentaron dentro de los rangos normalmente encontrados para una buena descripción de la isoterma ($0,24 < k \leq 1$ y $5,67 \leq C \leq \infty$, respectivamente) (Lewicki, 1997). Los contenidos de agua límite de hidratación (m_o) se encontraron en el rango de 7,35 a 10,3 g H₂O/g muestra (b.s.). Este parámetro está relacionado con la estabilidad de los alimentos y el control de calidad (Furmaniak y col., 2009), ya que por debajo de este valor las reacciones de deterioro son mínimas, excepto la oxidación de lípidos. Bajos contenidos de agua en materiales con estructuras porosas potencian la difusión de oxígeno y promueven la oxidación de lípidos durante el almacenamiento. En estos casos se deben emplear envases protectores contra el aire y la luz o atmósferas modificadas para minimizar dichos procesos de deterioro. Los valores de humedad a la salida del extrusor (Tabla 1) se encontraron cercanos a los valores de m_o de GAB indicando que los parámetros de extrusión han sido adecuados para lograr productos con baja humedad. Paralelamente, los valores de k fueron menores que 1 y los de C mayores que 2 en todos los casos, lo cual es típico para isothermas de tipo II (forma sigmoidea, Figura 15), e indica la existencia de multicapas de moléculas de agua adsorbidas a los componentes de la matriz en la superficie interna de los productos (Furmaniak y col., 2009).

GDW



GAB

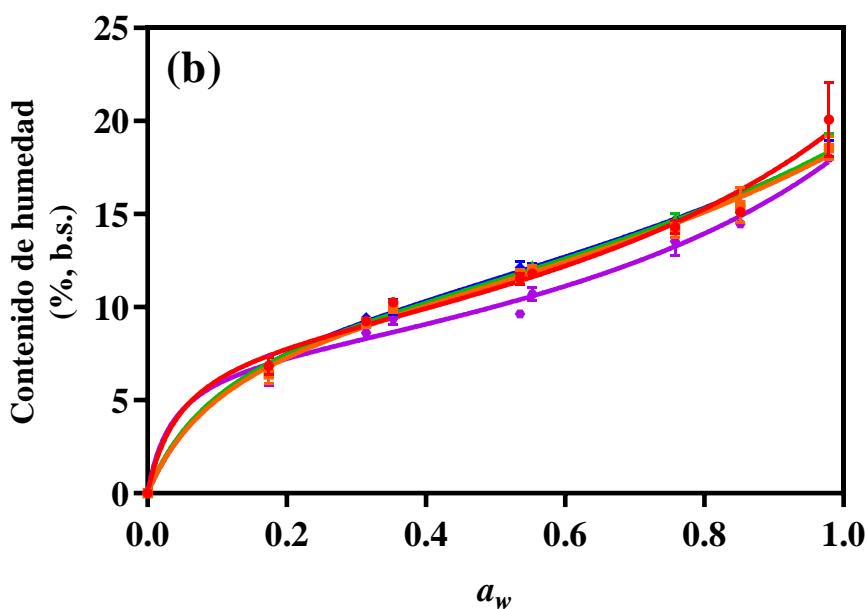


Figura 15: Isotermas de adsorción de agua a 25 °C y ajuste de valores experimentales de los modelos (a) GDW y (b) GAB de los diferentes sistemas extrudidos. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

Por su parte, el modelo GDW proveyó los mejores valores de ajuste, ya que mostró menores %RECM comparado con el modelo GAB (Wani y Kumar, 2016). Además, cuando al aplicar el modelo GDW se obtiene un valor de $w < 1$, esto indica que sólo una proporción de moléculas de agua adsorbidas a los centros primarios pueden actuar como centros secundarios y unir otras moléculas de agua. Por otro lado, si cada molécula de agua unida a un centro primario se convierte en un centro secundario de adsorción, $w = 1$ y el modelo GDW se reduce al modelo GAB. Finalmente, un centro primario puede adsorber más de una molécula de agua, y en esos casos $w > 1$ (Furmaniak y col., 2009). En este sentido, los valores de w están relacionados con propiedades microestructurales de la matriz. Todas las muestras presentaron valores de w menores que 1 (Tabla 4), indicando una microestructura muy densa o tortuosa, en donde la unión de moléculas de agua adicionales a los centros primarios de adsorción se encuentra altamente impedida. La elevada presión dentro del extrusor favoreció la formación de arreglos densos en los productos, limitando la adsorción de moléculas de agua sólo a centros específicos más activos y, por lo tanto, reduciendo el número de centros primarios que puedan actuar como centros secundarios de adsorción. Particularmente, el valor de w del sistema M-A fue mayor que para el resto de las formulaciones, indicando una estructura más porosa o abierta, afectando las propiedades de sorción.

Todas las muestras presentaron valores de agua límite de hidratación similares para cada modelo matemático, pero el sistema M-A mostró los menores resultados. Esto también se manifestó en la Figura 15, particularmente en el rango de actividades de agua de 0,2-0,7. A menores valores de a_w , la isoterma del sistema M-A se encuentra por encima del resto, lo cual es más notorio para el modelo GDW, indicando un mayor grado de interacción con el agua cuando la muestra presenta muy bajos contenidos acuosos. Por el contrario, la tendencia se invierte a valores más altos de contenido acuoso, donde los productos M-A requirieron menores

cantidades de agua adsorbida para alcanzar el mismo valor de a_w en comparación con el resto de las muestras, y esto explica los menores valores de agua límite de hidratación. Esto, al igual que las diferencias en los valores de w , puede relacionarse a los mayores niveles de proteínas, lípidos y fibra dietaria de la harina de alpiste (Tabla 1), que modifican la conformación microestructural y la disposición de grupos hidrofílicos (Abdel-Aal y col., 2011a). La presencia de altos niveles de fibra en estos sistemas o una posible exposición de las moléculas de lípidos a nivel superficial también pudo haber facilitado la formación de sitios secundarios de adsorción de agua, que justifique los mayores valores de w y la menor higroscopidad. Por el contrario, los productos M-Q presentaron los mayores niveles de agua límite de hidratación en ambos modelos (Tabla 4), y esto concuerda con los mayores valores de humedad e IAA (Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente) y la disposición de la isoterma correspondiente por encima del resto, lo que demuestra que los sistemas M-Q son los más higroscópicos. Finalmente, y de acuerdo con lo reportado para otros sistemas que contienen azúcares (Furmaniak y col., 2009), en los productos amiláceos estudiados los valores de m del modelo GDW fueron mayores que los de m_o de GAB, en todos los casos.

Por otro lado, los valores de actividad de agua (a_w) de los diferentes sistemas luego de la extrusión se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5: Valores de actividad de agua (a_w) para las diferentes formulaciones de sistemas luego de la extrusión*

Sistema	Actividad de agua (a_w)
M	$0,333 \pm 0,002$ (27,5 °C)
M-M	$0,368 \pm 0,001$ (28,5 °C)
M-S	$0,360 \pm 0,001$ (29,1 °C)

M-Q $0,323 \pm 0,003$ (29,6 °C)

M-A $0,324 \pm 0,002$ (29,8 °C)

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar.

De la interpolación de estos resultados en las isotermas presentadas en la Figura 15, se observa que los contenidos de agua correspondientes a cada sistema extrudido se encuentran en rango con los valores reportados en la Tabla 1, con una diferencia menor que el 1 %. De la comparación entre los valores predichos por ambos modelos, el de D'arcy y Watt (GDW) se acerca más a los determinados analíticamente, reforzando aún más la idea de que este modelo resulta más útil en comparación al modelo de GAB para la descripción y ajuste de los datos experimentales.

4.1.7 Propiedades térmicas

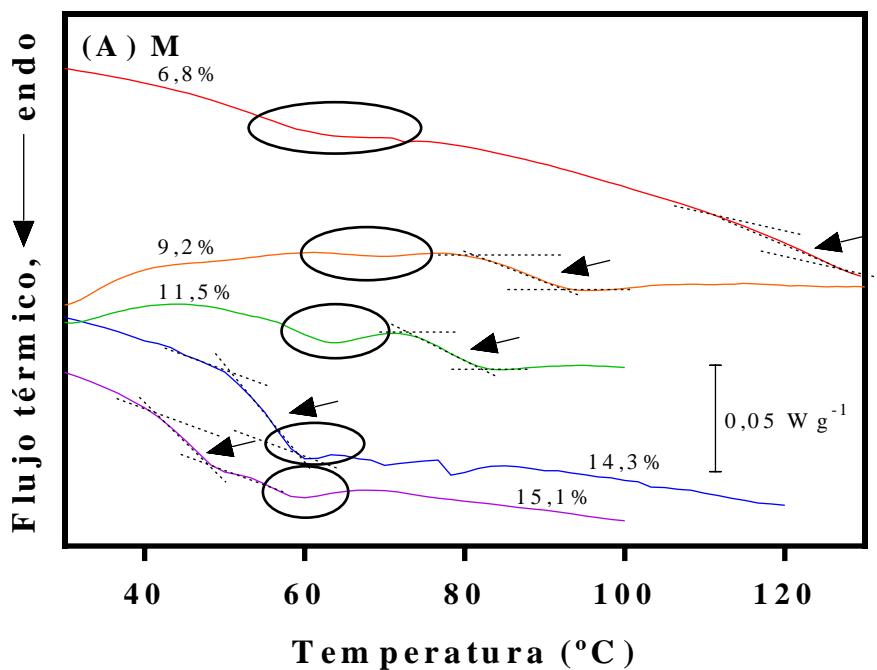
En la Figura 16 se encuentran los termogramas de los sistemas extrudidos equilibrados a diferentes valores de humedad (% b.s.). Además, en la Tabla 6 se resumen los parámetros asociados a las diferentes transiciones térmicas de cada sistema.

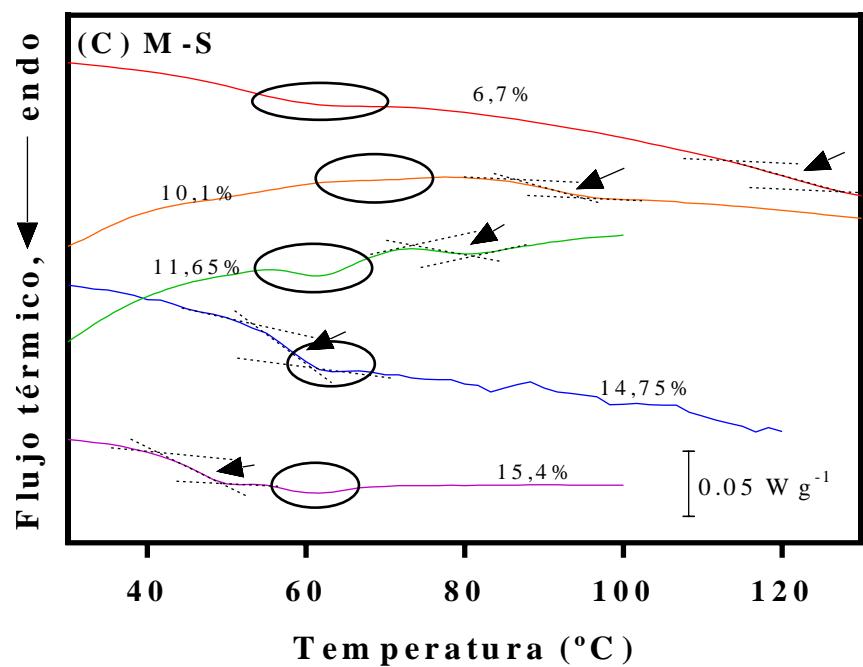
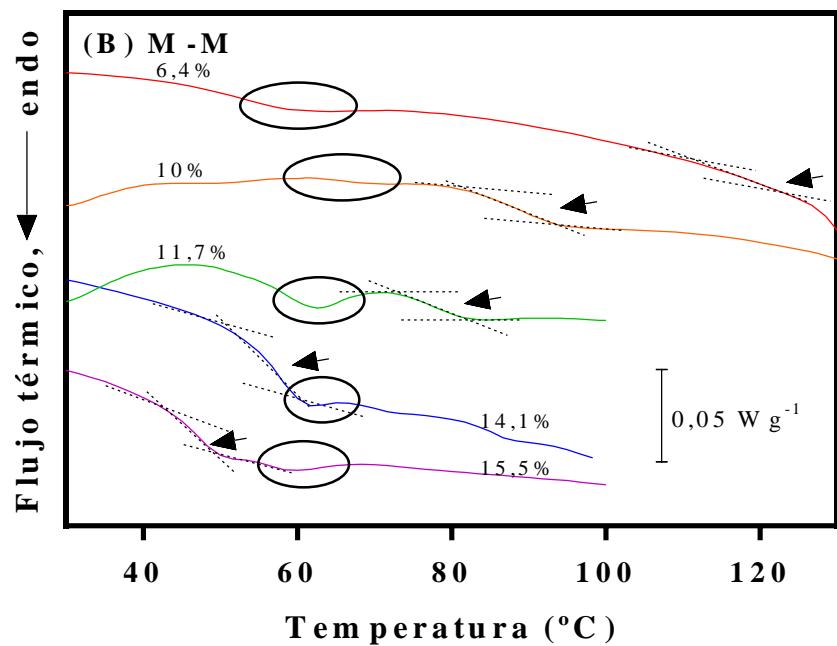
En la Figura 16 se destacan las transiciones vítreas a cada porcentaje de humedad, enmarcadas con líneas punteadas y señaladas por una flecha. En todos los casos se encuentra que la transición del estado vítreo a líquido sobre enfriado ocurre a menores temperaturas a medida que aumenta el contenido acuoso del sistema. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Porras-Saavedra y col., 2019; Masavang y col., 2019; Nithya y col., 2014; Farroni y Buera, 2014; Roos, 2010). Esto se debe al efecto del agua, que promueve la movilidad

molecular de los componentes amorfos y aumenta el volumen libre. Considerando que los diferentes sistemas estudiados alcanzaron porcentajes de humedad de equilibrio similares, es posible realizar comparaciones entre ellos para analizar su estabilidad física con relación al agua. Del análisis de la Tabla 6 se observa que, en general, todos los sistemas presentan T_{gi} similares a contenidos acuosos cercanos. Esto indica que los productos presentan asociaciones similares con el agua, independientemente de la formulación. Sin embargo, dentro de los productos con mayor humedad, los sistemas con alpiste (M-A) presentan la menor estabilidad o, dicho de otra manera, los valores de T_{gi} más bajos y, por lo tanto, menor estabilidad física. Desde otra perspectiva, los sistemas con alpiste alcanzan valores de T_{gi} similares a otras formulaciones, pero a menores contenidos de agua. Esto también se desprende de la isoterma de adsorción de agua y de los valores de agua límite de hidratación más bajos discutidos en la Sección 4.1.6. Estos resultados se observan también con el análisis de la curva correspondiente en la Figura 17, con el ajuste de la ecuación de Gordon y Taylor y los parámetros asociados en la Tabla 7. En ambos casos se confirma, en principio, que no existen diferencias significativas en cuanto a los parámetros térmicos entre las formulaciones. Sin embargo, existe una tendencia de menores valores de temperatura de inicio de la transición vítreo de los productos con alpiste (M-A) en comparación al resto de las formulaciones cuando el contenido acuoso es intermedio o alto, pero que la tendencia se revierte a menores humedades. Esto coincide con lo discutido en el comportamiento del sistema M-A durante la adsorción de agua (Sección 4.1.6). Particularmente, en la Tabla 7, y aunque sin diferencias significativas, los mayores valores de k de M-Q y M-A respaldan la observación de la mayor susceptibilidad de estos sistemas al efecto del agua de reducir el valor de la T_g , indicando menores estabilidad física a niveles crecientes de contenido de agua. Esto puede atribuirse a los mayores niveles de componentes hidrofílicos tales como proteínas y/o fibra de estos productos (Sección 4.1.1, Tabla 1), su asociación con el almidón y/o los lípidos, además de aspectos microestructurales como la

porosidad, que pueden influir en el grado de asociación con el agua (Farroni, 2011). Por su parte, en los productos con mijo y sorgo (M-M y M-S), si bien presentan menores valores de T_{gl} (Tabla 7), el efecto del agua sobre su estabilidad es menor, ya que tienen menores valores de k , T_{gi} más altos a contenidos acuosos similares al resto (Tabla 6) y las curvas de ajuste de Gordon y Taylor se ubican por encima de las demás en prácticamente todo el rango de sólidos totales (Figura 17).

Del análisis de la Figura 17 también se puede conocer mediante interpolación el contenido de agua necesario en cada formulación para que ocurra la transición vítreo a 25 °C, en asociación a su estabilidad. Así, los sistemas se pueden ordenar de manera creciente según la humedad (%, b.s.) necesaria para que ocurra la transición vítreo a 25 °C de la siguiente manera: M-A (17,44%) < M-Q (18,08%) < M (18,44%) < M-M (19,18%) < M-S (19,66%). Nuevamente se demuestra la tendencia a menor estabilidad fisicoquímica de la formulación con alpiste y la mayor de aquellas conteniendo sorgo, en relación con su asociación con el agua y la transición vítreo.





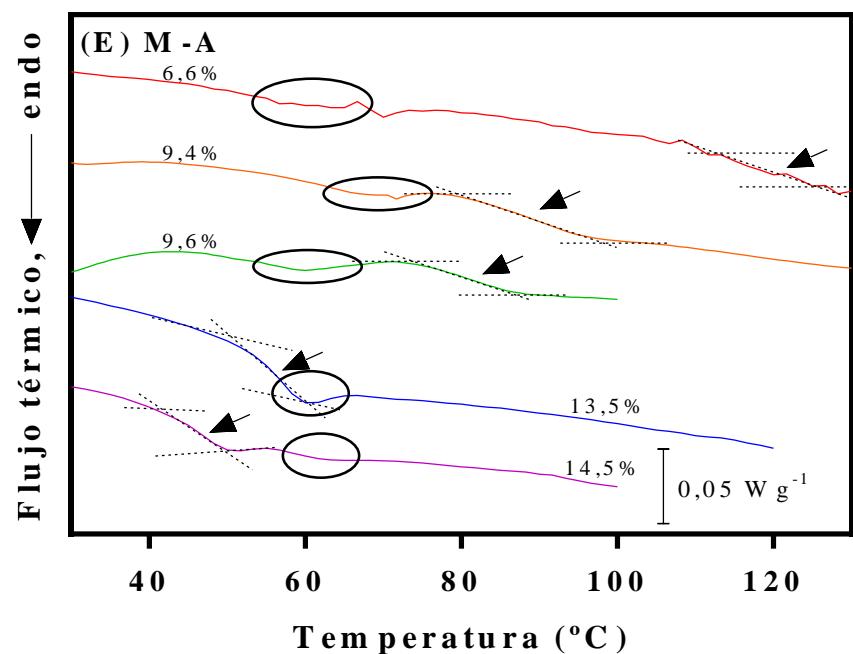
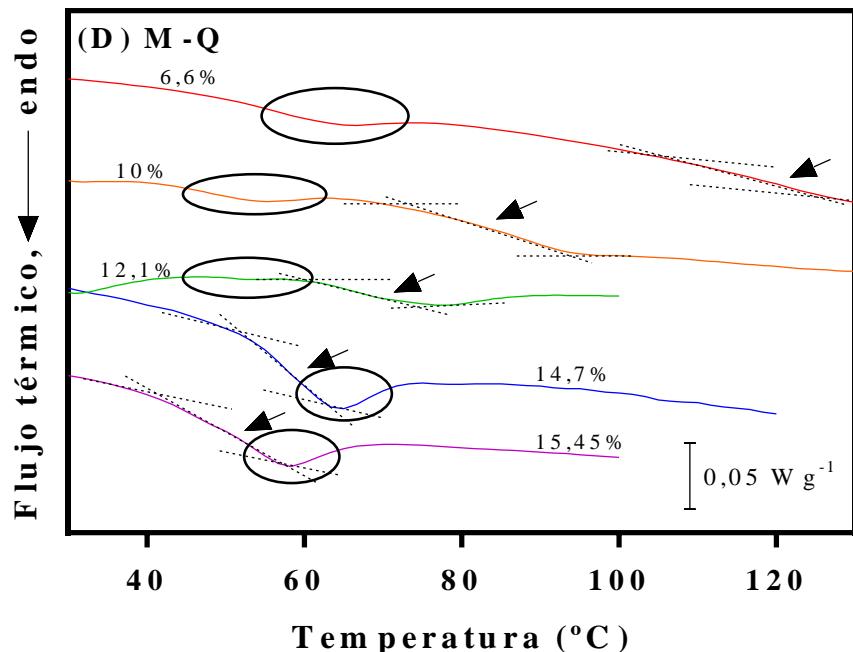


Figura 16: Termogramas de sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (%), b.s.). (A) M; (B) M-M; (C) M-S; (D) M-Q; (E) M-A. Las líneas punteadas enmarcan la transición vítreo (T_g), señalada por las flechas, mientras que los círculos denotan las relajaciones entálpicas. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

Tabla 6: Temperatura de inicio de transición vítrea (T_{gi}), capacidades caloríficas específicas (ΔC_p) y relajaciones entálpicas (ΔH_{RE}) de sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (C.A., %, b.s.), determinados por DSC*

Muestra	C.A. (%), b.s.)	T_{gi} , °C	ΔC_p , J·g ⁻¹ K ⁻¹	ΔH_{RE} , J·g ⁻¹
M	6,8 ± 0,2	112,6 ± 0,5	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,03
	9,2 ± 0,1	81,6 ± 0,2	0,11 ± 0,05	0,08 ± 0,01
	11,5 ± 0,3	74 ± 1	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,01
	14,3 ± 0,6	50,2 ± 0,4	0,21 ± 0,03	N/C
	15,1 ± 0,1	38,2 ± 0,7	0,23 ± 0,01	0,38 ± 0,02
M-M	6,4 ± 0,3	111,0 ± 0,4	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,03
	10,0 ± 0,6	81,7 ± 1,5	0,14 ± 0,04	0,05 ± 0,02
	11,7 ± 0,5	73,3 ± 0,9	0,09 ± 0,04	0,80 ± 0,03
	14,1 ± 0,3	53,2 ± 0,7	0,19 ± 0,03	N/C
	15,5 ± 0,7	38,2 ± 1,2	0,29 ± 0,03	0,22 ± 0,11
M-S	6,7 ± 0,8	113,1 ± 0,9	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	10,1 ± 0,4	84 ± 2	0,09 ± 0,03	0,02 ± 0,01
	11,6 ± 0,3	74 ± 2	0,03 ± 0,04	0,56 ± 0,02
	14,7 ± 0,3	54 ± 1	0,15 ± 0,02	N/C
	15,4 ± 0,3	40 ± 2	0,17 ± 0,08	0,33 ± 0,02
M-Q	6,6 ± 0,3	115 ± 2	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,06
	10,0 ± 0,1	75 ± 1	0,22 ± 0,07	0,36 ± 0,03
	12,1 ± 0,4	61 ± 1	0,12 ± 0,09	0,02 ± 0,01
	14,7 ± 0,4	50 ± 2	0,24 ± 0,01	N/C
	15,4 ± 0,1	36 ± 2	0,28 ± 0,05	N/C
M-A	6,6 ± 0,7	109,3 ± 0,8	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,04
	9,4 ± 0,6	80 ± 2	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,02
	9,6 ± 0,4	75 ± 2	0,13 ± 0,08	0,37 ± 0,03
	13,5 ± 0,1	52 ± 1	0,19 ± 0,03	N/C
	14,5 ± 0,3	39 ± 1	0,22 ± 0,09	0,19 ± 0,01

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

* Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. N/C = no calculado.

Por otro lado, de la Figura 16 y de la Tabla 6 también se observa, en rasgos generales y en todos los casos, que los cambios de las capacidades caloríficas específicas asociadas a las transiciones vítreas (ΔC_p) aumentan también con el contenido de agua. Es decir, las transiciones vítreas se hacen más evidentes con el aumento gradual del contenido acuoso. Los ΔC_p hallados se encuentran en el mismo rango que otros reportados en productos a base de maíz, donde los valores también aumentaron con el contenido acuoso de las muestras (Farroni, 2011). Esto, nuevamente, se relaciona a una mayor movilidad molecular de los sólidos amorfos con el aumento de la cantidad de agua, que facilita el cambio de estado de la matriz, evidenciando más fácilmente la transición en los termogramas.

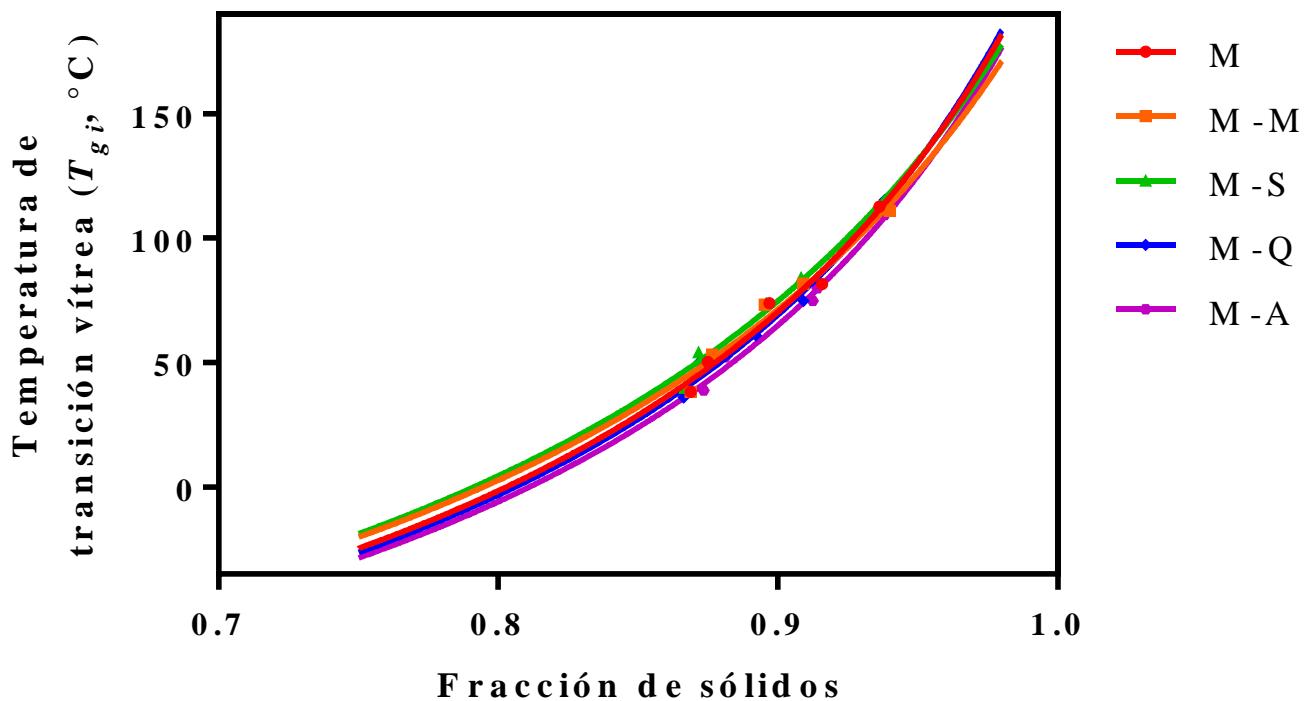


Figura 17: Modelado de las temperaturas de transición vítreo (T_g) mediante la ecuación de Gordon y Taylor en sistemas extrudidos. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

Tabla 7: Parámetros de ajuste de la ecuación de Gordon y Taylor en sistemas extrudidos.-

Muestra	T_{gI}	k	R^2
M	226 ± 26	$6,8 \pm 1,2$	0,9709
M-M	208 ± 23	6 ± 1	0,9667
M-S	217 ± 20	$6,1 \pm 0,9$	0,9771
M-Q	229 ± 21	$7,1 \pm 0,9$	0,9812
M-A	222 ± 16	7 ± 1	0,988

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

Otra de las transiciones térmicas importantes que sufren los sistemas extrudidos se encuentra en el rango de 55 °C – 65 °C, independientemente del contenido acuoso (Figura 16), la cual se observa como una endoterma que desaparece en un segundo barrido realizado inmediatamente posterior al primero (datos no mostrados). Si bien esta endoterma no se encuentra completamente descrita, en la bibliografía se asocia a interacciones polímero-agua (Appelqvist y col., 1993), a eventos de relajaciones entálpicas o envejecimiento físico relacionados con relajaciones estructurales y la movilidad residual de grupos de átomos de los materiales amorfos (Masavang y col., 2019; Fan y Roos, 2017). La teoría mayormente aceptada establece que estas transiciones son dependientes del tiempo y reflejan relajaciones espontáneas de los sistemas vítreos hacia el equilibrio que ocurren durante el almacenamiento a temperaturas inferiores a la T_g en condiciones de movilidad reducida (Fan y Roos, 2017). En estas condiciones, las moléculas de agua y los grupos hidrofílicos de los polisacáridos establecen interacciones energéticas, con consecuente reducción del volumen libre, en la cual una cierta cantidad de energía se pierde o se relaja. Durante el calentamiento de la muestra mediante DSC, el sistema absorbe energía, lo que se manifiesta en forma de una transición

endotérmica que causa la disruptión de estas interacciones (Masavang y col., 2019). En relación con esto, Liu, Bhandari y Zhou (2006) establecen que estas relajaciones se deben a movimientos de una pequeña porción de una molécula, tales como ramificaciones o grupos laterales de polisacáridos, para establecer interacciones puente de hidrógeno en regiones donde la densidad y las fuerzas intermoleculares se encuentran minimizadas.

Las entalpías asociadas a estos eventos endotérmicos aumentan con el contenido de agua (Tabla 6) debido a la mayor movilidad molecular del sistema, lo cual permite una mejor visualización o identificación del fenómeno. Además, se ha reportado un incremento de esta entalpía con el tiempo y la temperatura de almacenamiento (Masavang y col., 2019; Farroni, 2011; Gonzalez y col., 2010), debido a mayor agua absorbida, lo cual apoya la teoría de que la endoterma se asocia a interacciones entre carbohidratos y el agua. A determinados valores de humedad (13-15 %, (b.s.)) según cada formulación (Tabla 6), esta endoterma se superpone con la transición vítreo, lo cual dificulta la diferenciación entre ambas transiciones térmicas, así como la cuantificación de los parámetros asociados. Es interesante destacar que en los sistemas con humedades tales que la transición vítreo ocurre a temperaturas próximas a la relajación entálpica, se verifica una disminución de la capacidad calorífica (ΔC_p) disminuye. Esto puede deberse a fenómenos físicos asociados al cambio estructural y las interacciones agua-sólidos que dificultan la transición. Esta endoterma desaparece a valores de humedad mayores (≈ 20 - 25 %, en b.s.), en coincidencia con los contenidos de agua a los que se verifica la fusión del agua congelada, comúnmente denominada “agua libre”, y también aparece el fenómeno de la gelatinización del almidón, que ocurre en un rango de temperaturas cercano al de la mencionada endoterma (Farroni y Buera, 2014).

Finalmente, al exponer las distintas formulaciones en exceso de agua (relación 3:1), se confirmó que el almidón se encuentra totalmente gelatinizado a la salida del extrusor (Figura 18), lo que indica una cocción completa de los productos. Estos resultados están en

concordancia con los difractogramas descritos en la Sección 4.1.5, donde se determinó la disminución de la cristalinidad de los productos extrudidos por la gelatinización del almidón. Simultáneamente, en esas condiciones se observó la desaparición de las transiciones endotérmicas en el rango de 55 – 65 °C, previamente descritas.

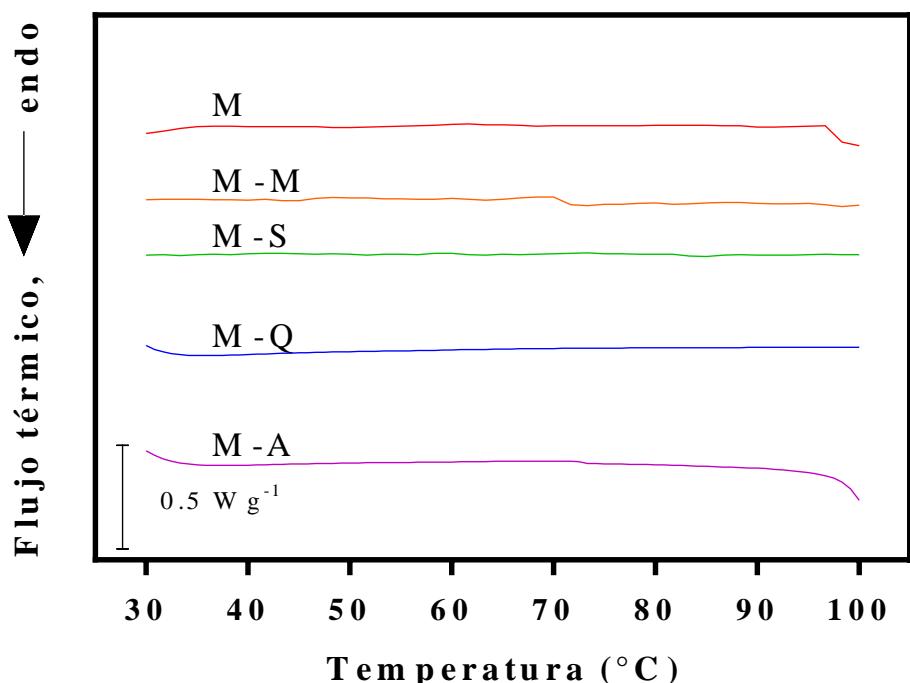


Figura 18: Termogramas de sistemas extrudidos en exceso de agua (relación 3:1). M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

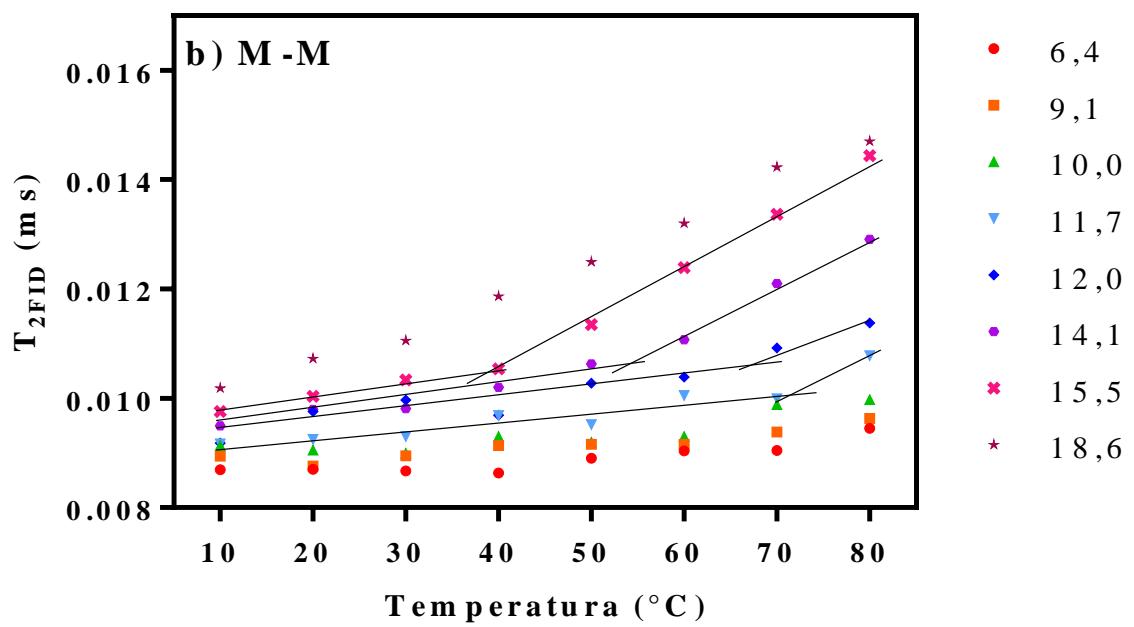
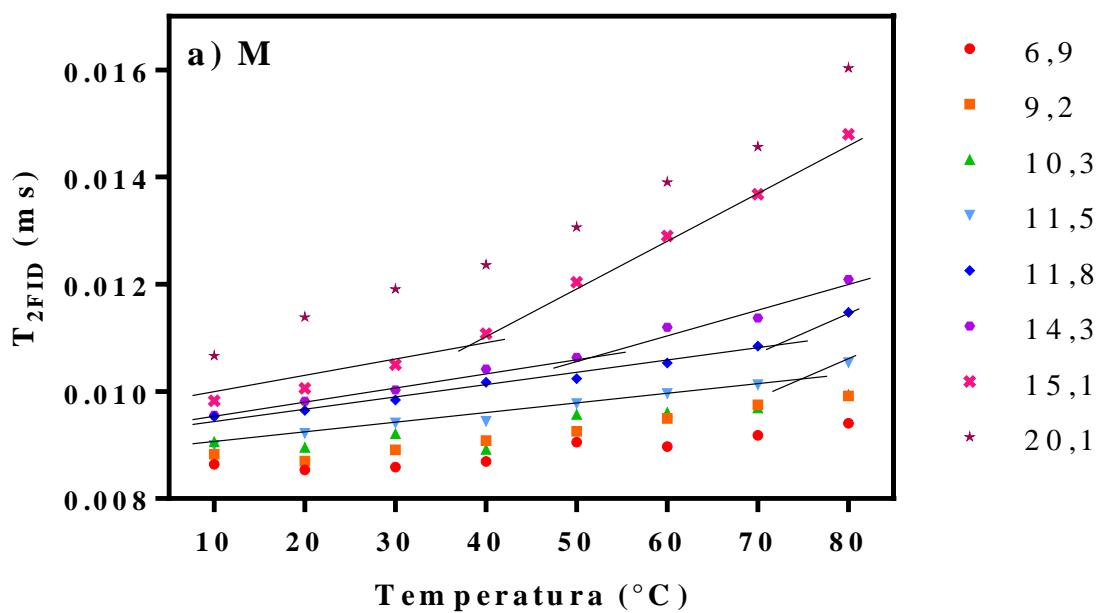
4.1.8 Movilidad molecular por resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$)

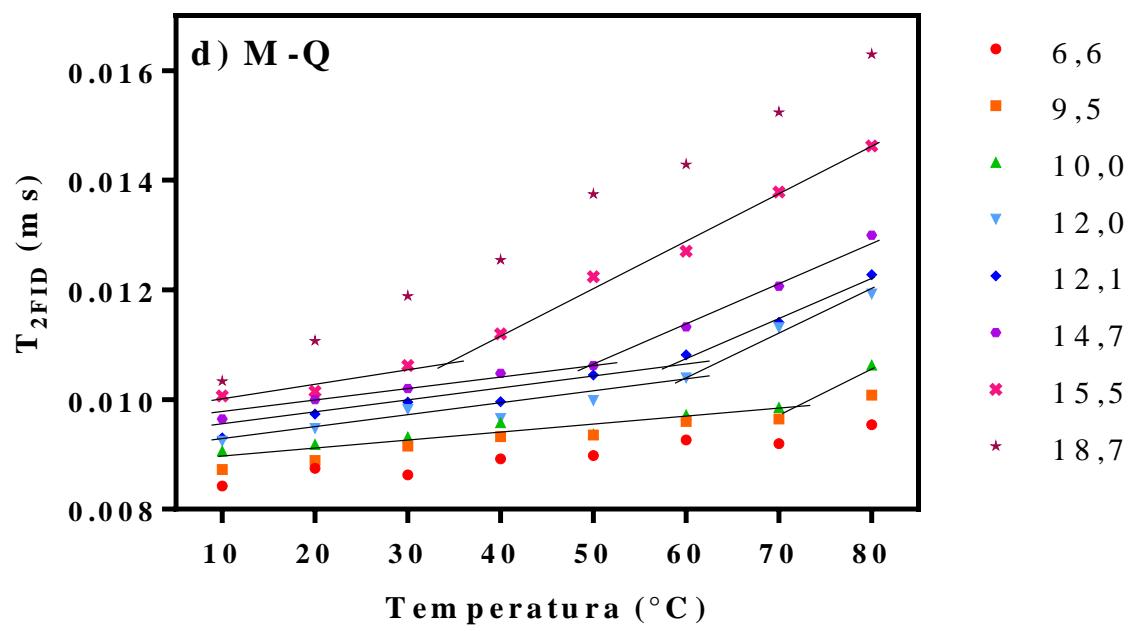
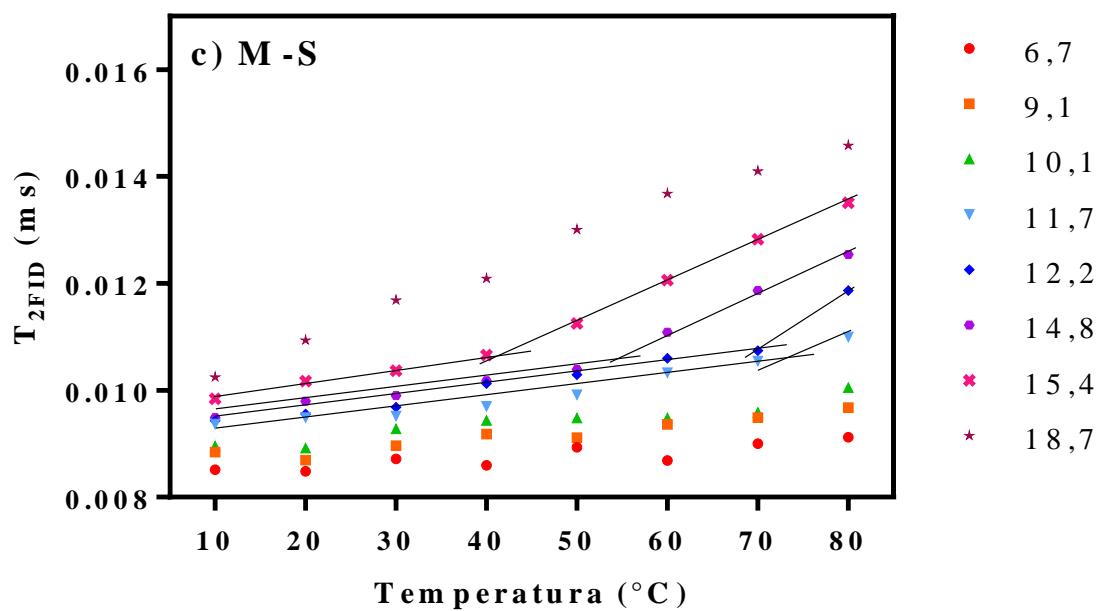
La movilidad molecular evaluada a través de los tiempos de relajación espín-espín (T_2) mediante $^1\text{H-RMN}$ complementa los estudios térmicos y de sorción de agua. De esta manera se amplía el conocimiento del papel de las interacciones sólidos-agua en la definición de propiedades macromoleculares y de estabilidad del alimento. Así, a través de diferentes

secuencias de pulsos se logran estudiar los comportamientos dinámicos de las diferentes poblaciones de protones presentes frente al aumento del contenido de agua y la temperatura. Dado que un cierto grado de movilidad molecular es necesario para que se lleven a cabo algunas transformaciones y procesos, estos análisis proveen herramientas útiles para planificar estrategias de producción y almacenamiento que minimicen cambios físicos desfavorables asociados a modificaciones mecánicas y otros parámetros de calidad.

4.1.8.1 Decaimiento libre de la inducción (FID)

De acuerdo con Hemdane y col. (2017), Bosmans, Pareyt y Delcour (2016), Roudaut y col. (2009) y Choi y Kerr (2003), las señales FID se pueden asociar con protones de enlaces C-N y N-H de almidón cristalino y proteínas, respectivamente, y protones de moléculas de agua que se encuentran íntimamente asociadas a ellos. Los tiempos de relajación obtenidos por FID se modelaron mediante una ecuación mono-exponencial (Ecuación 6) y se denominaron T_{2FID} . Los T_{2FID} de los sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (%), b.s.) en el rango de temperaturas 10-80 °C se muestran en la Figura 19. Como puede observarse, los T_{2FID} aumentan con la humedad y la temperatura, indicando mayor movilidad molecular en los sólidos y las moléculas de agua asociadas. Este comportamiento coincide con el descrito por otros autores para sistemas alimentarios similares (Kovrlija y col., 2020; Kovrlija y Rondeau-Mouro, 2017; Roudaut y col., 2009; Farroni y col., 2008).





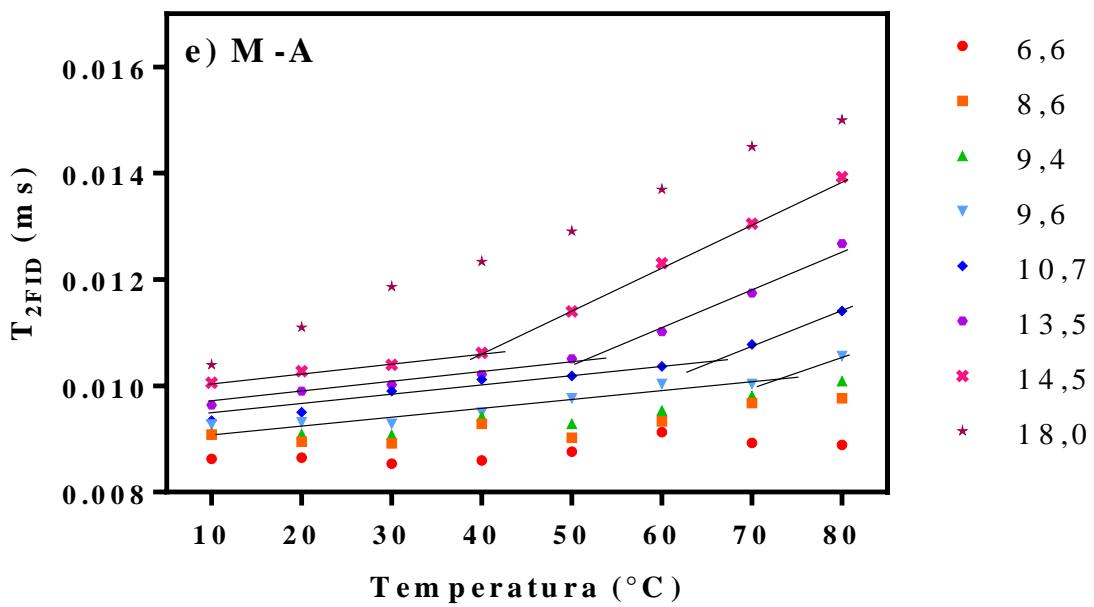


Figura 19: Tiempos de relajación T_{2FID} de los diferentes sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (% , b.s.) en función de la temperatura. **a)** M = control; **b)** M-M = maíz + mijo; **c)** M-S = maíz + sorgo; **d)** M-Q = maíz + quínoa; **e)** M-A = maíz + alpiste.

Los tiempos de relajación aumentan casi linealmente con la temperatura, pero, en un cierto punto, ocurre un cambio marcado de pendiente. De acuerdo con Srikao y Rahman (2018) y Farroni y col. (2008), la temperatura a la que ocurre este cambio de pendiente está asociada a la temperatura de transición vítrea (T_g), a cada contenido acuoso. La pendiente positiva de las gráficas de T_{2FID} vs. temperatura y el aumento de los valores de T_{2FID} con el contenido de agua por debajo de la T_g evidencia los movimientos moleculares de los sólidos y las moléculas de agua asociadas en el estado vítreo (Lin y col., 2006). Así, de manera complementaria al análisis por DSC, se determinó la T_g de los sistemas extrudidos con diferentes contenidos acuosos en aquellas muestras donde se observó el cambio de pendiente en el gráfico. Es importante destacar que en este caso sólo se pudieron determinar aquellas T_g que se encontraban en el rango de temperaturas analizada (10-80 °C). Esto implica que se pudieron observar los cambios de pendientes para las muestras con humedades en el rango 9,6

– 15,5 % (b.s.), según cada sistema. En todos los casos, la T_g disminuyó con el contenido acuoso, debido al efecto del agua (Farroni y col., 2008) (Sección 4.1.7). Otra observación importante es que los cambios de pendientes se hicieron más evidentes con el aumento de la humedad, lo que facilitó la determinación de la transición vítreo (Lin y col., 2006). Esto coincide con el aumento de los valores de ΔC_p asociados a la transición vítreo con el contenido de agua (Tabla 6, Sección 4.1.7), en asociación a mayores movilidades moleculares. Los valores de T_g hallados por los tiempos de relajación de la secuencia FID se presentan en la Tabla 8 y son similares a los reportados por DSC, con pequeñas variaciones según cada caso, lo que confirma la efectividad de esta técnica para el análisis de la transición vítreo.

Debido a la similitud entre los valores reportados por ambas técnicas, la comparación entre las diferentes formulaciones coincide con lo discutido en la Sección 4.1.7. El comportamiento de los sistemas a bajas humedades no pudo analizarse por esta técnica, dado que sólo se visualizaron las T_g que se encontraban por debajo de 80 °C. En el rango de temperaturas evaluadas se observó que, a grandes rasgos, los sistemas M-Q y M-A presentan los valores de T_g más bajos para humedades medianas a altas en todas las formulaciones, aunque sin diferencias significativas entre los sistemas. Esto se podría asociar a la distribución y/o concentración de compuestos hidrofílicos o de lípidos y también al cambio en su disposición o asociación durante la adsorción de agua. Se ve reflejado también en los valores de la constante k de Gordon y Taylor levemente mayores para dichas muestras (Tabla 7), que indica mayor susceptibilidad al efecto del agua sobre la T_g . Esto coincide con los resultados del análisis de las propiedades de adsorción de agua (Sección 4.1.6). Por su parte, los sistemas M, M-M y M-S presentaron valores de T_g más altos para los contenidos de agua evaluados, aunque, nuevamente, sin diferencias significativas. En particular, las formulaciones M-M y M-S mostraron los valores levemente más altos en todos los casos y, consecuentemente, los valores levemente menores de la constante k de Gordon y Taylor para estas muestras (Tabla 7). Estos

resultados también se respaldan con la discusión de los parámetros de adsorción de agua obtenidos a través de las isotermas (Sección 4.1.6).

El ajuste de Gordon y Taylor para los valores de T_g determinados por FID no pudo realizarse debido al número limitado de datos experimentales a modelar, obtenidos en un rango acotado de humedad para todos los sistemas. De esta manera, no se pudieron determinar los valores de T_{gl} o k , para poder hacer una comparación más exhaustiva del efecto del agua entre las diferentes formulaciones. Esto impidió, en principio, conocer el comportamiento de los sistemas a muy bajos contenidos de agua que, por ejemplo, para la mezcla con alpiste resultaron relevantes en las isotermas de adsorción de agua.

Tabla 8: Valores de temperatura de transición vítrea (T_g) obtenidos por secuencia FID de ^1H -RMN para los sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (%, b.s.)*

Muestra	Contenido de agua (%, b.s.)	Temperatura de transición vítrea (T_g , °C)
M	11,5 ± 0,3	74,8 ± 0,3
	11,8 ± 0,2	72,5 ± 0,5
	14,3 ± 0,6	51,1 ± 0,2
	15,1 ± 0,1	38,5 ± 0,7
M-M	11,7 ± 0,5	71,6 ± 0,3
	12,0 ± 0,2	67,5 ± 0,2
	14,1 ± 0,3	54,5 ± 0,4
	15,5 ± 0,7	38,7 ± 0,4
M-S	11,7 ± 0,3	73,4 ± 0,1
	12,2 ± 0,3	70 ± 1
	14,8 ± 0,2	55 ± 1

	15,4 ± 0,3	41,4 ± 0,3
	10,0 ± 0,1	71,8 ± 0,4
	12,0 ± 0,4	60,2 ± 0,3
M-Q	12,1 ± 0,2	58,6 ± 0,3
	14,7 ± 0,4	49,9 ± 0,2
	15,4 ± 0,1	34,2 ± 0,2
	9,6 ± 0,4	73 ± 2
	10,7 ± 0,6	65,7 ± 0,2
M-A	13,5 ± 0,1	51,7 ± 0,3
	14,5 ± 0,3	39,9 ± 0,3

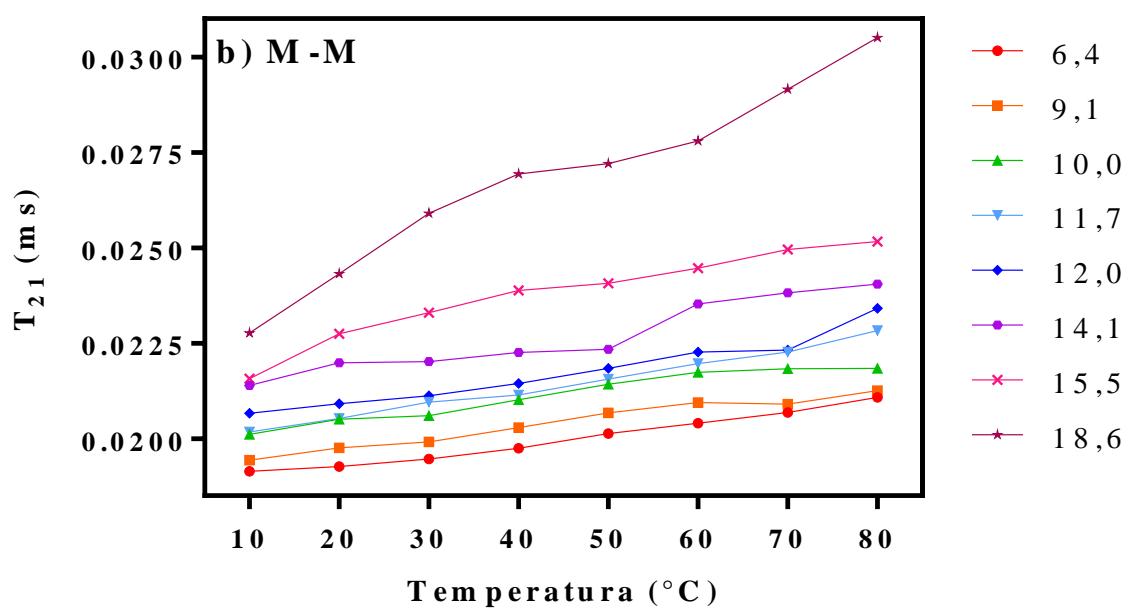
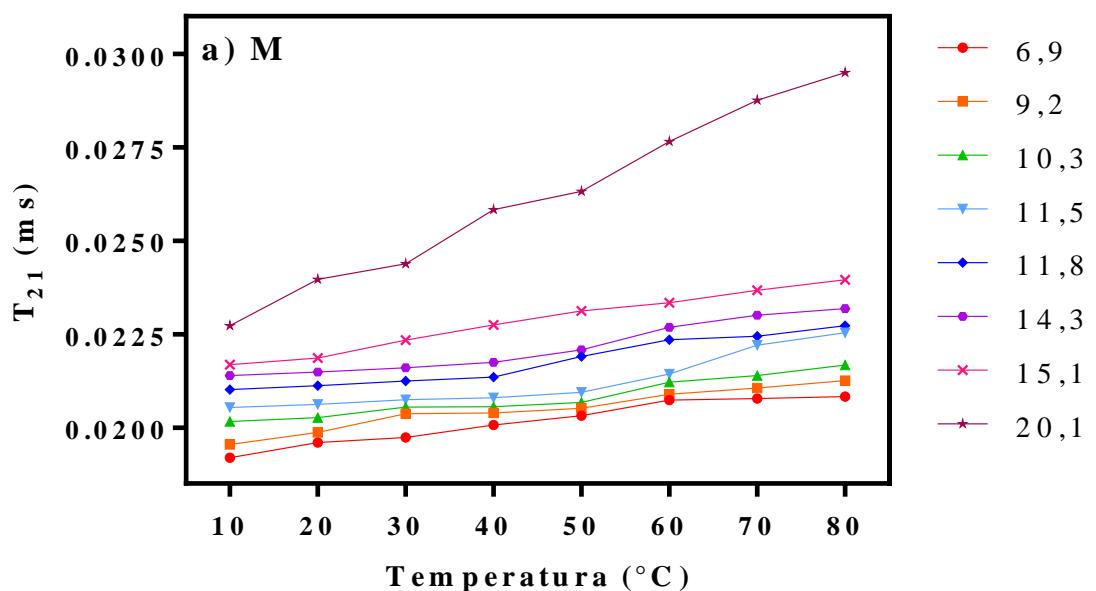
M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

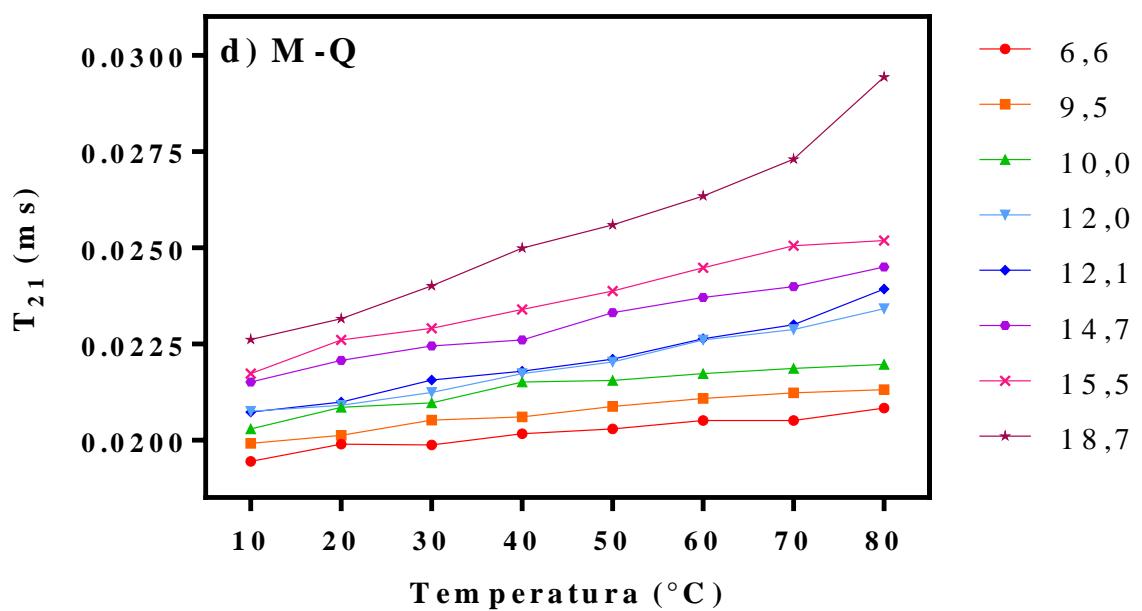
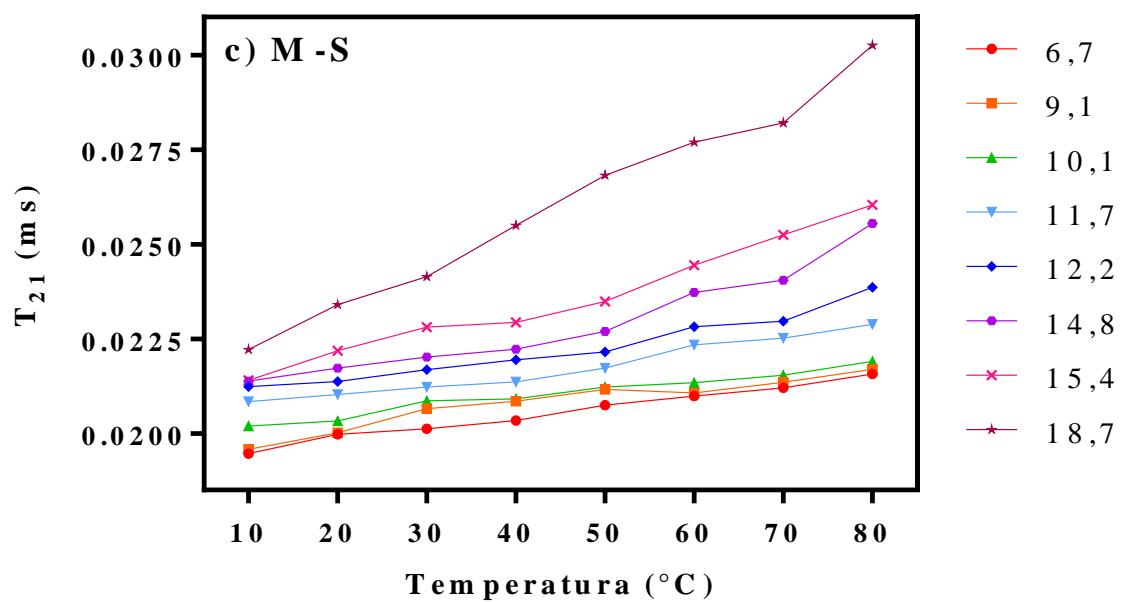
* Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar ($n = 3$).

4.1.8.2 Ecos de espín de Hahn

La secuencia de Hahn se aplicó para evaluar ecos de espín de aquellas poblaciones de protones con mayor movilidad que las detectadas por la secuencia FID. Para las muestras con contenidos de agua por debajo del límite de hidratación de GAB (Tabla 4), se observó una sola población y su decaimiento de la inducción se ajustó a un modelo mono-exponencial (Ecuación 6) (T_{21}). A humedades más altas, el modelo bi-exponencial (Ecuación 7) resultó más adecuado, indicando la aparición de una segunda población de protones (T_{22}).

En la Figura 20 se muestran los valores de los tiempos de relajación T_{21} en función de la temperatura para los sistemas extrudidos con diferentes contenidos acuosos (% , b.s.). Estos tiempos se encuentran en el rango de 0,019 y 0,03 ms y corresponden a la misma población descrita por la secuencia FID (T_{2FID}), es decir, protones de sólidos y moléculas de agua íntimamente asociadas a ellos. Sin embargo, los valores de los tiempos de relajación para la misma población son más altos debido a las diferencias entre las secuencias de pulsos.





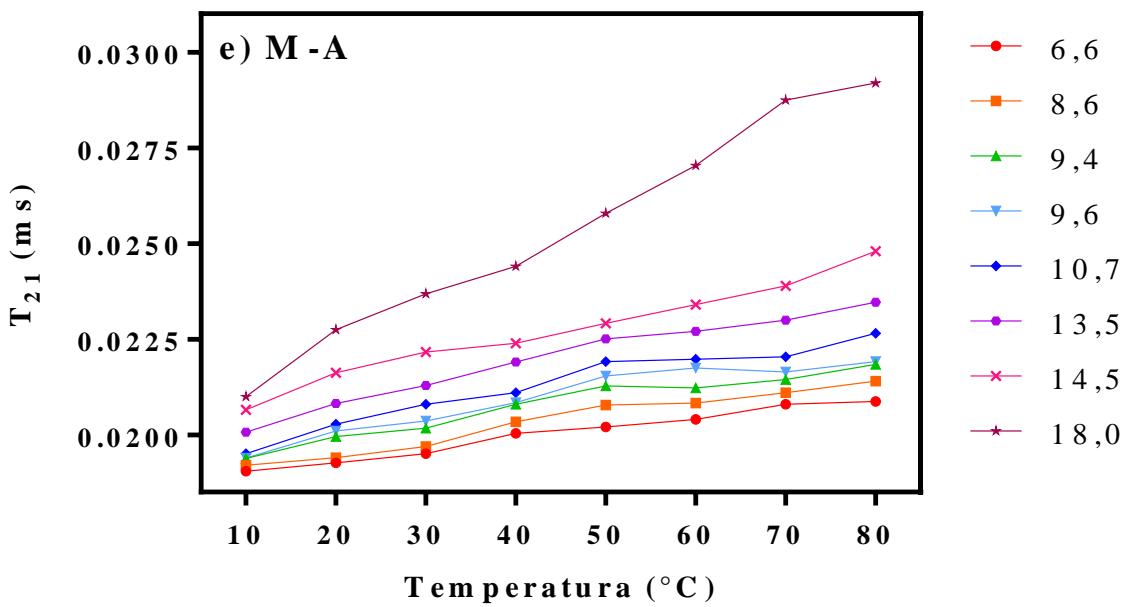


Figura 20: Tiempos de relajación T_{21} obtenidos por eco de espín de Hahn para los sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (% b.s.) en función de la temperatura. **a)** M = control; **b)** M-M = maíz + mijo; **c)** M-S = maíz + sorgo; **d)** M-Q = maíz + quínoa; **e)** M-A = maíz + alpiste.

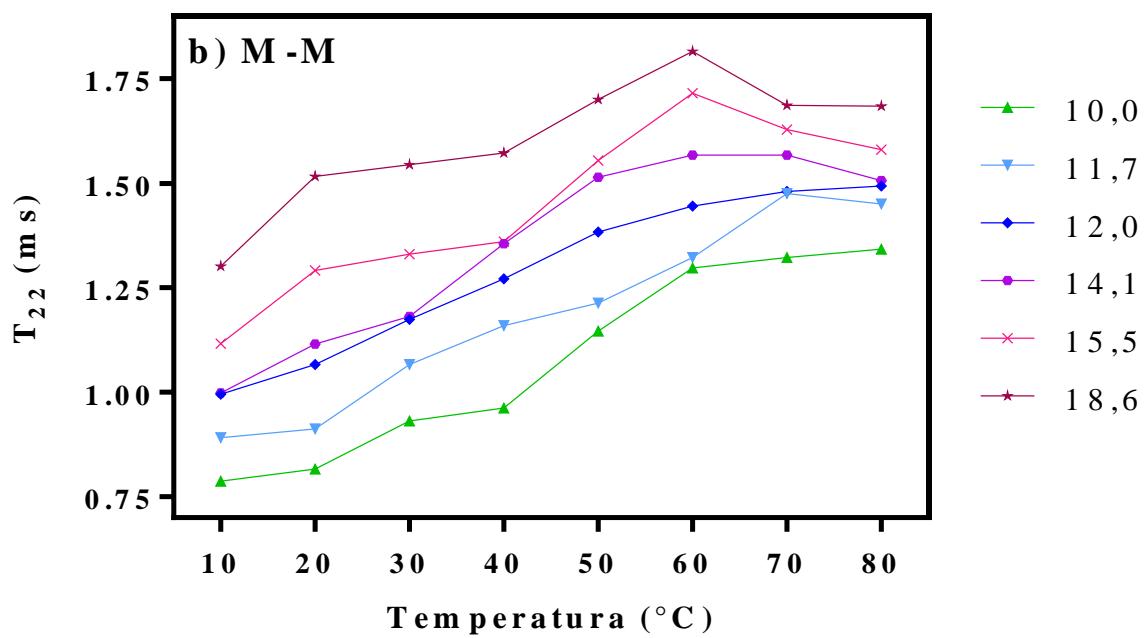
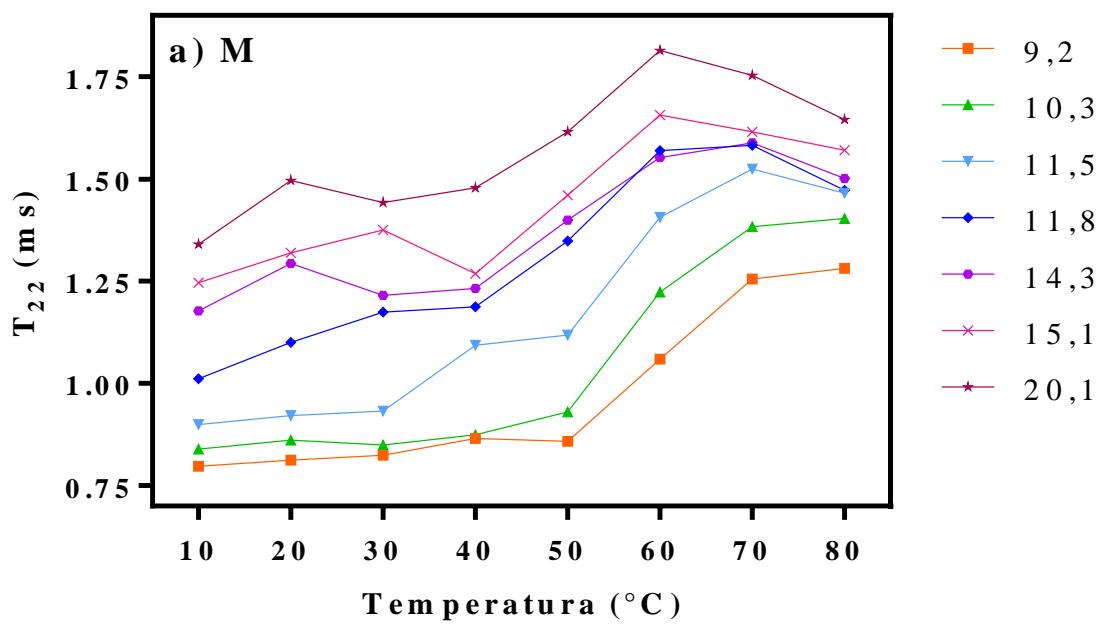
Los valores de T_{21} aumentaron casi linealmente con la temperatura para los sistemas con contenidos de agua de hasta 11-12 % (b.s.) en todas las formulaciones. Por encima de este valor, mayor al límite de hidratación de GAB, la curva comenzó a parecerse a una sigmoidal. Se destaca el aumento de los tiempos de relajación de las muestras con contenidos acuosos superiores al 15 % (b.s), lo que hace que estas curvas se separen del resto. Esto se atribuyó a que su temperatura de transición vítrea (T_g) se encuentra por debajo de los 10 °C (Tabla 6) y, por lo tanto, al comienzo de la evaluación, ya se encontraban en el estado de líquido sobre enfriado o gomoso a diferencia de las de menor humedad que estaban en estado vítreo. Esto implica un aumento significativo de la movilidad molecular, lo que se reflejó en los valores de T_{21} de las poblaciones de protones presentes.

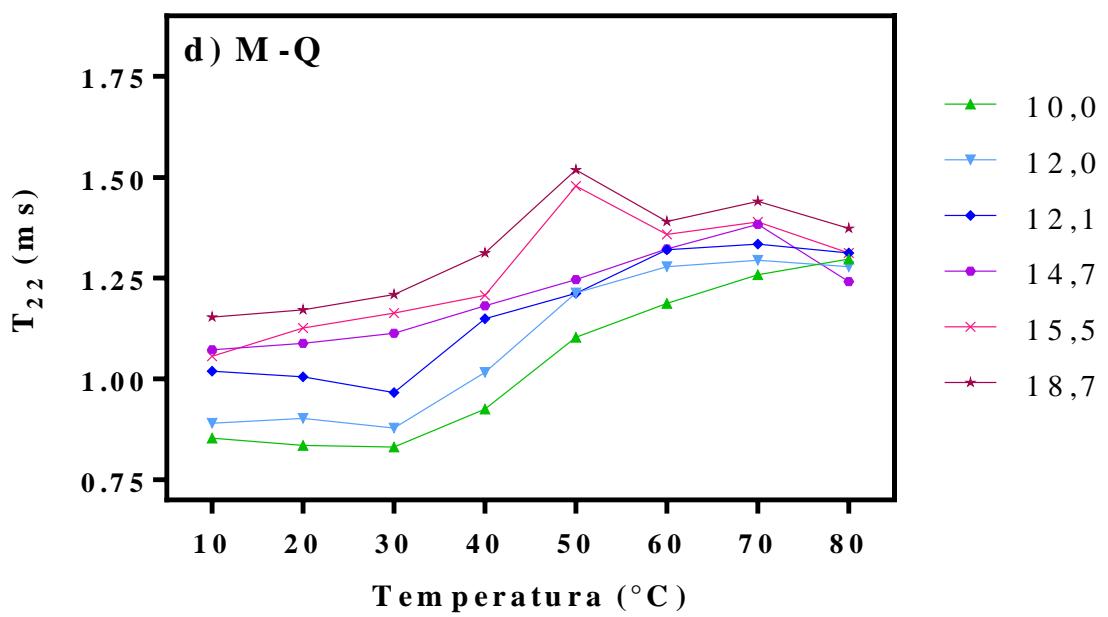
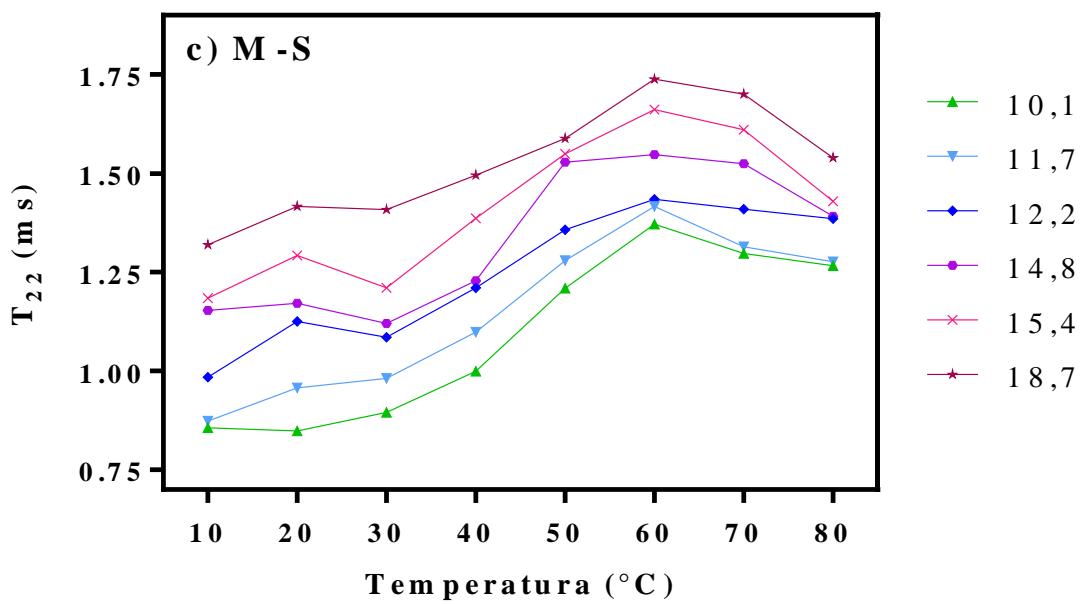
La segunda población de protones, que surge en aquellas muestras con contenidos de agua superiores a los límites de hidratación de GAB (Tabla 4), presentó valores de tiempos de relajación (T_{22}) más altos que la primera población (T_{21}). Esta se atribuyó a moléculas de agua con interacciones más débiles con los sólidos, o también llamadas “moléculas de la multicapa”, y por lo tanto presentan mayor movilidad que las de la primera capa de hidratación (Hemdane y col., 2017; Farroni y Buera, 2014; Farroni y col., 2008). Los tiempos de relajación asociados a esta población se representaron como T_{22} y su variación con la temperatura se representa en la Figura 21. Los T_{22} tomaron valores en un rango entre 0,75 – 1,75 ms y también aumentaron con la temperatura, pero de manera sigmoidea, indicando mayor movilidad molecular.

En particular, para los sistemas con un humedades iguales o mayores al 10 – 12 % (b.s.), según cada formulación, se observó una disminución de los T_{22} al aumentar la temperatura a partir de los 60 °C. Considerando el bajo contenido de agua de estos sistemas, este fenómeno no puede asociarse a la gelatinización del almidón, dado que en estas condiciones ocurre a temperaturas más altas. Sin embargo, este fenómeno podría atribuirse a las relajaciones entálpicas discutidas en la Sección 4.1.7, dado que ocurren en un estrecho rango de temperaturas, independientemente del contenido de agua de la muestra (Porras-Saavedra y col., 2019; Cova y col., 2012; Shogren, 1992). Como se mencionó anteriormente (Sección 4.1.7) estas transiciones dependen del contenido acuoso del sistema y de la temperatura del tratamiento (Fan y Roos, 2017). De hecho, con el aumento del contenido agua y la temperatura las caídas de los T_{22} fueron más pronunciadas en todas las formulaciones, indicando mayores reacomodamientos moleculares del material, facilitados por el aumento de la movilidad molecular dado por las mayores cantidades de moléculas de agua presentes. Incluso, estas caídas de T_{22} se pudieron observar a temperaturas más bajas (50 °C) para las muestras con los mayores contenidos acuosos, ya que en esas condiciones se requiere menor energía para que ocurran las relajaciones estructurales. Se han relacionado estas transiciones con cambios en

varias propiedades físicas y sensoriales, como la pérdida de crocancia de la corteza del pan (van Nieuwenhuijzen y col., 2010). Adicionalmente, van Nieuwenhuijzen y col. (2010) confirmaron que la pérdida de crocancia del pan es atribuible al comportamiento dinámico de la población de protones que no se encuentra íntimamente asociado a los sólidos, es decir, los correspondientes a las señales T_{22} . Particularmente, estos autores establecieron que el aumento de la movilidad molecular de las cadenas laterales de polímeros como consecuencia del mayor contenido acuoso (grupos involucrados en la relajación entálpica según Liu y col. (2006)) resulta en una menor energía disponible para la propagación de la fractura durante la deformación del material, lo que justifica la disminución de la crocancia.

Todos estos resultados también se sustentan con el análisis de las poblaciones de protones a partir de la distribución de los tiempos de relajación en todo el rango de a_w a temperaturas por debajo (20 °C) y por encima (80 °C) de la relajación entálpica (Figura 22). En todas las formulaciones cuando la humedad estuvo por debajo de los valores de agua límite de hidratación de GAB (Tabla 4), sólo se visualizaron señales de protones atribuibles a los sólidos de la matriz y el agua íntimamente asociada a ellos (T_{21}). Por encima de estos valores de humedad, aparece la segunda población de protones (T_{22}), con mayores tiempos de relajación (Figura 22). La amplitud o intensidad de señal de esta segunda población aumenta con el contenido acuoso, debido a la mayor cantidad de moléculas de agua presentes. Sin embargo, esta señal disminuye a 80 °C en comparación con los 20 °C. Es importante destacar que los sistemas a 20 °C se encuentran en estado vítreo, mientras que a 80 °C ya se ha superado la temperatura de transición vítreo para la mayoría de las formulaciones (Tabla 6, Sección 4.1.7). Por lo tanto, además de la relajación entálpica, como consecuencia del calentamiento también ocurre un cambio físico y estructural en las muestras, que podría justificar estos cambios en las señales.





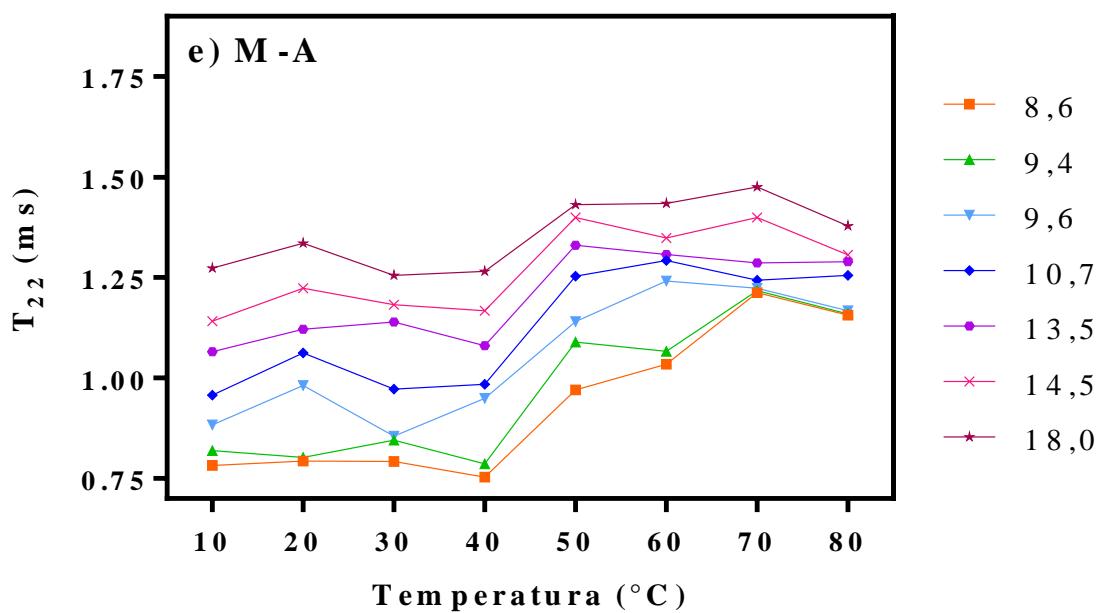


Figura 21: Tiempos de relajación T_{22} obtenidos por eco de espín de Hahn para los sistemas extrudidos con diferentes contenidos de agua (%, b.s.) en función de la temperatura. **a)** M = control; **b)** M-M = maíz + mijo; **c)** M-S = maíz + sorgo; **d)** M-Q = maíz + quínoa; **e)** M-A = maíz + alpiste.

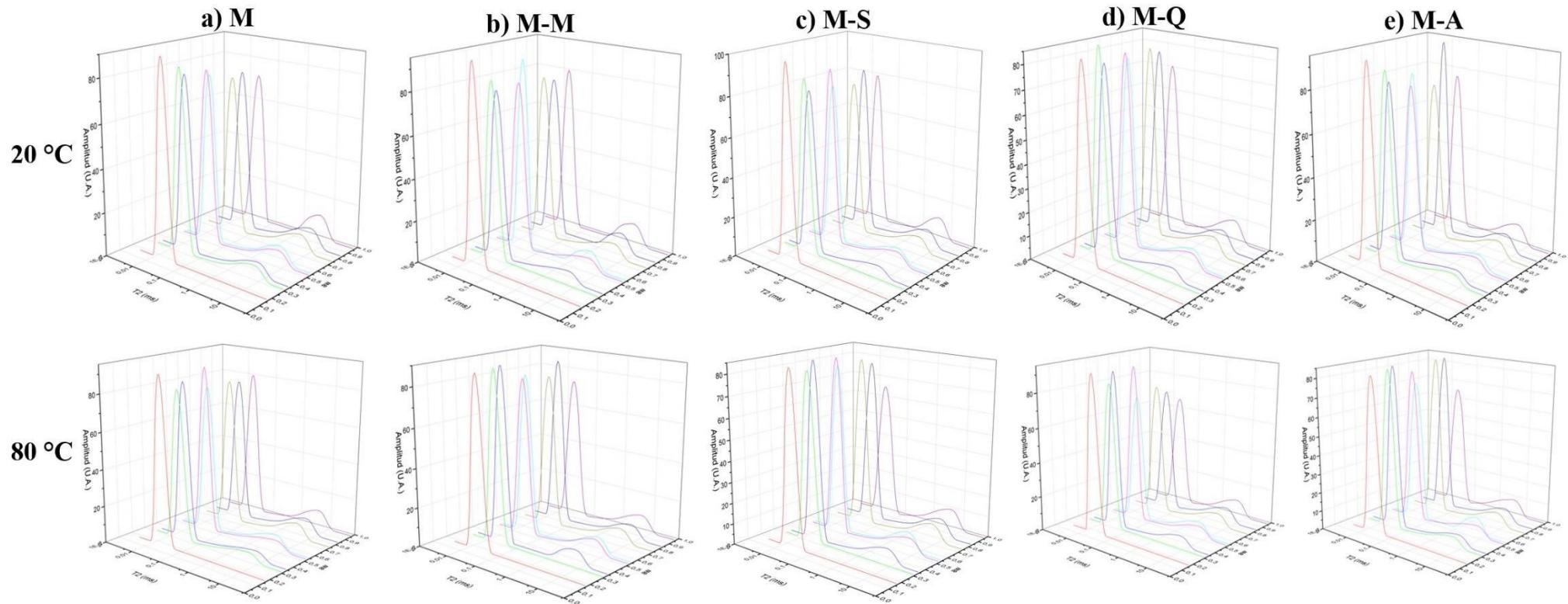


Figura 22: Poblaciones de protones de sistemas extrudidos a 20 °C y 80 °C equilibrados a diferentes valores de actividad de agua (a_w) analizadas por ecos de espín de Hahn. U.A. = unidades arbitrarias. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

4.1.8.3 CPMG

A través de la secuencia CPMG se pueden analizar poblaciones de protones con mayores movilidades que las que permiten el decaimiento libre de la inducción o el eco de espín de Hahn. Estos protones los comprenden moléculas de agua que interactúan débilmente con los sólidos y también protones de lípidos (Chen y col., 2017; Choi y Kerr, 2003). Los resultados se muestran en la Figura 23. Las poblaciones con tiempos de relajación entre 1-10 ms corresponden a las moléculas de agua con interacciones débiles con los sólidos y son visibles en los sistemas con contenidos de agua superiores a los límites de hidratación de GAB (Tabla 4). El comportamiento dinámico de esta población de agua fue discutido previamente en el estudio de ecos de espín de Hahn (Sección 4.1.8.2). Las poblaciones con picos anchos y máximos alrededor de los 100 ms corresponden a protones de los lípidos (Chen y col., 2017) y se detectaron en todo el rango de a_w . En las muestras con menores valores de a_w estos picos se ven más altos debido a su mayor importancia relativa. Es importante notar que en las mezclas las señales son más intensas porque se suma el aporte de la harina de maíz más el que aportan las harinas en estudio. Con el aumento del contenido acuoso, el número de protones asociados a las moléculas de agua móviles se incrementa, mientras que las señales relativas a los lípidos se vuelven menos intensas y más angostas. De todos modos, las bandas de los lípidos son más anchas en comparación a las del agua y esto se asocia a la heterogeneidad de la fase lipídica (Chen y col., 2017).

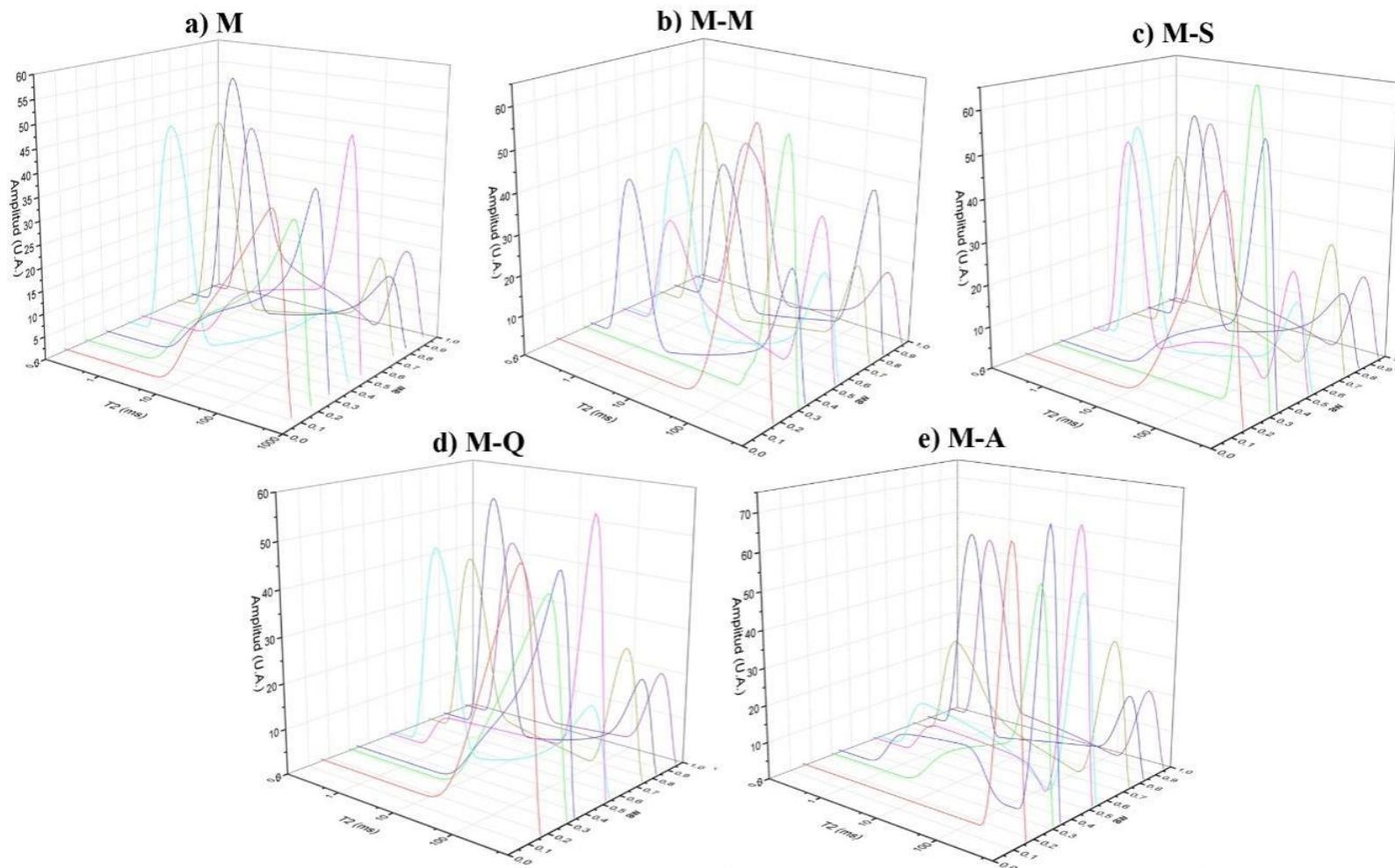


Figura 23: Poblaciones de protones de sistemas extrudidos a 20 °C equilibrados a diferentes valores de actividad de agua (a_w) analizadas por secuencia CPMG. U.A. = unidades arbitrarias. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

4.1.9 Microscopía de barrido electrónico (SEM)

En la Figura 24 se encuentran las micrografías de los sistemas extrudidos analizados mediante microscopía de barrido electrónico. Se encontraron algunos patrones comunes entre todas las formulaciones. Una característica general es la estructura densa, cavernosa y porosa, que explica los bajos valores de w del modelo GDW utilizado para modelar los datos de las isotermas de adsorción de agua, discutido en la Sección 4.1.6. Particularmente, el sistema M-A (Figura 24 E) presenta una microestructura interna más porosa, con múltiples celdas de aire de tamaños variables, lo cual coincide con el valor más alto de w en comparación al resto. Por otro lado, las muestras M (Figura 24 A) y M-Q (Figura 24 D) presentaron una microestructura más compacta, lo que pudo relacionarse con su mayor contenido de agua final (Tabla 1). Como las burbujas de aire son el resultado de una evaporación rápida, favorecida por el secado del producto, mayores contenidos de agua finales se asociaron con una menor cantidad de celdas de aire formadas durante la etapa de expansión y, por lo tanto, mayores valores de dureza, como se muestra en la Tabla 2.

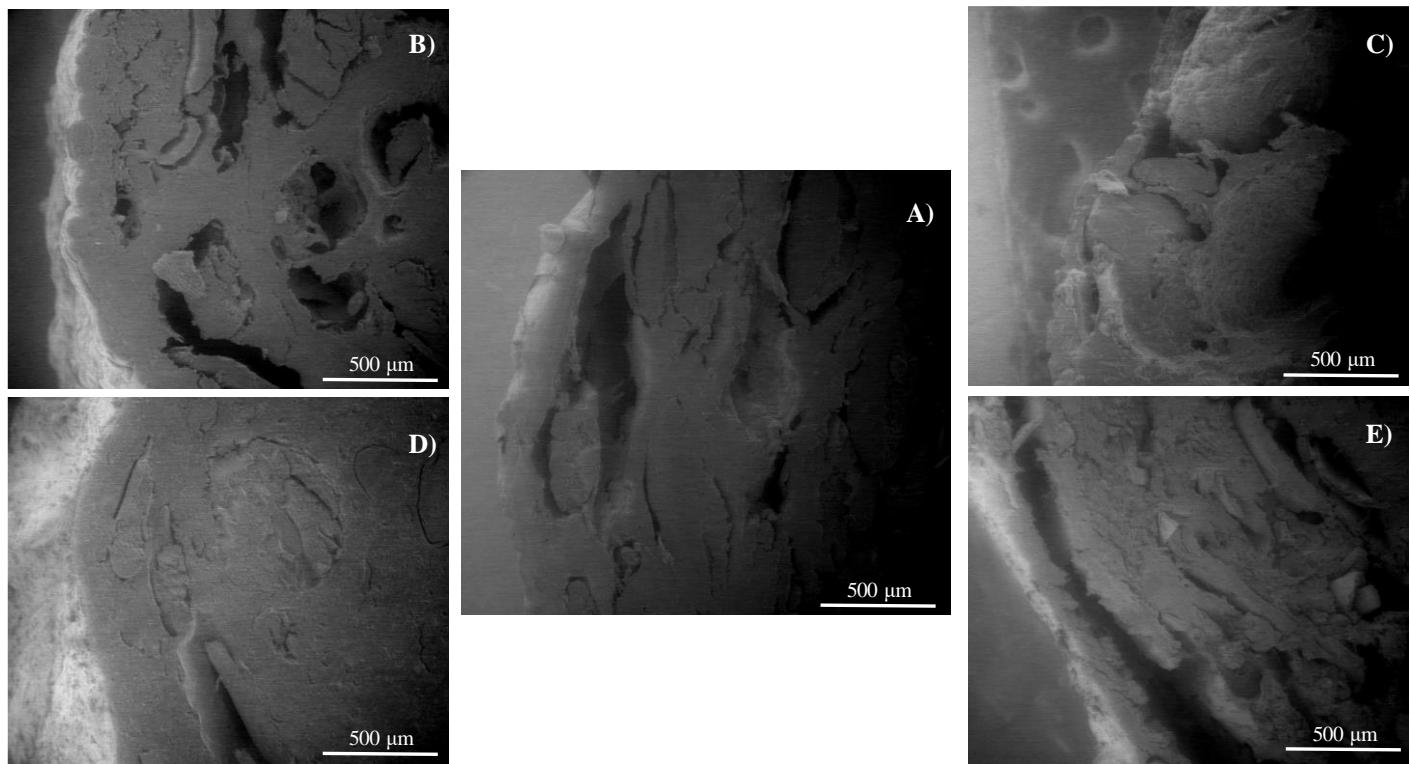


Figura 24: Micrografías de barrido electrónico de los diferentes productos extrudidos. **A)** M = control; **B)** M-M = maíz + mijo; **C)** M-S = maíz + sorgo; **D)** M-Q = maíz + quínoa; **E)** M-A = maíz + alpiste.

Las muestras control (Figura 24 A) presentaron algunas celdas de aire, con tamaños variables a través de la estructura interna irregular. También pudieron observarse algunas fracturas y partículas de gran tamaño. Estas características pueden atribuirse a la dextrinización del almidón (valor más alto de ISA, Tabla 2) o la lixiviación de amilosa, que actúa como un pegamento, llevando a la formación de partículas de mayor tamaño (Jafari y col., 2017). También se distinguió una capa externa o borde más grueso que para el resto de los sistemas, que pudo ser responsable de los elevados contenidos de agua finales (Tabla 1), limitando la eliminación de agua durante la etapa de enfriamiento. Al mismo tiempo, este borde también puede explicar los valores altos de dureza obtenidos para las muestras control (Tabla 2).

Con la adición de harina de mijo (Figura 24 B), se formaron más burbujas de aire y de mayor tamaño. Esta estructura interna cavernosa, y los altos niveles de fibra dietaria que

disminuyen la fuerza de la matriz, pueden justificar los valores más bajos de dureza de estas muestras (Tabla 2), ya que la energía necesaria para penetrarlas se reduce a medida que la cuchilla fractura de manera consecutiva las paredes de las celdas de aire (Oliveira y col., 2018; Kasprzak y col., 2013). Cuando hay más burbujas de aire o éstas son más grandes se reduce el espesor o la cantidad de paredes que debe atravesar la cuchilla durante el recorrido en una determinada distancia.

La Figura 24 C muestra la micrografía de los sistemas extrudidos conteniendo 25 % de harina de sorgo. Los productos resultantes presentaron una estructura interna áspera y heterogénea, con celdas de aire grandes y profundas. También se observaron partículas grandes e incrustaciones, que pueden relacionarse al contenido de fibra dietaria como en las muestras M-M. Similarmente al caso anterior, en estos productos el borde externo es más fino y la matriz más porosa, lo que en conjunto justifica los menores valores de dureza de estos sistemas en comparación al control (Tabla 2).

La adición de quínoa (Figura 24 D) resultó en la obtención de productos con una microestructura más homogénea y suave que con el resto de las harinas, con menor número de poros y de fracturas, en concordancia con lo reportado por Cueto y col. (2015). Desde un punto de vista estructural, estas observaciones explican los elevados valores de dureza obtenidos en estas muestras (Tabla 2). Los sistemas M-Q presentaron los valores más altos de humedad final (Tabla 1) y, curiosamente, de dureza, con la microestructura menos porosa de todas. Sin embargo, se conoce que el agua puede actuar como un agente antiplastificante hasta un contenido de agua de 16 %, incrementando la energía necesaria para deformar la muestra (Farroni y col., 2008). A nivel macroestructural, las muestras M-Q presentaron el grado de expansión más alto (Tabla 2), pero las micrografías SEM revelaron que estos sistemas presentaron las microestructuras más compactas.

Con la adición de harina de alpiste, se obtuvieron productos con una estructura interna áspera, rugosa y heterogénea (Figura 24 E). Se observaron, además, numerosas fracturas y partículas incrustadas, con relación a su elevado contenido de fibra dietaria, de manera similar que para los sistemas M-M y M-S. También se visualizaron múltiples burbujas de aire de gran tamaño, en relación con el valor de w del modelo GDW, que indica una microestructura más porosa que el resto de las formulaciones. El borde externo más fino y el elevado número de poros también justificaría los menores valores de dureza respecto al control (M) o la formulación con quínoa (M-Q) (Tabla 2).

4.1.10 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 25 se presentan los espectros obtenidos para las diferentes formulaciones antes (línea completa) y después del proceso de extrusión (línea punteada). Algunas bandas se pueden atribuir a modos vibracionales de enlaces de grupos químicos y, por lo tanto, asignarse a componentes de la matriz, tales como almidón, proteínas y lípidos (Tabla 9).

La banda más intensa en todos los espectros tiene un pico principal a 998 cm^{-1} (Figura 25 A-E), correspondiente a la flexión del enlace C-O del grupo glicosídico, que está asociado al almidón (Cueto y col., 2018). Otras bandas relacionadas al almidón incluyen el estiramiento C-O y la flexión C-O-C de los enlaces glicosídicos a 1014 cm^{-1} (Wiercigroch y col., 2017).

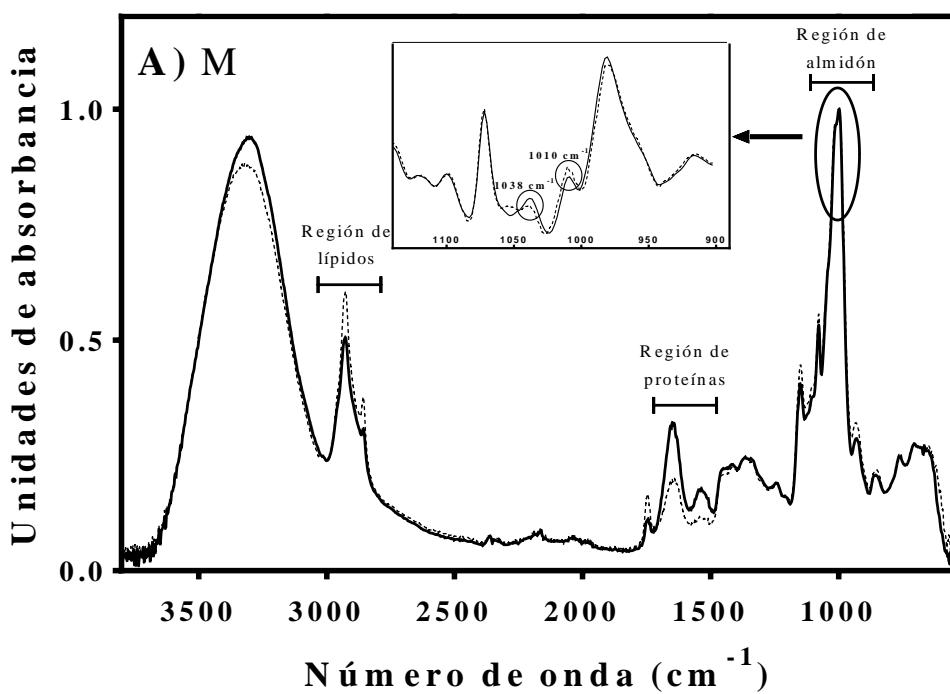
En la región de frecuencia alrededor de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ se observaron algunas modificaciones de bandas luego del proceso de extrusión, que fueron usadas en otros trabajos para analizar cambios de corto rango en el almidón debido a diferentes tratamientos (Warren y col., 2016). En esa región se aplicó la primera derivada para resaltar las diferencias entre los

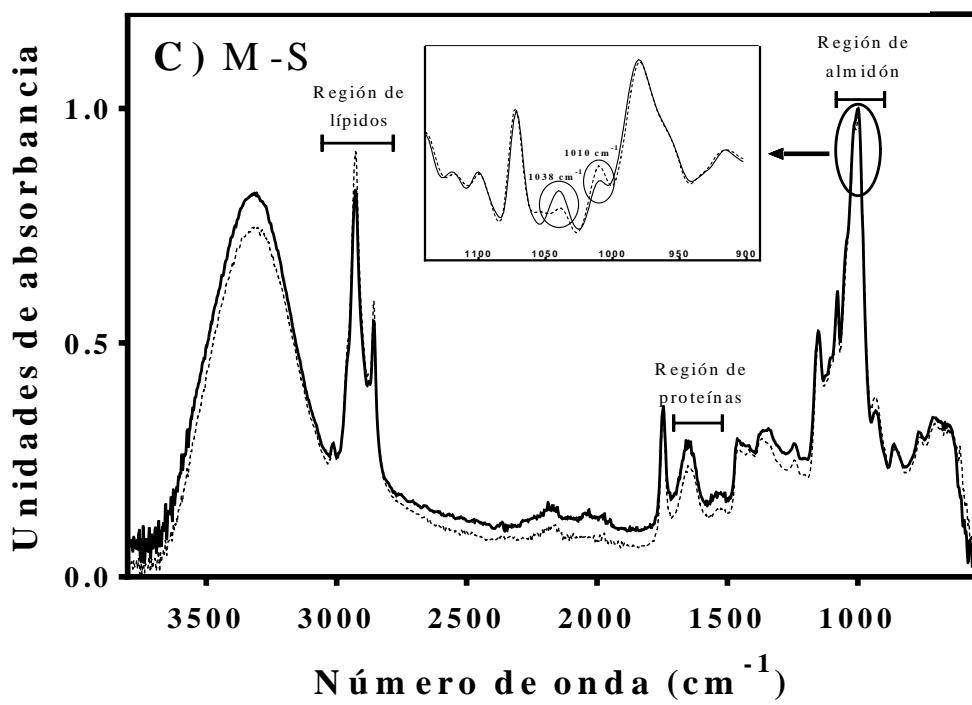
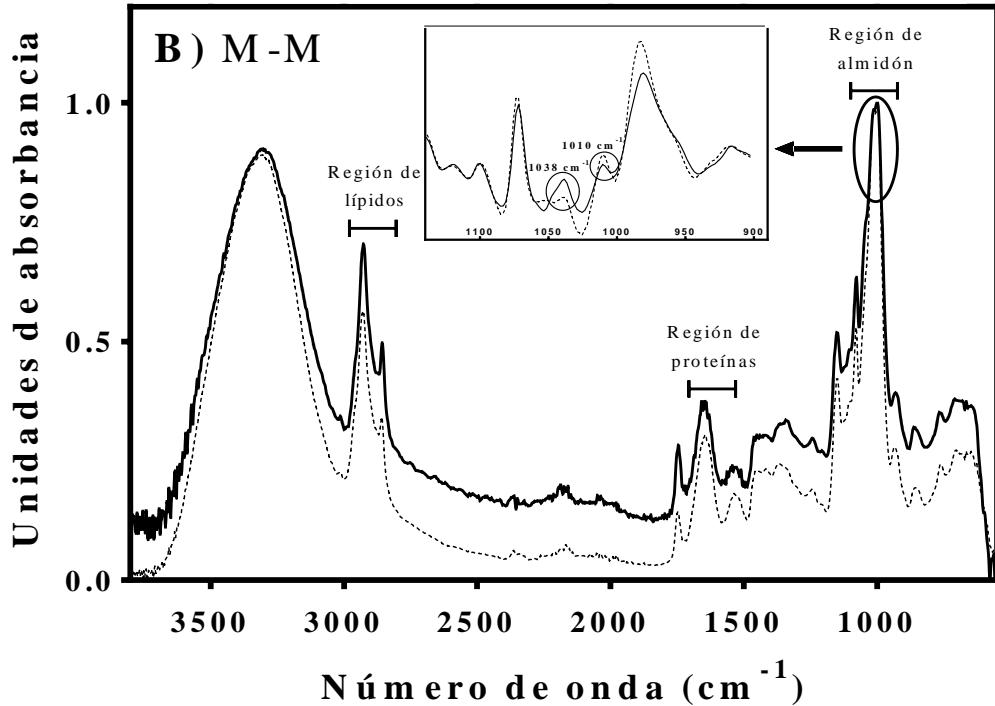
espectros y mejorar las relaciones entre las señales y el ruido (Fetterman, 2005), que se muestra en los insertos de cada figura.

Tabla 9: Asignación tentativa de bandas de espectroscopía FT-IR a grupos químicos, basada en datos bibliográficos.-

Número de banda (cm ⁻¹)	Asignación tentativa de banda	Molécula asociada	Referencia
998	Flexión C-O	Almidón	Cueto y col. (2018); Wiercigroch y col. (2017); Warren y col. (2016)
1010	Estiramiento C-O / Flexión C-O-C	Almidón (fase amorfa)	Zhao y col. (2020); Cueto y col. (2018); Jafari y col. (2017); Warren y col. (2016)
3300-3500	Estiramiento O-H	Agua / fibra / carbohidratos	Zhao y col. (2020); Cervantes-Ramírez y col. (2020); Wiercigroch y col. (2017); Bernardino-Nicanor y col. (2017)
2922	Estiramiento asimétrico -CH ₂	Lípidos	Zhao y col. (2020); Cervantes-Ramírez y col. (2020); Wiercigroch y col. (2017); Warren y col. (2016)
2853	Estiramiento simétrico -CH ₂	Lípidos	Zhao y col. (2020); Cervantes-Ramírez y col. (2020); Wiercigroch y col. (2017); Warren y col. (2016)
1745	Estiramiento C=O	Lípidos	Cervantes-Ramírez y col. (2020); Cueto y col. (2018)
1640	Estiramiento C=O / Flexión N-H	Proteínas (amida I, α -hélice)	Cueto y col. (2018); Wang y col. (2017); Jafari y col. (2017)
1540	Estiramiento N-H	Proteínas (amida II)	Cueto y col. (2018); Jafari y col. (2017)

Puede observarse para todas las muestras que la banda a 1010 cm^{-1} fue más intensa, mientras que la de 1038 cm^{-1} disminuyó luego de la extrusión. Estas bandas se asocian a modos vibracionales de los enlaces involucrados en la región amorfa y cristalina del almidón, respectivamente (Zhao y col., 2020; Cueto y col., 2018; Warren y col., 2016; Bernardino-Nicanor y col., 2017). Las modificaciones de las intensidades de las señales y las áreas bajo las curvas observadas luego de la extrusión en cada caso reflejan la ocurrencia de la gelatinización del almidón, con reducción de la estructura cristalina/ordenada (Cervantes-Ramírez y col., 2020; Bernardino-Nicanor y col., 2017; Warren y col., 2016). Esto coincide con los resultados discutidos en secciones anteriores.





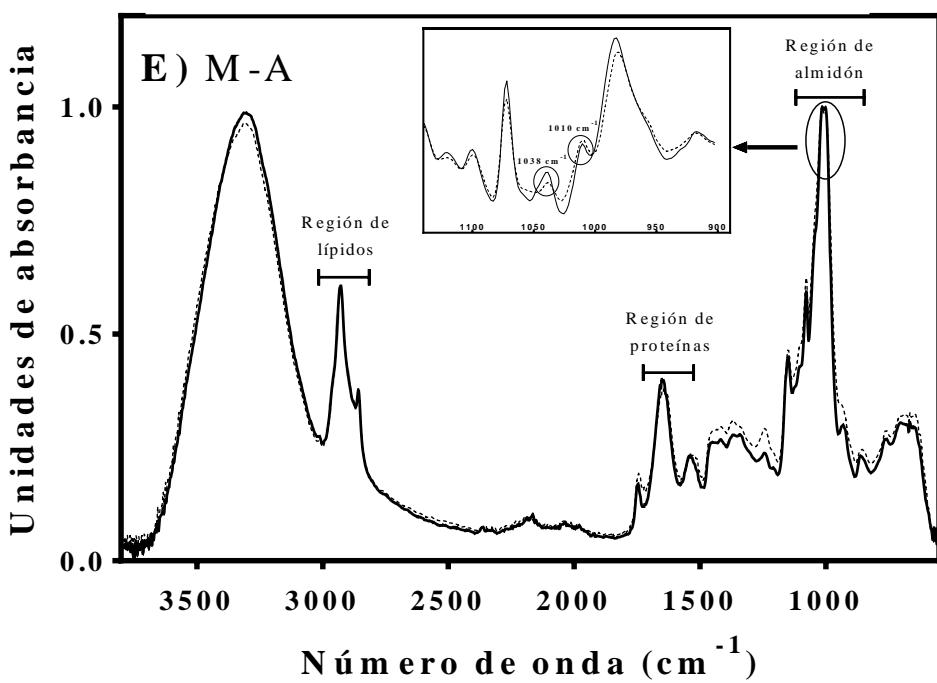
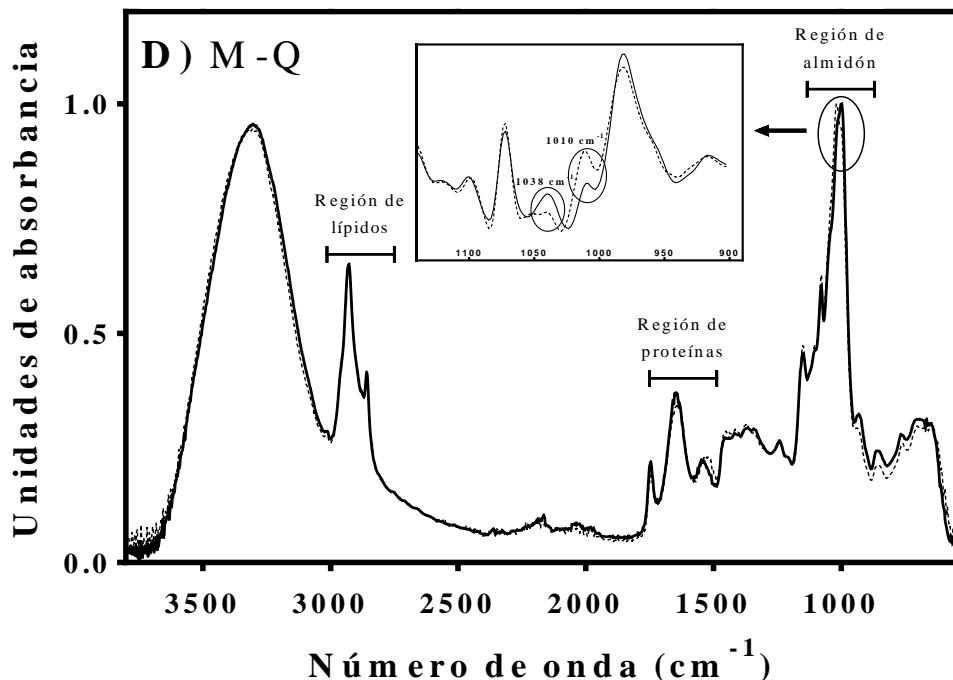


Figura 25: Espectros FT-IR de los diferentes productos extrudidos. **A)** M = control; **B)** M-M = maíz + mijo; **C)** M-S = maíz + sorgo; **D)** M-Q = maíz + quínoa; **E)** M-A = maíz + alpiste. Los espectros continuos corresponden a las muestras antes de la extrusión, mientras que los punteados pertenecen a los sistemas extrudidos. En los insertos se amplió la región del almidón, se aplicó la primera derivada y se muestran los cambios de las bandas a 1010 cm^{-1} y 1038 cm^{-1} .

La segunda banda más importante en todos los espectros fue la que se encontró alrededor de $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, que está asociada al estiramiento O-H (Zhao y col., 2020) y pudo relacionarse al agua y fibra dietaria, al igual que a otras moléculas conteniendo grupos oxhidrilos, tales como los carbohidratos (Cervantes-Ramírez y col., 2020). Cuando se comparan las señales de los espectros antes y después del proceso de extrusión, se puede observar que la intensidad de esta banda disminuyó para todos los sistemas extrudidos, reflejando la disminución del contenido de agua y fibra dietaria (Tabla 1).

Las bandas a 2922 y 2853 cm^{-1} , correspondientes a los estiramientos simétricos y asimétricos de $-\text{CH}_2$, respectivamente, y la de 1745 cm^{-1} , atribuido al estiramiento del $\text{C}=\text{O}$, se asocian a los lípidos (Cervantes-Ramírez y col., 2020; Cueto y col., 2018). Las modificaciones del contenido de lípidos discutido en la Sección 4.1.1 sólo se observaron para los sistemas M-M (Figura 25 B). La formación de complejos amilosa-lípidos durante la extrusión podría explicar las modificaciones en esas regiones de los espectros (Rolandelli y col., 2020; Cueto y col., 2018; Moisio y col., 2015).

Las bandas en la región $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ corresponden al grupo amida I (estiramiento $\text{C}=\text{O}$ y flexión N-H), indicativo de la estructura proteica secundaria (Cueto y col., 2018; Wang y col., 2017), mientras que la de 1540 cm^{-1} se asocia al grupo amida II (estiramiento N-H). Como el pico principal correspondiente al grupo amida I se encontró a 1640 cm^{-1} para todas las formulaciones crudas, se puede afirmar que todas las proteínas nativas se encontraban en

conformación α -hélice (Jafari y col., 2017). En concordancia con la Tabla 1 y considerando las absorbancias a 1540 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} , los sistemas con el mayor contenido proteico (M-M, M-Q y M-A) presentaron las mayores intensidades de picos, especialmente previo a la extrusión (Figura 25 B, D y E, respectivamente). Como se discutió previamente, luego del procesamiento termo-mecánico los contenidos de proteínas disminuyeron ligeramente en la mayoría de los casos, pero las muestras M-A mantuvieron los mayores niveles y las M, los menores. Estos resultados también se manifestaron en los correspondientes espectros FT-IR (Figura 25 E y A, respectivamente). Por otro lado, como el máximo de absorción cambió a 1627 cm^{-1} luego de la extrusión (línea punteada), se puede afirmar que el proceso generó un aumento de las conformaciones aleatorias o desordenadas de las proteínas en todos los casos (Jafari y col., 2017). Además, se observó un ensanchamiento de las bandas correspondientes a los grupos amida I y II, lo cual puede atribuirse al fenómeno de desnaturalización o desenrollamiento de las conformaciones α -hélices de las proteínas, lo que trae como consecuencia una potencial exposición de grupos reactivos (Wang y col., 2017). Estas modificaciones pueden promover las interacciones de las proteínas con otras macromoléculas, dado que aumenta la exposición de los enlaces peptídicos (Cueto y col., 2018). Esta exposición de las proteínas puede facilitar, por ejemplo, el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático, con los consecuentes cambios de color en las muestras, o la formación de los aglomerados proteicos por enlaces covalentes, con modificaciones en las propiedades mecánicas (Téllez-Morales y col., 2020; Jebalia y col., 2019).

4.1.11 Espectroscopía Raman con transformada de Fourier (FT-Raman)

De manera similar que para el caso de FT-IR, los sistemas extrudidos presentaron diferencias marcadas en los espectros antes (Figura 26 A) y después de la extrusión (Figura 26

B) en todos los casos. Todas las bandas de los espectros FT-Raman analizados, así como la asignación tentativa de las bandas asociadas se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10: Asignación tentativa de bandas de espectroscopía FT-Raman a grupos químicos, basada en datos bibliográficos.-

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación tentativa de banda	Molécula asociada	Referencias
476	Flexión C-C / C-O	Almidón (anillo de piranosa)	Ildiz y col. (2019); Yang y col. (2018); Wiercigroch y col. (2017); Bernardino-Nicanor y col. (2017); Mir y col. (2016)
940	Estiramiento C-O-C	Almidón (enlace glicosídico α -1,4)	Ildiz y col. (2019); Yang y col. (2018); Bernardino-Nicanor y col. (2017)
2911	Estiramiento C-H	Almidón	Ildiz y col. (2019); Wiercigroch y col. (2017)
1460	Flexión y giro -CH ₂	Almidón	Yang y col. (2018); Wiercigroch y col. (2017); Bernardino-Nicanor y col. (2017)
1127	Estiramiento C-O	Almidón	Ildiz y col. (2019); Yang y col. (2018); Wiercigroch y col. (2017)
1522	Estiramiento C=C en fase polienos	Carotenoides	Yang y col. (2018)
1157	Estiramiento C-C polienos	Carotenoides	Yang y col. (2018)
1754	Estiramiento C=O	Lípidos	Ildiz y col. (2019); Yang y col. (2018)
1658	Estiramiento C=O	Proteínas (amida I, α -hélice)	Ildiz y col. (2019); Yang y col. (2018); Wang y col. (2017)

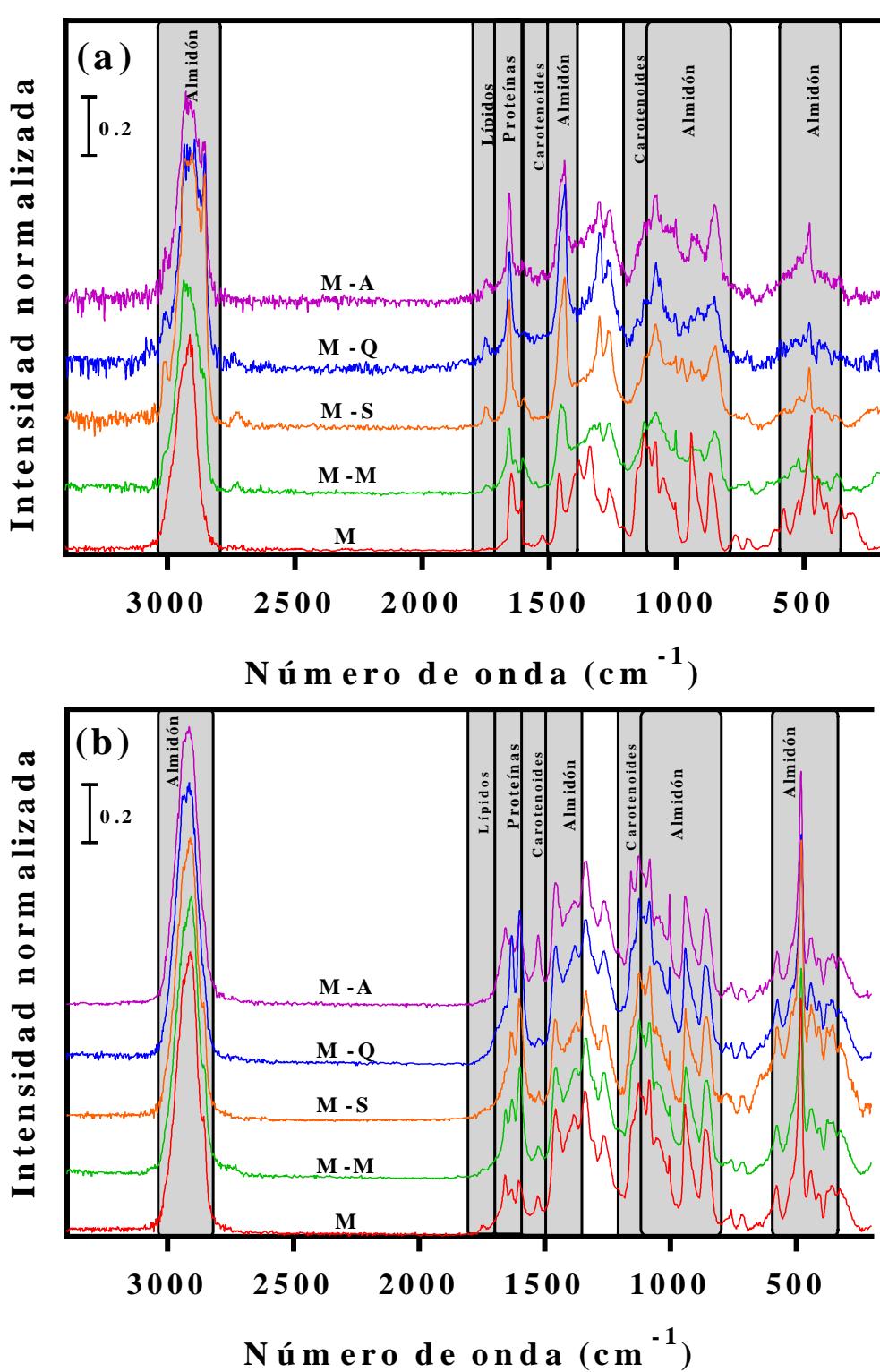


Figura 26: Espectros FT-Raman de los diferentes sistemas extrudidos **(a)** antes y **(b)** después de la extrusión. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. Todos los espectros se suavizaron dos veces utilizando un polinomio de segundo orden y 4 vecinos a cada lado.

Las bandas Raman que más cambiaron debido al proceso de extrusión son las que se encuentran a 476, 940 y 2911 cm⁻¹. Las bandas a 476 y 940 cm⁻¹ se han considerado como las más representativas para la discriminación de almidones de diferentes fuentes (Almeida y col., 2010; Yang y col., 2018). Se han atribuido a deformaciones del anillo de piranosa y a vibraciones provenientes de los enlaces glicosídicos α -1,4, respectivamente (Wiercigroch y col., 2017; Mir y col., 2016). Algunos autores también relacionaron las intensidades de estas bandas con el contenido de amilosa (Almeida y col., 2010). En relación con las intensidades de las bandas a 476 y 940 cm⁻¹ las mezclas crudas pueden ordenarse como M > M-A > M-S > M-Q > M-M, que coincide con su contenido de amilosa reportado de 25-30 %, 22-23 %, 14-19 %, 10-12 % y 6 %, respectivamente (Cervantes-Ramírez y col., 2020; Ramos-Díaz y col., 2019; Irani y col., 2017; Suma y Urooj, 2015; Gerrano y col., 2014). Por otro lado, el aumento de las intensidades de estas bandas luego del proceso de extrusión puede explicarse por la organización molecular más relajada, promovida por la amorfización y dextrinización del almidón, o debido a la formación de complejos amilosa-lípidos que se sabe ocurren en este proceso (Fan y col., 2012; Almeida y col., 2010). Estos resultados concuerdan con lo discutido para la banda 1010 cm⁻¹ de los espectros FT-IR (Sección 4.1.10) y el análisis de difracción de rayos X (Sección 4.1.5). Paralelamente, la banda a 2911 cm⁻¹ fue la más intensa para todos los sistemas crudos y extrudidos, pero no se modificó luego de la extrusión en ninguna formulación (Figura 26 B), por lo que no puede ser utilizada como un indicador de la transformación térmica del almidón (Almeida y col., 2010). Otras bandas Raman asociadas al almidón se encuentran a 1460 y 1127 cm⁻¹, que se atribuyen a deformaciones -CH₂ y estiramiento C-O, respectivamente (Yang y col., 2018; Wiercigroch y col., 2017; Mir y col., 2016). Luego de la extrusión, la banda de 1460 cm⁻¹, atribuida a una reducción de la fase cristalina del almidón debido al tratamiento (Fan y col., 2012), disminuyó considerablemente en todas las formulaciones.

Se analizaron dos bandas asociadas a carotenoides a 1522 y 1157 cm⁻¹, siendo M-A la mezcla que mostró la mayor intensidad de pico luego de la extrusión, seguido por M. Estas bandas están relacionadas con los modos de estiramientos en fase de C=C y C-C de las cadenas de polienos, respectivamente (Yang y col., 2018). El reemplazo de maíz por harinas de mijo, sorgo y quínoa promueve un efecto de dilución que se reflejó en la disminución de las intensidades de las bandas en las mezclas crudas. Aunque se sabe que parte de los carotenoides se pierde durante la extrusión (Cueto y col., 2017), las bandas asociadas a carotenoides en FT-Raman aparecieron sólo después del proceso. Dado que el β -caroteno, la luteína y la zeaxantina se encuentran principalmente en la cáscara de los granos (Cueto y col., 2017), la disruptión de la estructura de la pared celular por la presión y el calentamiento favoreció su liberación y potencial disponibilidad (Ortak y col., 2017). Al mismo tiempo, la desnaturalización de las proteínas durante la extrusión (discutido en la Sección 4.1.10) también pudo promover el desarreglo de los complejos formados entre las proteínas y los carotenoides, favoreciendo su liberación y determinación (Ortak y col., 2017) y también su degradación.

La banda a 1754 cm⁻¹, que se relaciona con el estiramiento del grupo éster C=O de los triglicéridos (Yang y col., 2018), se pudo observar claramente en las mezclas crudas (Figura 26 A), particularmente en los sistemas M-Q, M-A y M-S, que presentaron los mayores contenidos de lípidos (Tabla 1). Sin embargo, la banda no pudo detectarse luego de extrusión (Figura 26 B), lo cual puede atribuirse a la formación de los complejos amilosa-lípido que hizo que disminuyera la intensidad de la banda, como se discutió para los resultados de espectroscopía FT-IR.

El análisis de las bandas FT-Raman permitió evaluar las modificaciones de los carotenoides, lo cual no pudo hacerse mediante espectroscopía FT-IR. Por el contrario, los lípidos se distinguieron mejor por FT-IR en las muestras extrudidas. Esto sugiere que es

conveniente utilizar ambas técnicas de manera complementaria para evaluar la composición de las mezclas y sus modificaciones por el proceso.

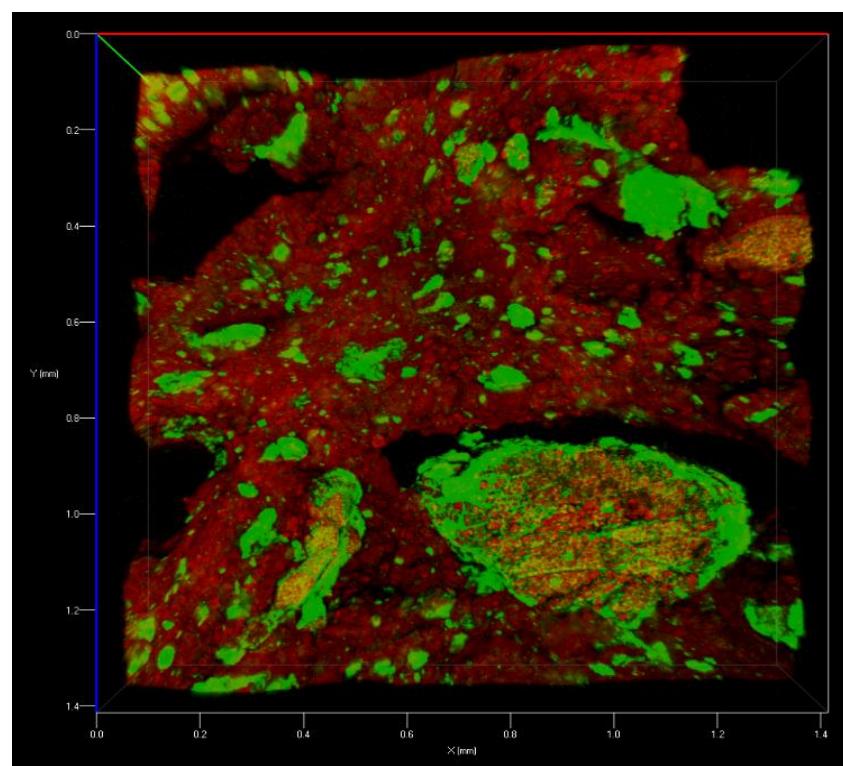
Finalmente, Ildiz y col. (2019) asociaron las bandas de la región 1600-1690 cm^{-1} a las vibraciones del estiramiento C=O del grupo amida I, y particularmente a conformaciones de α -hélice para señales a 1655-1662 cm^{-1} . Como todas las muestras presentaron señales de pico a 1658 cm^{-1} , se puede afirmar que las proteínas se encontraban en conformación α -hélice, coincidente con los resultados de FT-IR. Por otro lado, y como ya se discutió, los cambios conformacionales promovidos por el calentamiento llevan a la disminución de estas bandas en las muestras extrudidas (Figura 26 B), indicando también reducción de conformaciones α -hélice. Algunas de estas modificaciones estructurales de las proteínas pueden incluir la exposición de grupos reactivos que se encontraban ocultos, y la promoción de estructuras desordenadas (Wang y col., 2017). Estos cambios deben considerarse porque pueden relacionarse con un aumento de la susceptibilidad de las proteínas a interaccionar con otras moléculas, con implicaciones en las propiedades mecánicas y visuales de los productos (Wang y col., 2017).

4.1.12 Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)

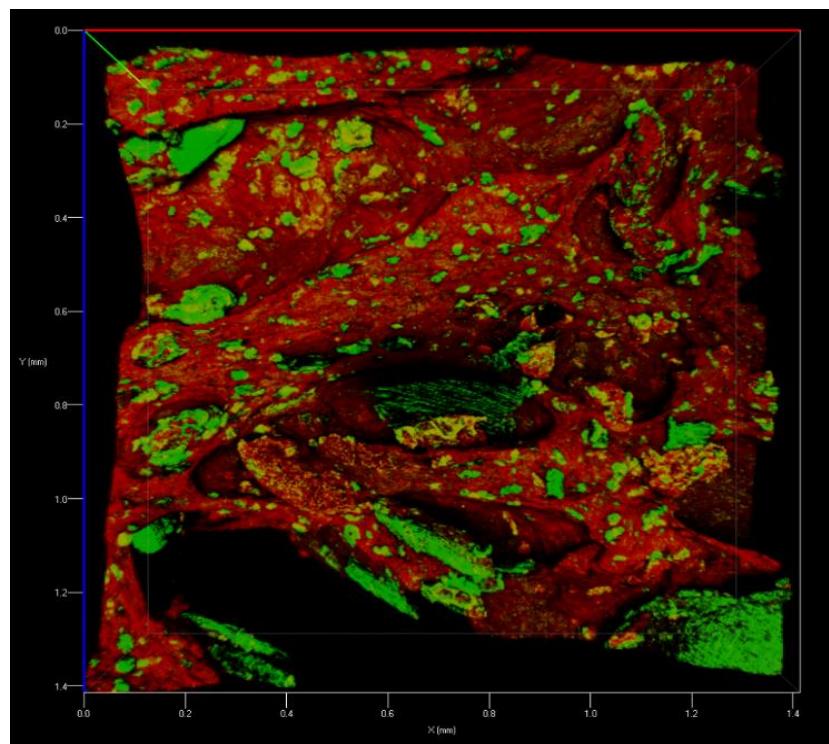
Las imágenes de microscopía de barrido láser confocal de los sistemas extrudidos se presentan en la Figura 27. Debido a los fluorocromos usados, los carbohidratos se muestran en rojo, las proteínas en verde y los lípidos en marrón. Los lípidos superpuestos con las proteínas o carbohidratos se presentan en amarillo (Moisio y col., 2015). Los carbohidratos son los componentes predominantes en todas las muestras, en concordancia con los resultados de la Tabla 1 (Sección 4.1.1). Además, se confirma la gelatinización completa de los gránulos de

almidón, ya que no se observan gránulos intactos o nativos, coincidente con los análisis de DSC (Sección 4.1.7). Las elevadas temperaturas, presión y cizallamiento aplicados en presencia de agua favorecieron la fusión de los gránulos y la formación de vapor de agua que se libera rápidamente a la salida del extrusor. Esto genera las microestructuras altamente porosas que prevalecen en la mayoría de los sistemas estudiados (Jafari y col., 2017).

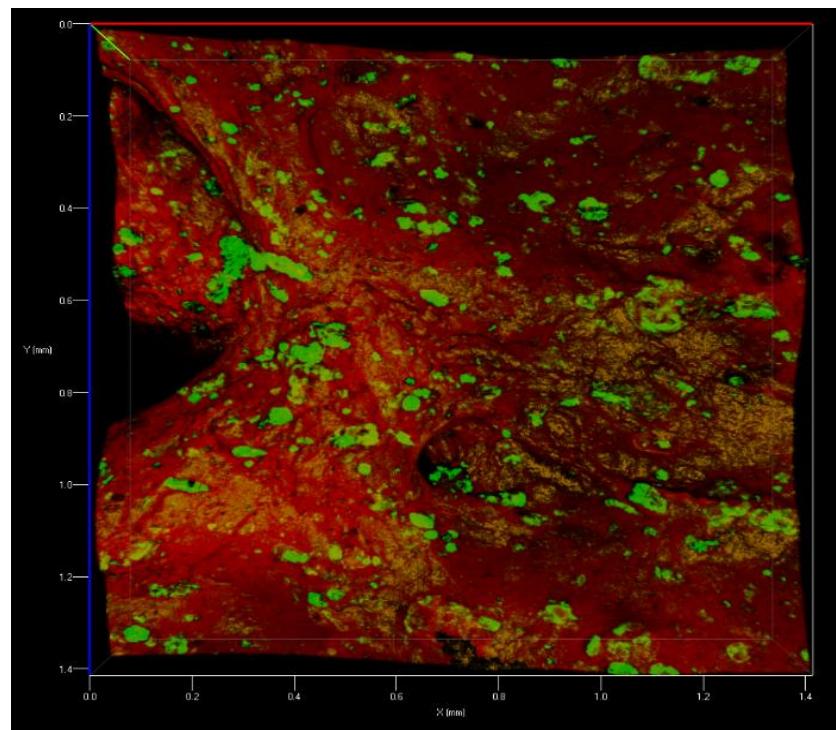
A) M



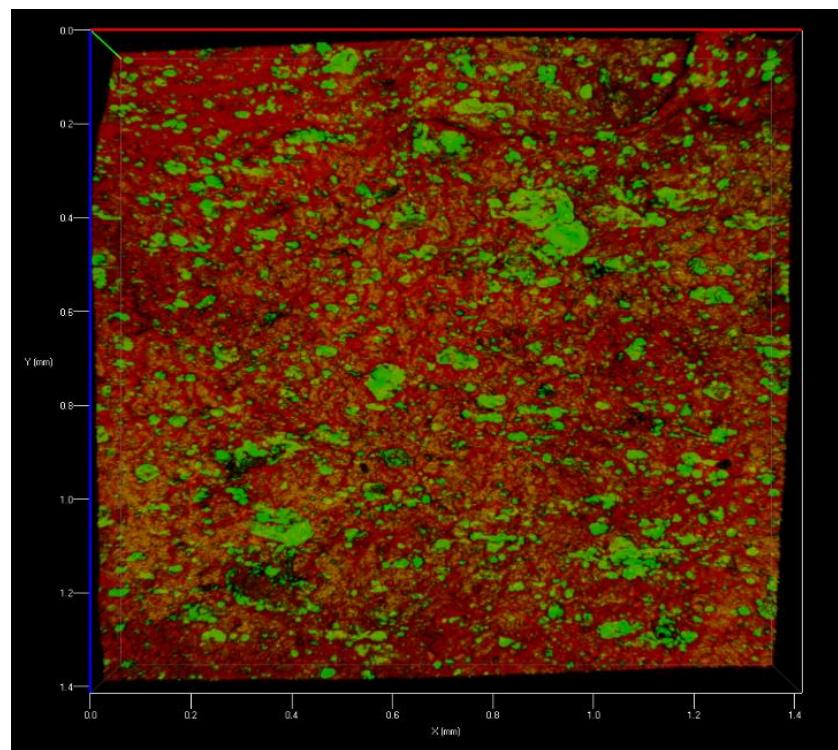
B) M-M



C) M-S



D) M-Q



E) M-A

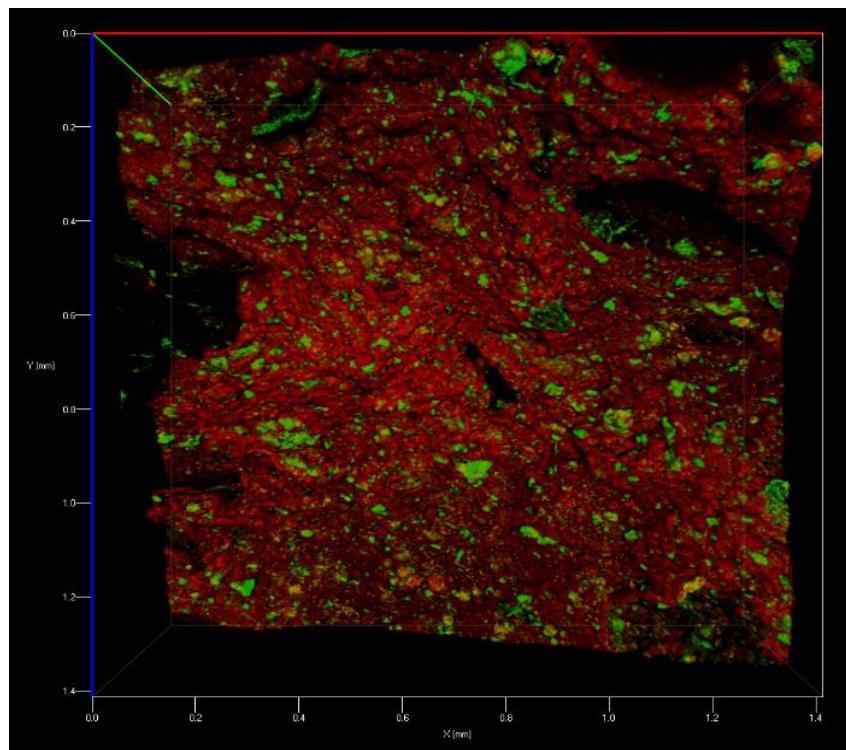


Figura 27: Imágenes de microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de los sistemas extrudidos. **A)** M = control; **B)** M-M = maíz + mijo; **C)** M-S = maíz + sorgo; **D)** M-Q = maíz + quínoa; **E)** M-A = maíz + alpiste. Los carbohidratos se muestran en rojo, las proteínas en verde y los lípidos en marrón. Los lípidos superpuestos con carbohidratos o proteínas se muestran en amarillo.

En las muestras control (Figura 27 A) se distinguen grandes agregados proteicos. Estos se encuentran dispersos e incluidos en una red roja continua de almidón (Jebalia y col., 2019; Ramos Díaz y col., 2019). Chanvrier y col. (2005) afirmaron que, en harina de maíz extrudida, los agregados proteicos derivan de la ruptura, desnaturalización y formación de puentes disulfuro, así como también del entrecruzamiento de cuerpos proteicos causado por las elevadas temperaturas y energías mecánicas. Además, Jebalia y col. (2019) y Ramos Díaz y col. (2019) sugirieron que la distribución de las proteínas y sus interacciones con el almidón para formar matrices de proteínas-almidón definen las propiedades mecánicas de productos a base de maíz. Por lo tanto, la presencia de aglomerados proteicos aislados en las muestras control influiría negativamente en sus propiedades organolépticas, resultando en productos frágiles, con reducida crocancia y crujencia (Jebalia y col, 2019; Ramos Díaz y col., 2019).

En la Figura 27 B se encuentran los extrudidos que contienen un 25 % de harina de mijo. En estas muestras se observa una menor proporción de agregados proteicos en comparación con el control. Se distingue la red formada por los gránulos de almidón gelatinizados, donde se visualizan grandes poros (Rolandelli y col., 2020). Se destacan las manchas amarillas, indicando la superposición de los lípidos con las proteínas y/o los carbohidratos, lo cual se pudo haber favorecido por la desnaturalización proteica y por la formación de los complejos amilosa-lípidos discutidos en la Sección 4.1.5. Por otro lado, la presencia de los lípidos en cercanía a los poros puede implicar una mayor susceptibilidad de estos sistemas a los procesos oxidativos.

Con la adición de la harina de sorgo (Figura 27 C), los agregados proteicos fueron menores que en los sistemas anteriores, pero también se visualizan algunos poros. La presencia predominante de las manchas marrones, asociadas a los lípidos, coincide con el mayor contenido lipídico de estos sistemas (Tabla 1). Sin embargo, no se visualizan superposiciones de lípidos con proteínas o carbohidratos. Los altos contenidos grasos y su distribución predominante en cercanía a los poros o a nivel superficial, hacen a estos productos particularmente susceptibles a la oxidación, como en el caso de M-M (Moisio y col., 2015).

Las muestras M-Q resultaron más regulares y homogéneas que el resto (Figura 27 D). No se observaron poros, los agregados proteicos fueron más pequeños y con una distribución más uniforme que en los demás sistemas. En este sentido, luego del proceso de extrusión se formó una matriz con microestructura no porosa por una distribución regular de almidón, proteínas y lípidos.

Finalmente, con la adición de harina de alpiste (Figura 27 E) se observa una estructura frágil e irregular, con poros de diferentes tamaños, pero en general más pequeños que en M, M-M y M-S. La red cavernosa formada presentó una distribución homogénea de carbohidratos y lípidos, con pequeños agregados proteicos. En concordancia con Jebalia y col. (2019) y Chanvrier y col (2005), no se observó una orientación particular de los agregados proteicos en todos los sistemas, indicando que se encuentran distribuidos de manera aleatoria.

4.1.13 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

La identificación y cuantificación de C, O y N en la superficie externa, sección media y centro de los diferentes extrudidos se presentan en la Tabla 11. Todas las muestras presentaron C como elemento principal, seguido por O y, finalmente, N.

Tabla 11: Composición relativa elemental de la superficie externa, sección media y centro de los sistemas extrudidos, determinada por XPS*

Muestra	Elemento atómico	Concentración atómica relativa (%)		
		Superficie externa	Sección media	Centro
M	C	79,5 ± 0,3 ^{b,B}	79,1 ± 0,5 ^{b,B}	77,6 ± 0,4 ^{a,B}
	O	17,0 ± 0,2 ^{a,A}	18,4 ± 0,3 ^{b,A}	19,1 ± 0,2 ^{b,B}
	N	1,8 ± 0,2 ^{a,BC}	1,9 ± 0,2 ^{a,B}	1,9 ± 0,2 ^{a,C}
M-M	C	79,6 ± 0,4 ^{a,B}	79,1 ± 0,3 ^{a,B}	80,2 ± 0,6 ^{a,C}
	O	17,9 ± 0,3 ^{a,B}	19,0 ± 0,3 ^{b,A}	18,6 ± 0,3 ^{ab,B}
	N	1,2 ± 0,2 ^{a,A}	1,2 ± 0,1 ^{a,A}	0,8 ± 0,1 ^{a,A}
M-S	C	80,7 ± 0,4 ^{b,C}	78,9 ± 0,4 ^{a,B}	81,0 ± 0,4 ^{b,C}
	O	16,4 ± 0,4 ^{a,A}	18,2 ± 0,3 ^{b,A}	16,2 ± 0,4 ^{a,A}
	N	1,6 ± 0,3 ^{a,ABC}	1,3 ± 0,2 ^{a,A}	1,6 ± 0,1 ^{a,BC}
M-Q	C	78,0 ± 0,3 ^{b,A}	76,5 ± 0,4 ^{a,A}	76,3 ± 0,2 ^{a,A}
	O	19,3 ± 0,2 ^{a,C}	20,8 ± 0,3 ^{b,B}	21,3 ± 0,2 ^{b,D}
	N	1,4 ± 0,1 ^{a,AB}	1,4 ± 0,1 ^{a,AB}	1,1 ± 0,1 ^{a,AB}
M-A	C	78,9 ± 0,4 ^{a,B}	78,8 ± 0,4 ^{a,B}	78,0 ± 0,3 ^{a,B}
	O	17,9 ± 0,3 ^{a,B}	18,6 ± 0,3 ^{a,A}	19,5 ± 0,3 ^{b,C}
	N	2,0 ± 0,3 ^{b,C}	1,6 ± 0,3 ^{ab,AB}	1,4 ± 0,2 ^{a,BC}

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

*Los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar ($n = 3$). Los valores seguidos por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: letras en minúscula indican diferencias entre las secciones de la misma muestra, mientras que letras en mayúscula representan diferencias entre la distribución elemental entre muestras para cada sección (valor- $p \leq 0,05$).

Para el control, se encontraron pequeñas diferencias en la distribución de C, siendo menos concentrado en el centro, mientras que la tendencia opuesta se observó para O. La

distribución de N, atribuida a proteínas (Porras-Saavedra y col., 2015), fue similar en las tres secciones, indicando que las proteínas se distribuyeron aleatoriamente, lo cual está de acuerdo con lo discutido en las imágenes de microscopía de barrido láser confocal (Figura 27 A, Sección 4.1.12).

Por su parte, no se encontraron diferencias en la distribución de C o N para las muestras M-M; pero para O, se observó mayor concentración en las secciones media y el centro, aunque la diferencia fue pequeña. La relación C/O puede relacionarse con los contenidos de carbohidratos y/o lípidos (Nawaz y col., 2016). Por lo tanto, las mayores concentraciones de O en estas secciones puede indicar la distribución preferencial de los lípidos en la superficie interna de los poros, tal como se observó en las imágenes de CLSM (Figura 27 B, Sección 4.1.12), confirmando la mayor susceptibilidad de M-M a la oxidación lipídica.

Para el caso de M-S, la superficie externa y el centro presentaron la mayor concentración de C, mientras que lo opuesto se observó en la distribución de O. Estos patrones de distribución pueden relacionarse con la presencia homogénea de carbohidratos y lípidos luego de la extrusión discutida en la Sección 4.1.12. De manera similar, no se encontraron diferencias en la concentración de N entre las secciones, confirmando la distribución aleatoria de las proteínas en las muestras.

En los sistemas M-Q, C se presentó principalmente en la superficie externa, mientras que, en la sección media o el centro, O fue predominante. Como en el caso de M-S, no se encontraron diferencias en la distribución de N (y, por lo tanto, de proteínas) entre las secciones. Es interesante destacar que la concentración atómica relativa de N fue la menor en comparación con el resto de las muestras, a pesar de tener altos contenidos proteicos (Tabla 1, Sección 4.1.1). Porras-Saavedra y col. (2015) también encontraron diferencias en el contenido proteico durante la cuantificación por el método de Kjeldahl y XPS.

Finalmente, para M-A, C se distribuyó equitativamente entre las secciones, pero O se presentó predominantemente en el centro, mientras que N lo estuvo en la superficie externa. A diferencia de M-Q, la mayor concentración relativa de N en los sistemas M-A se puede relacionar con su mayor contenido proteico (Tabla 1, Sección 4.1.1). Esta mayor concentración proteica pudo también ser la razón de la microestructura frágil e irregular descrita en las imágenes de CLSM (Figura 27 E, Sección 4.1.12). A su vez, la distribución predominante a nivel superficial de las proteínas favorece la elasticidad e incrementa los tiempos de mojado cuando se sumergen en agua (Porras-Saavedra y col., 2015). Esto puede representar una ventaja, ya que ambas propiedades resultan favorables durante el consumo de las muestras, particularmente en la masticación, aportando percepciones sensoriales agradables.

4.2 Sistemas laminados

4.2.1 Optimización del proceso de obtención mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

4.2.1.1 Modelado matemático de las variables respuesta

En la Tabla 12 se muestra la combinación de las variables independientes analizadas: adición de agua cada 15 g de harina de maíz (X_1), temperatura de tostado (X_2) y tiempo de tostado (X_3), junto con los resultados de las variables dependientes: parámetros cromáticos L^* (Y_1), a^* (Y_2), b^* (Y_3), contenido final de agua (% b.s.) (Y_4) y concentración de HMF (ppm) (Y_5) en las condiciones dadas, analizadas por Metodología de Superficie de Respuesta. El análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de regresión se encuentran en la Tabla 13. Los resultados muestran que todos los resultados experimentales se ajustaron de manera correcta a un modelo polinómico de segundo orden (Ecuación 8). Además, los valores- p y F (Tabla 13) indican que la significancia del modelo fue mayor al 95 % de nivel de confianza. Simultáneamente, la falta de ajuste, los errores puros y los valores de R^2 muestran una buena descripción de los resultados a partir del modelo (Favre y col., 2020; Gümüşay y col., 2019).

Tabla 12: Valores de variables independientes codificadas y símbolos de Metodología de Superficie de Respuesta para la optimización del proceso de producción de *snacks* de maíz, basada en los valores de los parámetros del espacio de color CIELAB (L^* , a^* y b^*), contenido de agua y formación de HMF, mediante diseño de Box-Behnken*

Corrida	Parámetros de producción del proceso			Variables respuesta				
	Variables codificadas y decodificadas			Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
	X_1 Adición de agua (g)	X_2 Tiempo de tostado (min)	X_3 Temperatura de tostado (°C)	L^*	a^*	b^*	Contenido de agua (%, b.s.)	HMF (ppm)
1	(0) 9	(-1) 7	(-1) 200	72,3 ± 0,2	19,4 ± 0,2	70,57 ± 0,04	9 ± 1	3 ± 1
2	(1) 12	(0) 9,5	(1) 270	60,9 ± 0,4	23,8 ± 0,2	60,5 ± 0,7	4 ± 1	64 ± 3
3	(-1) 6	(1) 12	(0) 235	24,86 ± 0,04	15,3 ± 0,2	15,2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	162 ± 5
4	(-1) 6	(0) 9,5	(-1) 200	68,1 ± 0,2	24,91 ± 0,05	70,5 ± 0,3	6,1 ± 0,5	10,3 ± 0,6
5	(1) 12	(-1) 7	(0) 235	71,2 ± 0,2	23,9 ± 0,2	72,8 ± 0,3	3 ± 1	8,6 ± 0,7
6	(1) 12	(1) 12	(0) 235	54,0 ± 1,8	27,8 ± 0,5	55,9 ± 0,8	0,8 ± 0,2	57 ± 5
7	(-1) 6	(-1) 7	(0) 235	69,1 ± 0,2	26,41 ± 0,01	72,11 ± 0,08	2,0 ± 0,3	21 ± 3
8	(0) 9	(0) 9,5	(0) 235	68,9 ± 1,5	31,3 ± 0,9	62,8 ± 0,5	2,1 ± 0,4	28 ± 4
9	(0) 9	(0) 9,5	(0) 235	69 ± 1	32,1 ± 0,1	62,6 ± 0,7	1,9 ± 0,1	27,8 ± 0,6
10	(0) 9	(1) 12	(-1) 200	71,6 ± 0,5	25,63 ± 0,02	67,0 ± 0,3	4,8 ± 0,6	10,14 ± 0,01
11	(1) 12	(0) 9,5	(-1) 200	77,9 ± 0,2	18,6 ± 0,1	56,9 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,9 ± 0,7
12	(0) 9	(-1) 7	(1) 270	70,2 ± 1,0	23,5 ± 0,5	69,0 ± 0,8	1,9 ± 0,1	32 ± 3
13	(0) 9	(0) 9,5	(0) 235	67,6 ± 0,9	31,4 ± 0,1	63,7 ± 0,9	2,3 ± 0,5	28 ± 4
14	(0) 9	(1) 12	(1) 270	19 ± 1	9,4 ± 0,7	6,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3	212 ± 3
15	(-1) 6	(0) 9,5	(1) 270	30,4 ± 0,4	6,76 ± 0,03	7,6 ± 0,2	0,44 ± 0,02	178 ± 2

* Todos los resultados se expresan como promedio ± desvío estándar ($n = 3$).

Tabla 13: Análisis de varianza (ANOVA) y ajuste de parámetros del modelo cuadrático de las variables respuesta para el proceso de producción de *snacks* de maíz.-

Fuente		Modelo	Falta de ajuste	Errores puros
<i>L*</i> ($R^2 = 0,9956$)	SC	5022,43	21,07	1,03
	GL	9	3	2
	CM	558,05	7,02	0,5134
	Valor- <i>F</i>	126,26	13,68	
	Valor- <i>p</i>	< 0,0001	0,0689	
<i>a*</i> ($R^2 = 0,9993$)	SC	808,15	0,1984	0,3885
	GL	9	3	2
	CM	89,79	0,0661	0,1942
	Valor- <i>F</i>	765,06	0,3404	
	Valor- <i>p</i>	< 0,0001	0,8035	
<i>b*</i> ($R^2 = 0,9988$)	SC	7871,54	8,53	0,6521
	GL	9	3	2
	CM	874,62	2,84	0,3260
	Valor- <i>F</i>	476,21	8,72	
	Valor- <i>p</i>	< 0,0001	0,1046	
Contenido de agua (%, b.s.) ($R^2 = 0,9531$)	SC	70,64	3,41	0,0672
	GL	6	6	2
	CM	11,77	0,5678	0,0336
	Valor- <i>F</i>	27,11	16,90	
	Valor- <i>p</i>	< 0,0001	0,0569	
HMF (ppm) ($R^2 = 0,9999$)	SC	66736,98	3,86	0,5414
	GL	9	3	2
	CM	7415,22	1,29	0,2707
	Valor- <i>F</i>	8431,23	4,75	
	Valor- <i>p</i>	< 0,0001	0,1789	

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio. Nivel de significancia = valor-*p* $\leq 0,05$.

4.2.1.2 Modelado matemático para los parámetros de color CIELAB

Las siguientes ecuaciones codificadas se utilizaron para describir los efectos de las variables independientes sobre los valores de *L**, *a** y *b** de los *snacks* de maíz (Ecuaciones 21, 22 y 23, respectivamente):

$$\text{Ecuación 21: } L^* = 68,47 + 8,94X_1 - 14,19X_2 - 13,71X_3 + 6,78X_1X_2 + 5,18X_1X_3 - 12,67X_2X_3 - 6,30X_1^2 - 7,38X_2^2 - 2,86X_3^2$$

$$\text{Ecuación 22: } a^* = 31,60 + 2,58X_1 - 1,90X_2 - 3,14X_3 + 3,76X_1X_2 + 5,85X_1X_3 - 5,08X_2X_3 - 4,62X_1^2 - 3,65X_2^2 - 8,46X_3^2$$

$$\text{Ecuación 23: } b^* = 63,04 + 10,08X_1 - 17,56X_2 - 15,22X_3 + 10,01X_1X_2 + 16,61X_1X_3 - 14,85X_2X_3 - 6,67X_1^2 - 2,40X_2^2 - 7,50X_3^2$$

donde X_1 es la adición de agua (g/15 g de harina de maíz), X_2 es el tiempo de tostado (min) y X_3 es la temperatura de tostado (°C) (Tabla 12). Los coeficientes de regresión (R^2) fueron 0,9956, 0,9993 y 0,9988 para L^* , a^* y b^* , respectivamente (Tabla 13), indicando un buen ajuste de los datos experimentales (Gümüşay y col., 2019). Todos los términos de las Ecuaciones 21-23 fueron significativos para el modelado de los parámetros de color.

De acuerdo con las ecuaciones 21, 22 y 23, a mayores niveles de agua (X_1), los *snacks* mantienen una coloración amarillenta clara, indicando un incipiente desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático, mientras que mayores tiempos (X_2) o temperaturas de tostado (X_3), favorecen el pardeamiento y oscurecimiento de los productos. Las modificaciones de los parámetros cromáticos pueden relacionarse directamente con el desarrollo de la reacción de Maillard (Mesías y col., 2019; Cueto y col., 2017; Nguyen y col., 2016). Además, el pardeamiento no enzimático se encuentra favorecido por la dextrinización del almidón, que ocurre a temperaturas mayores a 200 °C en sistemas a base de cereales (Singh y col., 2000). Estas reacciones se promueven por la combinación de largos tiempos y temperaturas de tostado

(X_2X_3) y el consecuente pardeamiento se visualizó en la reducción de los valores de los parámetros de reflectancia (Cueto y col., 2017; Farroni y Buera, 2012; Sumithra y Bhattacharya, 2008).

Los efectos de las combinaciones de las condiciones de proceso en los parámetros cromáticos se reflejan en la Figura 28 (A-I). En estos gráficos 3D se predice la respuesta utilizando dos variables independientes mientras que la tercera se mantiene en el valor central del rango utilizado. La luminosidad (L^*) disminuyó considerablemente con el aumento de los tiempos de tostado (X_2), particularmente a bajos niveles de agua añadida (X_1), a los cuales los valores de L^* de alrededor de 70 para las muestras crudas (indicando un color claro) disminuyeron al rango de 25-30 (Figura 28 A). Por el contrario, los resultados de L^* se mantuvieron altos (60 y más) a cortos o medianos tiempos de tostado (7-9 min), especialmente con niveles crecientes de agua añadida. Observando la pendiente de la superficie de respuesta de la Figura 28 A, se puede afirmar que la adición de agua (X_1) tuvo un efecto predominante en comparación con el tiempo de tostado (X_2) sobre los valores de L^* en los rangos estudiados, en concordancia con la Ecuación 21: la luminosidad aumentó con niveles crecientes de agua inicial añadida. Además, las muestras se oscurecieron a medida que aumentó la temperatura de tostado (X_3), especialmente a bajos niveles de agua añadida (Figura 28 B). Los efectos combinados del tiempo y la temperatura de tostado (X_2 y X_3 , respectivamente) influyeron negativamente en los resultados de luminosidad (Figura 28 C). Observando detenidamente el comportamiento de los atributos cromáticos a lo largo del eje X_1 , se puede distinguir un máximo, especialmente a bajos tiempos o temperaturas de procesado, lo cual es más evidente en la variable b^* (Figuras 28 D-F). A muy bajos niveles de agua añadida, a los cuales el movimiento molecular se encuentra altamente reducido, el desarrollo de las reacciones de pardeamiento no enzimático se encuentra muy limitado. A partir de un dado punto, con niveles

crecientes de agua la velocidad de las reacciones de pardeamiento aumenta debido a que la movilización de los reactivos se encuentra favorecida (Acevedo, Schebor y Buera, 2008). Por el contrario, el agua, como producto de la reacción, retrasa su progreso (Agudelo-Laverde y col., 2013) y, por lo tanto, altos niveles de agua añadida producen una reducción del pardeamiento no enzimático.

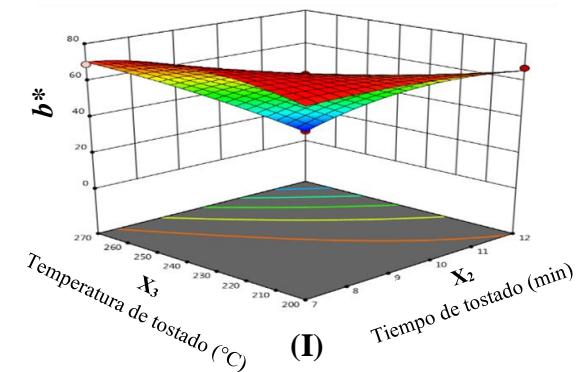
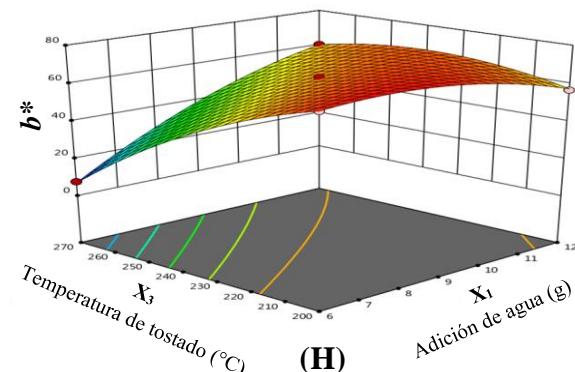
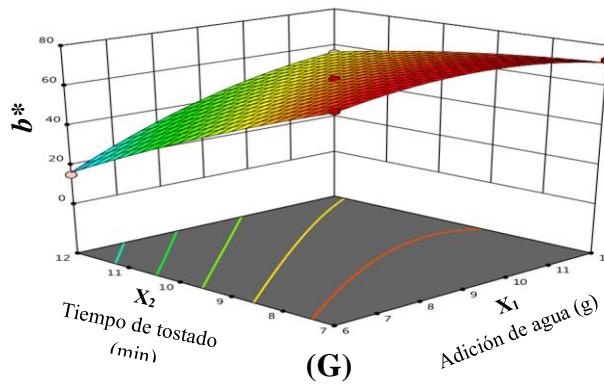
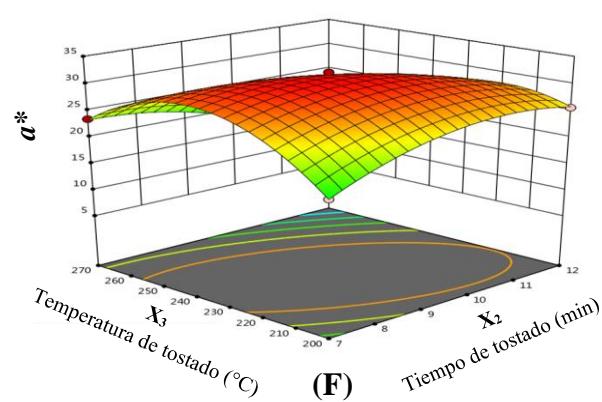
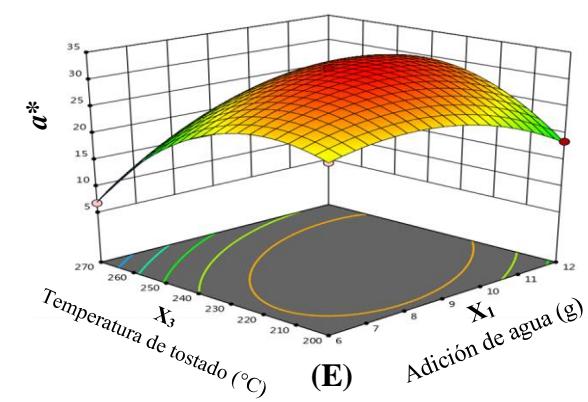
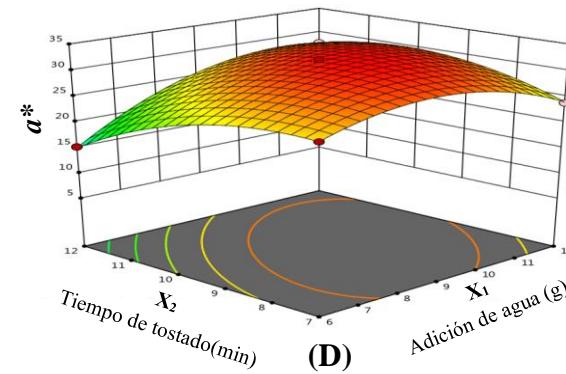
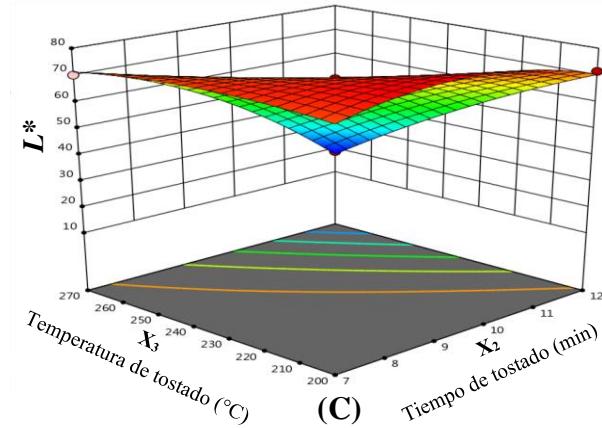
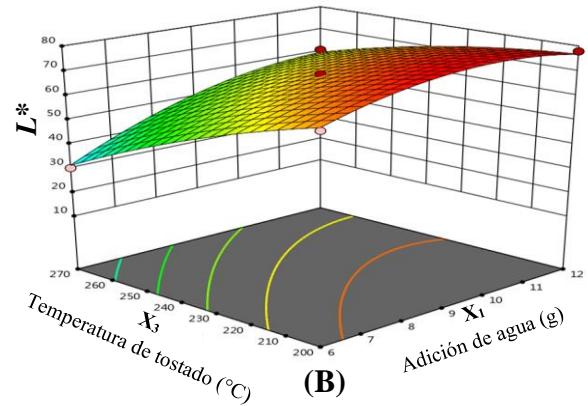
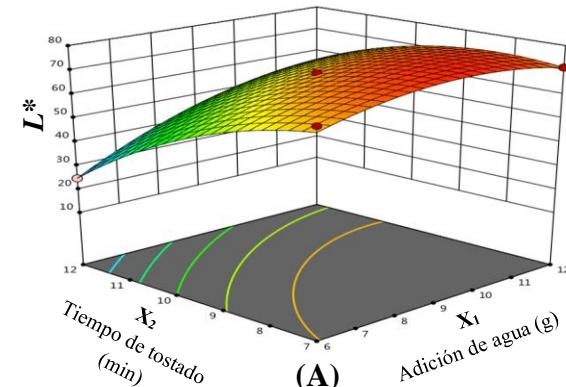


Figura 28: Gráficos de superficie de respuesta de los valores de los parámetros del espacio de color CIELAB L^* (**A-C**), a^* (**D-F**) y b^* (**G-I**) de *snacks* de maíz en función de la combinación de variables independientes. (**A**), (**D**) y (**G**) combinan adición de agua (g) y tiempo de tostado (min) a 235 °C como temperatura de tostado; (**B**), (**E**) y (**H**) combinan adición de agua (g) y temperatura de tostado (°C) con 9,5 min como tiempo de tostado; (**C**), (**F**) y (**I**) combinan tiempo de tostado (min) y temperatura de tostado (°C) con 9 g de agua añadida.

Es importante destacar que mientras los valores de L^* disminuyen progresivamente con el aumento del tiempo o la temperatura de tostado, las variables cromáticas a^* (representando coloraciones rojizas) y b^* (asociada a coloraciones amarillentas) muestran valores máximos en los niveles medios de los rangos de temperatura y cantidad de agua añadida (Figuras 28 D-F y G-I, respectivamente). De acuerdo con lo demostrado por Pepa y col. (2020), durante las reacciones de pardeamiento no enzimático las muestras con mayor luminosidad se encontraron cercanas al punto acromático blanco, pero también los componentes cromáticos de las muestras más oscuras son muy bajos, ya que se acercan al punto acromático negro. Como se mencionó antes, dependiendo el contenido, el agua puede favorecer o inhibir el desarrollo de las reacciones de pardeamiento no enzimático (Gómez-Narváez y col., 2019; Van Der Fels-Klerx y col., 2014; Farroni y Buera, 2012; Farroni y col., 2008). Este doble efecto de los niveles del agua inicial añadida fue diferente para los componentes cromáticos a^* y b^* (Figuras 28 D-E y G-H, respectivamente), en comparación con los valores de L^* (Figuras 28 A-B). Por un lado, la luminosidad disminuye de manera continua con el progreso de la reacción, mientras que los componentes cromáticos muestran valores máximos. En otras palabras, mientras los valores de L^* disminuyen con el aumento de la temperatura (Figuras 28 B-C), las variables a^* y b^* muestran valores máximos a valores de temperatura intermedios (Figuras 28 E-F y H-I, respectivamente), lo cual se relaciona con

las interacciones complejas de las variables contenido de agua y temperatura, que se discutirá en la Sección 4.2.1.6.

4.2.1.3 Modelado matemático para el contenido final de agua

La siguiente ecuación, conteniendo sólo los términos significativos en forma codificada, se utilizó para analizar los efectos de las variables independientes en el contenido final de agua (%, b.s.) de los *snacks* de maíz (Ecuación 24):

$$\begin{aligned} \text{Ecuación 24: } & \text{Contenido de agua (%, b. s.)} = 1,80 + 0,2862X_1 - \\ & 0,9663X_2 - 2,08X_3 + 1,19X_1X_3 - 1,04X_2X_3 + 2,19X_3^2 \end{aligned}$$

El coeficiente de regresión (R^2) del modelo fue 0,9531 (Tabla 13) y los términos X_1X_2 , X_1^2 y X_2^2 no fueron significativos para predecir el contenido final de agua en los *snacks*.

Las modificaciones del contenido final de agua debido a la combinación de las condiciones de procesamiento se muestran en la Figura 29. De acuerdo con la Ecuación 24, el contenido final de agua de los productos obtenidos fue menor a menores niveles de agua añadidos y a mayores temperaturas de tostado (Figuras 29 A-B). La pendiente negativa en el eje de temperatura fue mayor que la del eje tiempo, indicando que, en los rangos estudiados, la primera tuvo efectos predominantes por sobre el tiempo en la reducción del contenido final de agua (Figura 29 A). El aumento de la temperatura de tratamiento incrementó la fuerza impulsora para la evaporación de agua, lo cual se evidenció con la rápida caída de la pendiente de las superficies de respuesta en el eje X_3 .

de las Figuras 29 A y B. A medida que la temperatura alcanzaba los 270 °C el contenido de agua fue menos dependiente del tiempo de tostado (Figura 29 A), indicando que toda el agua que podía evaporarse se perdió en menos de 7 minutos (Nguyen y col., 2017; Van Der Fels-Klerx y col., 2014). Con la exposición de las muestras a elevadas temperaturas durante varios minutos, el pardeamiento estuvo favorecido y los valores de L^* , a^* y b^* fueron disminuyendo, según lo discutido en la sección anterior. Por otro lado, según lo esperado, el contenido de agua final fue mayor a mayores niveles de agua inicial añadida (X_1), incluso a la temperatura más alta de tostado (270 °C) (Figura 29 B). Es decir, llevó más tiempo evaporar el agua presente en la muestra, porque había una mayor cantidad inicial, incluso aunque el aumento de la temperatura de tratamiento acelerara el proceso. Este efecto se reflejó en el término positivo $X_1 X_3$ en la Ecuación 24.

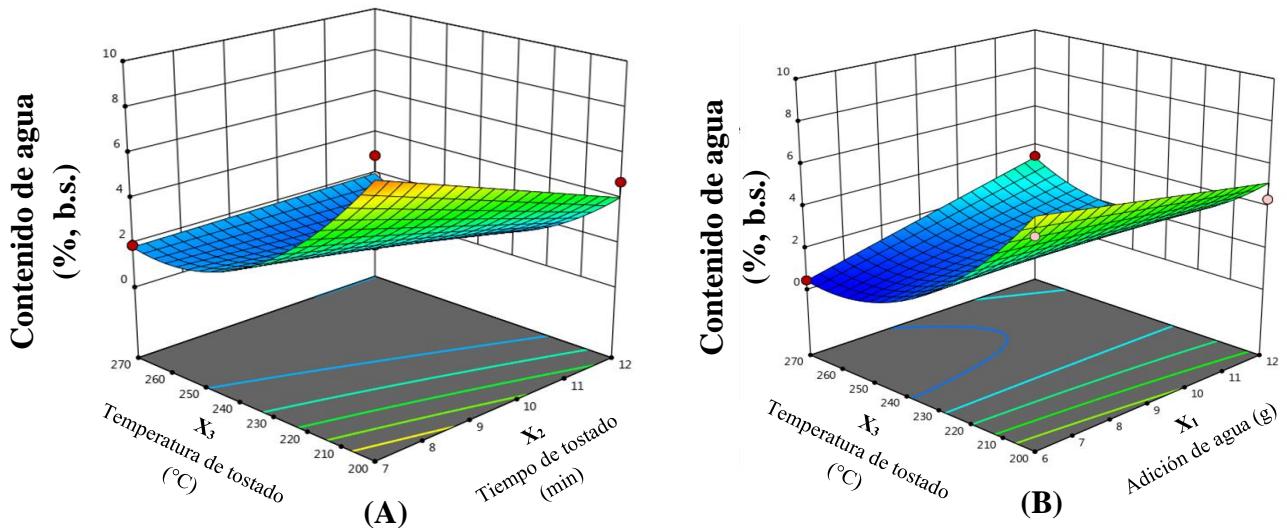


Figura 29: Gráficos de superficie de respuesta de contenidos de agua (% b.s.) de *snacks* de maíz en función de la combinación de variables independientes: (A) tiempo de tostado (min) y temperatura de tostado (°C) con 9 g de agua añadida y (B) temperatura de tostado (°C) y adición de agua (g) con 9,5 min de tiempo de tostado.

4.2.1.4 Modelado matemático para la formación de HMF

La siguiente ecuación codificada describe los efectos de las variables independientes en la formación de HMF (ppm) (Ecuación 25):

$$\text{Ecuación 25: } HMF \text{ (ppm)} = 27,27 - 29,81X_1 + 47,01X_2 + 57,29X_3 - 23,17X_1X_2 - 27,01X_1X_3 + 43,19X_2X_3 + 17,27X_1^2 + 17,73X_2^2 + 19,40X_3^2$$

El coeficiente de regresión obtenido (R^2) fue 0,9999 (Tabla 13) y todos los términos fueron significativos. El término X_1 y las interacciones X_1X_2 y X_1X_3 tuvieron efectos negativos, mientras que X_2 , X_3 , la interacción X_2X_3 y los términos cuadráticos X_1^2 , X_2^2 y X_3^2 promovieron la formación de HMF en los *snacks*.

Los efectos combinados de las condiciones de procesamiento en el desarrollo de HMF se pueden visualizar en la Figura 30. El aumento del tiempo o de la temperatura de tostado produjeron un aumento del contenido de HMF. Este aumento fue menos marcado con niveles crecientes de cantidad de agua inicial añadida (Figuras 30 A-B). Es importante destacar que la formación de HMF ocurre a través de reacciones de deshidratación y, por lo tanto, la presencia de agua como producto de la reacción, enlentece el progreso de la reacción (Agudelo-Laverde y col., 2013). La combinación de elevadas temperaturas y tiempos de tostado a los menores niveles de agua inicial añadidos produjo los mayores contenidos de HMF y, por lo tanto, el mayor daño térmico en los productos. Los efectos del tiempo y la temperatura de tostado prevalecieron por encima del nivel de agua inicial, lo cual es particularmente notable en la Figura 30 C. En este

gráfico también se puede observar la fase *lag* de la formación de HMF descrita por Nguyen y col. (2017), Nguyen y col. (2016) y Van Der Fels-Klerx y col. (2014).

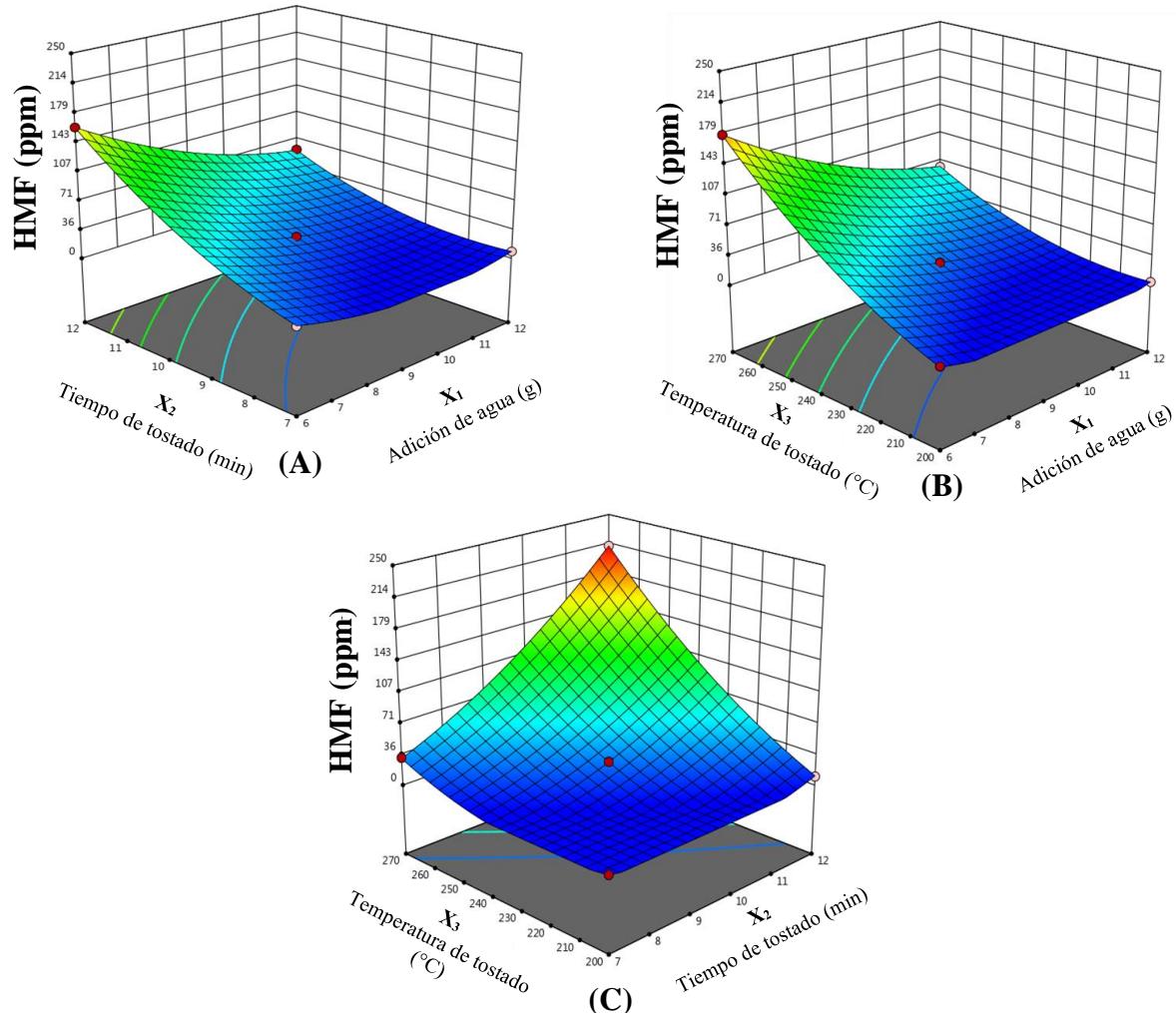


Figura 30: Gráficos de superficie de respuesta de la concentración de HMF (ppm) en los snacks de maíz en función de la combinación de variables independientes: (A) adición de agua (g) y tiempo de tostado (min) a 235 °C como temperatura de tostado; (B) adición de agua (g) y temperatura de tostado (°C) con 9,5 min como tiempo de tostado; (C) tiempo de tostado (min) y temperatura de tostado (°C) con 9 g de agua añadida.

Teniendo en cuenta que la formación de HMF ocurre a través de etapas de deshidratación, esta fase *lag* puede explicarse por la necesidad de eliminar ciertas cantidades de agua durante la formación de HMF. Además, la eliminación de agua y la

continua exposición de las muestras a elevadas temperaturas durante varios minutos favorece la dextrinización del almidón. Como resultado se forman dextrinas y azúcares, que son precursores de HMF, lo cual podría explicar su acumulación exponencial luego de la fase *lag* (Giovanelli y Cappa, 2021; Gökmen y col., 2007; Van Der Fels-Klerx y col., 2014). El punto de máxima formación de HMF (212 ppm) coincide con los menores valores cromáticos ($L^* = 19$; $a^* = 9,4$; $b^* = 6,0$, Tabla 12) y, por lo tanto, con las muestras más oscuras. Estos resultados confirman la relación existente entre los intermediarios de las reacciones de pardeamiento no enzimático y los atributos cromáticos de estas muestras (Gómez-Narváez y col., 2019).

4.2.1.5 Condiciones óptimas, función de deseabilidad y validación del modelo

La función deseabilidad (D) se usó para determinar la combinación de las variables independientes que llevan a minimizar la formación de HMF, pero manteniendo valores adecuados de las variables cromáticas y bajos contenidos de agua finales, según lo descrito en la Sección 3.2.1.5. La combinación que resulta de la adición de 6 g de agua a la harina de maíz previo a la cocción y con una etapa de tostado a 217 °C durante 11 minutos presentó una deseabilidad de $D = 0,705$. En estas condiciones, los productos resultantes deberían presentar como respuestas predichas 3 % de humedad final (b.s.), con valores de los parámetros de CIELAB de $L^* = 53$, $a^* = 24$ y $b^* = 50$ y 65 ppm de HMF. Estos parámetros están en el mismo rango que otros productos a base de cereales de adecuada calidad y aceptabilidad (Ghazouani y col., 2021; Mesías y col., 2019; Cueto y col., 2017; Van Der Fels-Klerx y col., 2014).

Para verificar la utilidad del modelo, los *snacks* de maíz se prepararon en las condiciones óptimas definidas y luego las variables respuesta se midieron. Los resultados

de la comparación entre valores predichos y experimentales, evaluada mediante el coeficiente de variación (CV, Sección 3.2.1.5) se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Comparación entre valores predichos por la función deseabilidad (D) y los valores experimentales de las variables respuestas, junto con el coeficiente de variación (CV) para el proceso de producción de *snacks* de maíz.-

Variable respuesta	Valor predicho	Valor experimental	CV (%)
L^*	53	49,97	6,06
a^*	24	24,66	2,68
b^*	50	47,54	5,17
Contenido de agua (%), b.s.)	3	3,23	7,12
HMF (ppm)	65	65,83	1,26

Los bajos valores de los CV obtenidos confirmaron que la MSR es una herramienta adecuada para optimizar simultáneamente múltiples variables respuesta para la definición de los parámetros del proceso de producción de los *snacks* de maíz (Favre y col., 2020; Gümüşay y col., 2019).

A partir de estos resultados, las formulaciones control (M) y aquellas contenido 25 % de harina de mijo (M-M), sorgo (M-S), quínoa (M-Q) y alpiste (M-A) se prepararon en las condiciones definidas por esta metodología para caracterizaciones posteriores.

4.2.1.6 Discusión general

Las combinaciones de las condiciones de proceso analizadas condujeron a modificaciones de las variables respuesta: mayores niveles de agua inicial añadida

promovieron colores más claros, manifestado por los mayores valores de reflectancia de los parámetros de color CIELAB, mayores contenidos de agua finales y mínima formación de HMF. Por el contrario, largos tiempos y altas temperaturas de tostado produjeron el oscurecimiento de las muestras y mayor formación de HMF, de la mano de menores contenidos acuosos finales. Estas relaciones se grafican en conjunto en la Figura 31. Las condiciones que llevan a bajos valores de L^* y cambios de cromaticidad (valores de a^* y b^*) se relacionaron con etapas específicas del pardeamiento no enzimático. Según Pepa y col. (2020), el pardeamiento ocurre en tres etapas diferentes. Confirmando esto, primero, las muestras se tornaron algo amarillentas (aumentó b^*) durante los primeros minutos de tostado. Luego, el color de las muestras cambió a tonalidades rojas (aumentó a^*) y, finalmente, los parámetros cromáticos disminuyeron y prevaleció el oscurecimiento en este punto, dominado por la disminución de L^* en las muestras muy oscuras. La Figura 31, que grafica la combinación de los tres parámetros CIELAB, muestra que los *snacks* se oscurecen siguiendo una trayectoria espiral, con mayores modificaciones de las variables a^* y b^* en condiciones de tratamiento suaves e intermedios, y con menores valores de L^* y el correspondiente desplazamiento hacia el negro en condiciones de tratamiento más drásticas (Pepa y col., 2020). En la Figura 31 se muestra el desplazamiento de los parámetros de color CIELAB, que cambiaron con las condiciones de proceso en concordancia con el típico comportamiento cromático esperado para el desarrollo de la reacción de Maillard (Pepa y col., 2020; Cueto y col., 2015; Farroni y Buera, 2012).

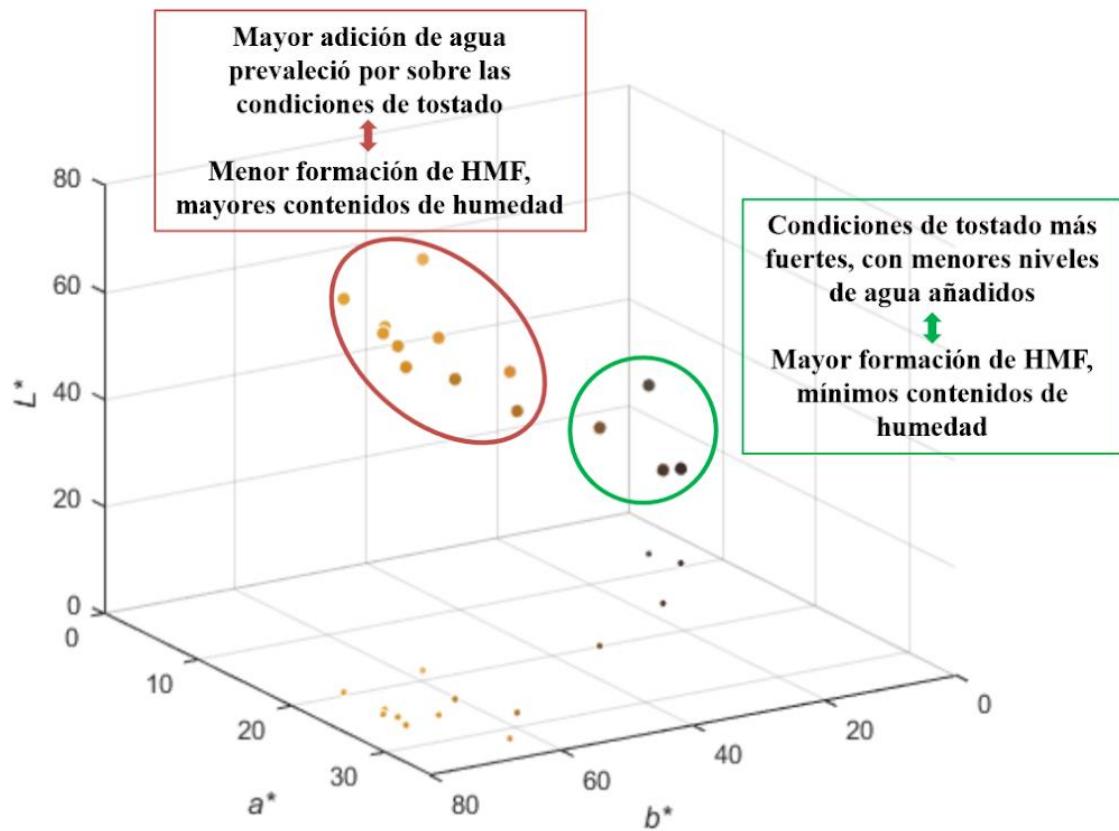


Figura 31: Relaciones entre las condiciones de procesamiento adición de agua, tiempo y temperatura de tostado y las variables respuesta parámetros del espacio de color CIELAB, contenido de agua final y formación de HMF en *snacks* de maíz.

Observando que los cambios de color y la formación de HMF ocurren de manera paralela, se realizó un análisis de la correlación entre los valores predichos de las variables cromáticas y HMF. Los resultados, incluyendo los parámetros y las ecuaciones de ajuste, se muestran en la Figura 32 (A-D). Se obtuvieron buenas correlaciones negativas entre la concentración de HMF y los valores de L^* y b^* (Figuras 32 A y C, respectivamente) con $R^2 = 0,97$ en ambos casos. Este comportamiento se encuentra relacionado con el proceso de oscurecimiento, que promueve una disminución constante de la luminosidad (L^*) y también de la variable asociada al amarillo (b^*), que se relaciona a los tonos más claros. Sin embargo, el comportamiento de la variable a^* (asociada al rojo), mostrado en la

Figura 32 B, presenta una forma acampanada que indica que el color rojo disminuye únicamente con un grado acelerado de oscurecimiento (debido a la pérdida de reflectancia total). Por otro lado, como se muestra en la Figura 32 D, hay una correlación pobre entre el contenido de HMF y ΔE_{ab}^* . De hecho, cuando una muestra se oscurece, los valores de L^* y b^* disminuyen mientras ocurre una compensación por el aumento de a^* (como se muestra en la Figura 32 B), lo cual se refleja en los valores de ΔE_{ab}^* , llevando a malinterpretaciones. Estas correlaciones confirman que el oscurecimiento y menores coloraciones amarillas (menores valores de L^* y b^* , respectivamente) pueden ser usados como indicadores de daños térmicos o de cambios inducidos por el calentamiento.

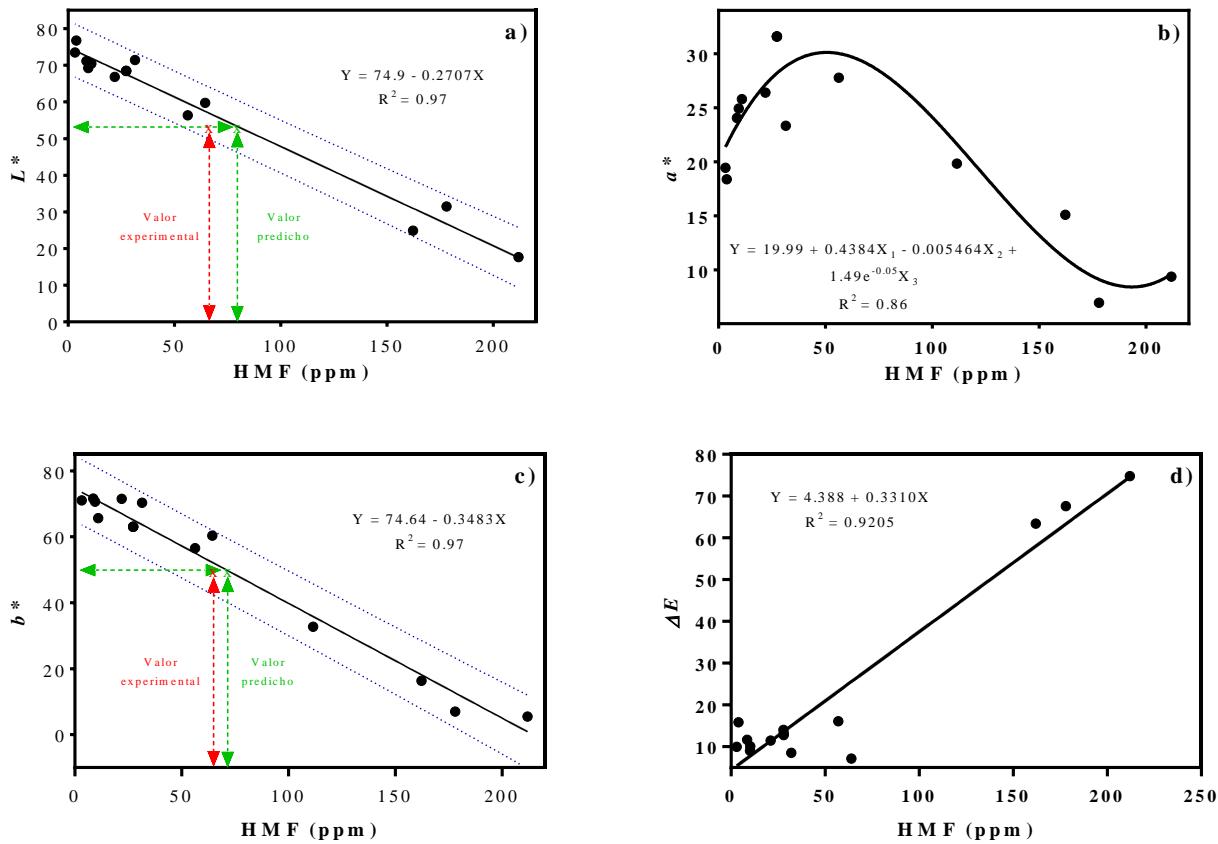


Figura 32: Correlaciones entre la formación de HMF (ppm) y los valores predichos de **(A)** L^* , **(B)** a^* , **(C)** b^* y **(D)** ΔE_{ab}^* en los snacks de maíz. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

4.2.2 Isotermas de adsorción de agua

Los parámetros de ajuste de los modelos de GDW y GAB para las isotermas de adsorción de agua a 25 °C de los sistemas laminados se encuentran en la Tabla 15. En cuanto a la bondad de ajuste, ambos modelos presentaron coeficientes de correlación mayores que 0,99 y %DPRM menores que 10 % para todos los sistemas, confirmando un ajuste adecuado de los datos.

Tabla 15: Parámetros de los modelos de D'Arcy & Watt (GDW) y Guggenheim, Anderson y de Boer (GAB) para las isotermas de adsorción de agua de los diferentes sistemas laminados a 25 °C.

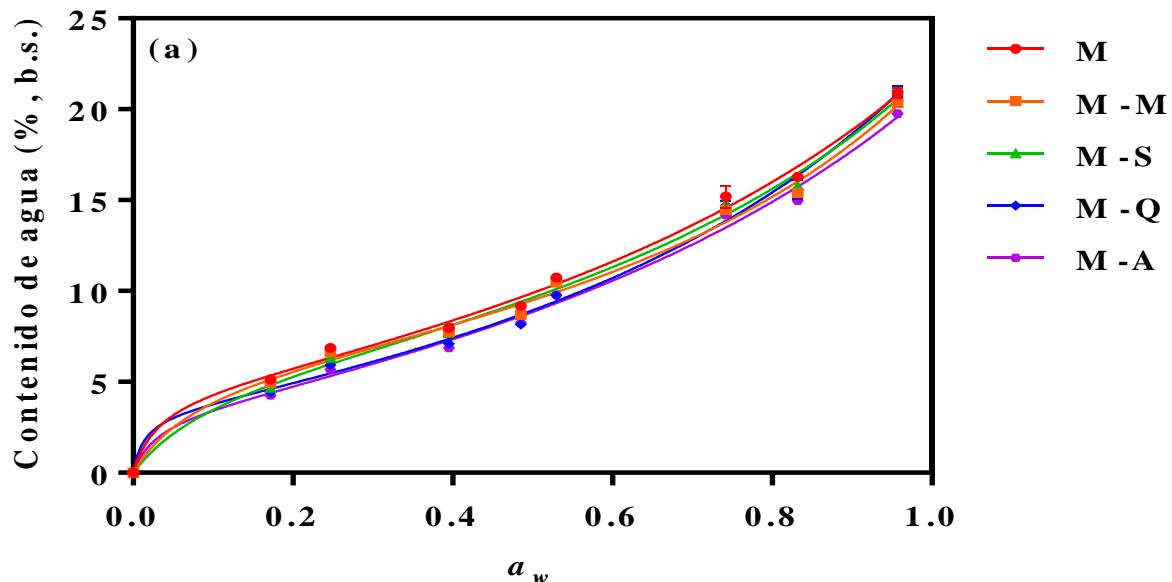
Modelo	Constantes	M	M-M	M-S	M-Q	M-A
GDW	m	4,76	6,56	6,58	3,435	3,52
	K	30,93	11,28	8,848	70,61	33,36
	k	0,541	0,64	0,598	0,586	0,527
	w	3,273	1,497	1,863	4,044	4,656
	R^2	0,994	0,993	0,994	0,993	0,994
	%DPRM	4,55	4,81	4,09	5,03	4,61
	%RECM	4,13	4,46	3,796	4,595	4,32
GAB	m_o	7,98	7,32	8,03	7,25	7,685
	C	10,17	11,69	8,392	7,977	7,004
	k	0,667	0,684	0,664	0,705	0,668
	R^2	0,993	0,993	0,994	0,992	0,993
	%DPRM	4,756	6,619	4,17	6,962	8,921
	%RECM	3,857	4,983	3,633	5,558	7,544

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste.

m y m_o son los contenidos de agua límite de hidratación (% b.s.); K, k, w, C y K son constantes de los modelos; R^2 es el coeficiente de determinación; %DPRM es la desviación porcentual relativa media y %RECM es el porcentaje de la raíz del error cuadrático medio.

De manera similar a las muestras extrudidas, los valores de k y C del modelo de GAB en los sistemas laminados se encontraron en los rangos habituales para la descripción de las isotermas (Lewicki, 1997). Los valores de agua límite de hidratación (m_o) fueron menores que para los sistemas extrudidos y se encontraron en un rango más acotado (7,25 – 8,03 g H₂O/g muestra (b.s.)). Este valor indica los contenidos de agua que aseguran la mayor estabilidad frente a las reacciones deteriorativas. En particular, considerando la composición y estructura de estos productos, la oxidación de lípidos es la de mayor prevalencia. A diferencia del deterioro microbiológico u otras reacciones químicas que se enlentecen mucho a bajos contenidos de agua, la oxidación de lípidos suele acelerarse debido a que en estas condiciones el oxígeno puede difundir fácilmente al interior de la matriz. Por lo tanto, y similarmente a los sistemas extrudidos, se sugiere la utilización de envases que eviten la acción prooxidante del aire y la luz. Por otro lado, los valores de k y C también se corresponden con aquellos asociados a isotermas de tipo II o forma sigmoidea (Figura 33), que describen la presencia de multicapas de moléculas de agua adsorbidas a los componentes sólidos de la matriz (Furmaniak y col., 2009).

G D W



G A B

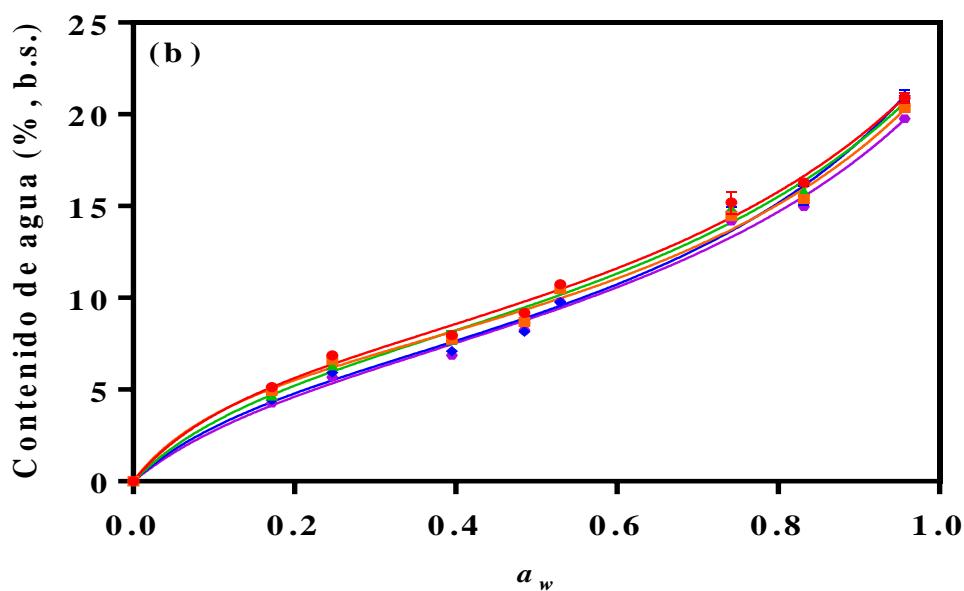


Figura 33: Isotermas de adsorción de agua a 25 °C y ajuste de valores experimentales de los modelos (a) GDW y (b) GAB de los diferentes sistemas laminados. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

Comparando los modelos de GAB y GDW entre sí, en la mayoría de los casos los valores de %RECM del modelo GDW fueron menores, indicando mejores ajustes de los datos experimentales (Wani y Kumar, 2016). Los valores de m del modelo GDW fueron menores que los de m_o de GAB en todos los casos, de manera contraria a lo discutido para los productos expandidos. Particularmente, el modelo GDW incluye un parámetro que describe el tipo de asociación de las moléculas de agua en la zona de la multicapa (w). Para todas las formulaciones w fue mayor que 1 (Tabla 15), lo cual indica que varias moléculas de agua pueden unirse a aquellas que interactúan con los centros primarios de sorción. Esto difiere de lo encontrado para los sistemas extrudidos, lo cual puede atribuirse a las diferencias que generan los procesos de obtención en la microestructura de los productos. Para los sistemas expandidos, la extrusión y las diferencias de presión producen materiales porosos que difieren de las microestructuras compactas obtenidas como resultado de la etapa de laminación. Estos aspectos tecnológicos repercuten en la forma en la que la matriz interactúa con las moléculas de agua y modifican su estabilidad. Las etapas de laminación y tostado pueden limitar la cantidad de centros primarios expuestos que puedan interactuar con las moléculas de agua. Esto puede promover la unión de varias moléculas de agua a los pocos centros de adsorción presentes en estos productos. Estas limitaciones también explican los menores valores de agua límite de hidratación de los productos laminados en comparación con los extrudidos. Estas observaciones demuestran el valor del modelo GDW para explicar características de la microestructura de las muestras.

En lo que respecta a las comparaciones entre formulaciones, los sistemas M-Q y M-A presentaron los menores valores de agua límite de hidratación (m) en el modelo GDW, lo cual se manifiesta en las curvas de la Figura 33, especialmente en el rango de

actividades de agua de 0,2 – 0,8. Esto también ocurrió en los sistemas extrudidos conteniendo alpiste, lo cual nuevamente podría atribuirse a los mayores contenidos de proteínas y fibra dietaria, o la presencia de lípidos, que repercuten sobre la exposición de grupos hidrofílicos y la asociación entre componentes, afectando la higroscopidad de los sistemas (Abdel-Aal y col., 2011a) y produciendo mayores valores de w (Tabla 15). Por el contrario, los sistemas extrudidos que incluyeron quínoa fueron los más higroscópicos (Sección 4.1.6), mientras que la misma formulación de los productos laminados presentó los valores de agua de hidratación más bajos, indicando la menor higroscopidad. Siendo iguales las composiciones, los cambios en los productos se explican por las diferencias en el proceso. Los componentes de la fibra o las proteínas de quínoa pueden haber sufrido cambios conformacionales o estructurales que afectaron su capacidad de adsorber moléculas de agua. Simultáneamente, el proceso de cocción-laminación-tostado pudo generar asociaciones diferentes entre los componentes higroscópicos y el resto de los integrantes de la matriz, como los lípidos, limitando su exposición o interacción con el agua (Romani y col., 2016).

4.2.3 Pruebas de estabilidad durante almacenamiento

4.2.3.1 Actividad de agua (a_w)

Los valores de a_w de los sistemas crudos y productos finales a los diferentes tiempos de almacenamiento se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16: Valores de actividad de agua (a_w) para los sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos*

Sistema	Tiempo	a_w
M	Crudo	$0,650 \pm 0,001^{\text{e},\text{B}}$
	T0	$0,079 \pm 0,002^{\text{a},\text{C}}$
	T2	$0,181 \pm 0,001^{\text{b},\text{D}}$
	T4	$0,194 \pm 0,003^{\text{c},\text{B}}$
	T6	$0,211 \pm 0,001^{\text{d},\text{C}}$
	Crudo	$0,646 \pm 0,001^{\text{d},\text{B}}$
M-M	T0	$0,083 \pm 0,002^{\text{a},\text{C}}$
	T2	$0,160 \pm 0,001^{\text{b},\text{C}}$
	T4	$0,207 \pm 0,004^{\text{c},\text{CD}}$
	T6	$0,214 \pm 0,004^{\text{c},\text{C}}$
	Crudo	$0,648 \pm 0,001^{\text{d},\text{B}}$
	T0	$0,06 \pm 0,00^{\text{a},\text{A}}$
M-S	T2	$0,148 \pm 0,004^{\text{b},\text{B}}$
	T4	$0,177 \pm 0,002^{\text{c},\text{A}}$
	T6	$0,182 \pm 0,002^{\text{c},\text{A}}$
	Crudo	$0,633 \pm 0,001^{\text{e},\text{A}}$
	T0	$0,134 \pm 0,001^{\text{a},\text{D}}$
	T2	$0,192 \pm 0,005^{\text{b},\text{E}}$
M-Q	T4	$0,209 \pm 0,003^{\text{c},\text{D}}$
	T6	$0,236 \pm 0,003^{\text{d},\text{D}}$
	Crudo	$0,63 \pm 0,00^{\text{d},\text{A}}$
	T0	$0,066 \pm 0,003^{\text{a},\text{B}}$
	T2	$0,137 \pm 0,003^{\text{b},\text{A}}$
	T4	$0,199 \pm 0,003^{\text{c},\text{BC}}$
M-A	T6	$0,202 \pm 0,003^{\text{c},\text{B}}$

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre tiempos de almacenamiento para cada formulación, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias entre formulaciones para cada tiempo de almacenamiento (valor- $p \leq 0,05$).

De los resultados de la Tabla 16 se destaca que todas las formulaciones crudas tuvieron valores de actividad de agua similares, pero en particular las mezclas M-Q y M-A presentaron valores apenas menores que el resto. Es importante aclarar que las formulaciones crudas no fueron sometidas a ningún tratamiento ni fueron equilibradas previamente. Los valores corresponden a la actividad de agua propia de las harinas que resultan tras la molienda de los granos y las respectivas mezclas de materias primas, previo al acondicionamiento definido para la cocción (Sección 4.2.1.5).

Luego del procesamiento (T0), y debido a la exposición a las altas temperaturas durante tiempos prolongados, la a_w disminuye drásticamente en todos los casos, alcanzando valores en el rango 0,06 – 0,134. Se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones, siendo los valores más altos para la formulación M-Q. El elevado contenido y la disposición espacial de grupos hidrofílicos de la quínoa, como las proteínas o la fibra, pueden explicar la mayor retención de agua durante el procesamiento. La misma situación se observó para los productos extrudidos con quínoa (Sección 4.1.6). Si bien las isotermas de adsorción y los parámetros de los modelos matemáticos presentan al sistema M-Q como el menos higroscópico, los valores más altos de a_w a tiempo 0 reflejan una mayor capacidad de los componentes hidrofílicos de retener el agua inicial durante el procesamiento. De la interpolación de los valores de actividad de agua de los sistemas recién preparados en las isotermas de la Figura 33 se puede conocer el contenido de agua (%, b.s.) de las muestras a tiempo 0. Según humedad decreciente, las formulaciones se

ordenan de la siguiente manera: 3,640 (M-Q) > 3,213 (M-M) > 3,061 (M) > 2,172 (M-S) > 1,966 (M-A). Estos valores se encuentran por debajo del agua límite de hidratación para todas las formulaciones con excepción de M-Q. Particularmente para el sistema control (M), esta humedad (%, b.s.) coincide con los valores predichos por la función deseabilidad en las condiciones óptimas previamente definidas (Sección 4.2.1.5). En ese sentido, en comparación con los sistemas extrudidos, los valores predichos por el modelo GAB para los productos laminados resultaron más cercanos a los experimentales.

Durante el almacenamiento se produce un aumento progresivo de los valores de actividad de agua y, por consiguiente, de la humedad para todas las formulaciones. Esto coincide con lo reportado por otros autores para *snacks* elaborados a base de cereales (Yadav, Singh y Arora, 2018; Wani y Kumar, 2016; Sahu y Patel, 2020; Dar, Sharma y Nayik, 2016). Es importante destacar el marcado incremento de los valores de a_w durante los primeros dos meses de almacenamiento. El aumento de la actividad acuosa podría atribuirse a la generación de agua como producto de las primeras etapas de la reacción de Maillard que se desarrolla durante el almacenamiento (Claude y Ubbink, 2006). En particular, los valores finales (T6) más bajos corresponden a los sistemas M-S, mientras que los más altos a M-Q. De todas maneras, los máximos valores de actividad de agua obtenidos, incluso luego de 6 meses de almacenamiento, se encuentran por debajo de los valores críticos en relación con la aceptación sensorial de consumidores reportados por otros autores para alimentos a base de maíz y otros cereales y tampoco constituyen rangos de a_w de riesgo microbiológico (Katz y Labuza, 1981; Wani y Kumar, 2016; Yadav y col., 2018).

4.2.3.2 Compuestos intermediarios y pardos

Los resultados de las mediciones de absorbancia a 294 nm y 420 nm de los extractos obtenidos según la Sección 3.2.3.2.1, asociado a los productos solubles de la reacción de Maillard, se muestran en la Tabla 17. Los compuestos intermedios absorben en la región de 294 nm y son indicadores de los primeros estadios de la reacción, mientras que los compuestos pardos, que se determinan a 420 nm, se forman en etapas avanzadas y son los responsables de los cambios en la coloración del alimento (Farroni y Buera, 2012; Cueto y col., 2017).

Tabla 17: Valores de absorbancia (Abs) a 294 nm y 420 nm de la fracción soluble para los sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos*

Sistema	Tiempo	Abs 294 nm	Abs 420 nm
M	Crudo	0,237 ± 0,005 ^{a,A}	0,0482 ± 0,0001 ^{b,B}
	T0	0,4714 ± 0,0015 ^{d,A}	0,0500 ± 0,0002 ^{b,A}
	T2	0,398 ± 0,002 ^{c,A}	0,030 ± 0,001 ^{a,A}
	T4	0,3818 ± 0,0015 ^{bc,A}	0,0247 ± 0,0002 ^{a,A}
	T6	0,3714 ± 0,0015 ^{b,A}	0,0211 ± 0,0003 ^{a,A}
	Crudo	0,259 ± 0,002 ^{a,B}	0,0272 ± 0,0005 ^{a,A}
M-M	T0	0,535 ± 0,001 ^{d,B}	0,049 ± 0,001 ^{b,A}
	T2	0,522 ± 0,004 ^{d,B}	0,027 ± 0,002 ^{a,A}
	T4	0,490 ± 0,003 ^{c,B}	0,026 ± 0,001 ^{a,A}
	T6	0,434 ± 0,003 ^{b,B}	0,014 ± 0,002 ^{a,A}
	Crudo	0,366 ± 0,002 ^{a,C}	0,0239 ± 0,0004 ^{a,A}
M-S	T0	0,581 ± 0,004 ^{d,C}	0,0820 ± 0,0002 ^{d,B}
	T2	0,56 ± 0,01 ^{c,C}	0,060 ± 0,001 ^{c,B}
	T4	0,533 ± 0,005 ^{b,C}	0,0469 ± 0,0003 ^{b,B}

	T6	0,529 ± 0,003 ^{b,C}	0,0365 ± 0,0002 ^{ab,B}
M-Q	Crudo	0,52 ± 0,01 ^{a,D}	0,025 ± 0,004 ^{a,A}
	T0	0,629 ± 0,004 ^{b,D}	0,225 ± 0,001 ^{e,D}
	T2	0,63 ± 0,01 ^{b,D}	0,202 ± 0,004 ^{d,D}
	T4	0,620 ± 0,001 ^{b,E}	0,115 ± 0,001 ^{c,D}
	T6	0,617 ± 0,002 ^{b,E}	0,0821 ± 0,0003 ^{b,C}
M-A	Crudo	0,55 ± 0,02 ^{a,E}	0,03 ± 0,02 ^{a,A}
	T0	0,619 ± 0,001 ^{b,D}	0,157 ± 0,001 ^{d,C}
	T2	0,61 ± 0,01 ^{b,D}	0,137 ± 0,001 ^{c,C}
	T4	0,599 ± 0,004 ^{b,D}	0,075 ± 0,001 ^{b,C}
	T6	0,549 ± 0,003 ^{a,D}	0,0249 ± 0,0002 ^{a,AB}

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento.

*Los resultados están expresados como promedio ± desvío estándar ($n = 3$). Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre tiempos de almacenamiento para cada formulación, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias entre formulaciones para cada tiempo de almacenamiento (valor- $p \leq 0,05$).

Para todas las formulaciones se registró la misma tendencia: valores bajos en los sistemas crudos, seguidos de un aumento considerable en los productos recién preparados (T0) y una disminución progresiva con el tiempo de almacenamiento. En los sistemas crudos no hubo desarrollo de la reacción de Maillard ya que no se dieron las condiciones propicias; esto explica los bajos valores de absorbancia a 294 y 420 nm. Por el contrario, se produjo un aumento significativo luego del procesamiento (T0) en todas las formulaciones. M presentó los valores más bajos de absorbancia a ambas longitudes de onda, seguido de M-M y M-S, mientras que M-A y M-Q tuvieron los resultados más altos. Particularmente, se destaca la mayor absorbancia a 420 nm de estos últimos dos sistemas. Los mayores contenidos proteicos de las harinas evaluadas, y en particular en quínoa y alpiste, favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard y la generación de compuestos

solubles que absorben a ambas longitudes de onda. Con el transcurso del tiempo de almacenamiento, los valores de absorbancia disminuyeron progresivamente, con cinéticas variables según el sistema. Esta disminución, si bien no se encuentra ampliamente reportada en la bibliografía, podría explicarse por dificultades en la extracción de los compuestos intermedios y avanzados del pardeamiento no enzimático en las condiciones dadas, ya que forman parte de estructuras entrecruzadas insolubles durante el almacenamiento (Rufián-Henares y Delgado-Andrade, 2009).

4.2.3.3 Color

Los parámetros de color del espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*) de los sistemas crudos y productos finales a los distintos tiempos de almacenamiento se presentan en la Tabla 18.

Los parámetros de color de los sistemas crudos provienen de los atributos cromáticos de los ingredientes que los componen. Respecto a la luminosidad (L^*) no se encontraron diferencias significativas entre las distintas formulaciones, donde los valores variaron entre 75,7 y 79,7, lo que indica colores claros. Donde sí se presentaron diferencias significativas fue en los parámetros a^* y b^* , donde el control (M) mostró los valores más altos en ambos casos. Esto se debe al mayor contenido de carotenoides de la harina de maíz y su coloración natural anaranjada, que impactan sobre estos parámetros cromáticos. El reemplazo de 25 % de harina de maíz por el resto de las harinas evaluadas produce un efecto de dilución en el contenido de carotenoides que se ve reflejado en el color de las mezclas.

Tras el proceso de cocción-laminación-tostado (T0) se observan marcados cambios en los parámetros CIELAB, no sólo respecto a los sistemas crudos, sino también entre formulaciones. La exposición de las mezclas de harinas a elevadas temperaturas en tiempos considerables durante el proceso de obtención favorece el desarrollo de la reacción de Maillard, con formación de productos típicos que afectan al color de los sistemas (Van Der Fels-Klerx y col., 2014; Rufián-Henares y col., 2009), como se discutió en las secciones 4.2.1.6 y 4.2.3.2. Como consecuencia disminuye L^* y aumentan a^* y b^* en todos los casos (Farroni y Buera, 2012). En relación con esto, la Figura 34 muestra la correlación entre las absorbancias de la fracción soluble a 294 y 420 nm (Tabla 17) para las muestras crudas y aquellas luego del proceso de cocción/laminado/tostado (T0) con los cambios de luminosidad para todas las formulaciones. No se incluyeron los valores de las muestras almacenadas debido al mencionado cambio de solubilidad de los compuestos de Maillard durante el almacenamiento. Los resultados de la Figura 34 coinciden con lo discutido en la Sección 4.2.1.6 sobre la posibilidad de evaluar cambios debidos al proceso térmico mediado por la reacción de Maillard a partir de parámetros físicos como L^* . Respecto a a^* y b^* no hubo correlación con las absorbancias porque hay otros factores interviniendo en las modificaciones. Por ejemplo, la transformación de los compuestos polifenólicos (Sección 4.2.3.5) y carotenoides (Sección 4.2.3.6) también influye en las modificaciones cromáticas.

Tabla 18: Valores de L^* , a^* y b^* para los sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos*

Sistema	Tiempo	L^*	a^*	b^*
M	Crudo	$78,9 \pm 1,6^{\text{b,A}}$	$4,6 \pm 0,5^{\text{a,B}}$	$36,04 \pm 1,25^{\text{a,B}}$

	T0	$55,9 \pm 2,2$ a,B	$17,8 \pm 2,2$ b,A	$59,2 \pm 1,4$ c,D
	T2	$56,6 \pm 1,1$ a,B	$19,78 \pm 0,45$ bc,A	$56,3 \pm 1,2$ bc,D
	T4	$58,8 \pm 0,8$ a,B	$20,1 \pm 1,3$ bc,AB	$54,9 \pm 3,6$ bc,D
	T6	$59,6 \pm 1,7$ a,B	$21,4 \pm 0,7$ c,AB	$53,5 \pm 2,7$ b,D
	Crudo	78 ± 1 b,A	$3,5 \pm 0,6$ a,AB	$33,3 \pm 1,7$ a,B
	T0	$53,2 \pm 2,4$ a,B	$17,4 \pm 1,4$ b,A	$49,2 \pm 1,4$ c,C
M-M	T2	$53,2 \pm 3,1$ a,B	$18,1 \pm 2,5$ b,A	47 ± 1 c,C
	T4	$53,5 \pm 2,8$ a,B	$19,4 \pm 0,7$ b,AB	$45,2 \pm 4,3$ bc,C
	T6	$57,4 \pm 1,5$ a,B	$19,6 \pm 2,2$ b,A	$40,3 \pm 1,2$ b,C
	Crudo	$79,7 \pm 0,8$ b,A	$2,9 \pm 0,7$ a,AB	$25,4 \pm 2,5$ a,A
	T0	$51,5 \pm 1,6$ a,B	$16,3 \pm 2,1$ b,A	$42,2 \pm 2,4$ b,B
M-S	T2	$52,3 \pm 3,1$ a,B	$17,7 \pm 2,9$ b,A	$42,26 \pm 1,25$ b,BC
	T4	$53,6 \pm 1,6$ a,B	$17,4 \pm 1,1$ b,A	39 ± 3 b,B
	T6	$56,0 \pm 3,6$ a,B	$18,8 \pm 0,9$ b,A	37 ± 4 b,BC
	Crudo	$79,4 \pm 1,7$ c,A	$1,6 \pm 0,2$ a,AB	23 ± 1 a,A
	T0	$36,9 \pm 3,4$ a,A	24 ± 2 b,B	$41,4 \pm 4,2$ c,B
M-Q	T2	$42,8 \pm 5,4$ ab,A	25 ± 3 b,B	40 ± 4 c,B
	T4	$43,5 \pm 6,3$ b,A	22 ± 3 b,B	$38,2 \pm 4,1$ bc,B
	T6	$43,3 \pm 5,8$ b,A	$23,3 \pm 2,5$ b,B	$33,6 \pm 1,2$ b,AB
	Crudo	$75,7 \pm 2,1$ b,A	$0,9 \pm 0,5$ a,A	$22,7 \pm 1,6$ a,A
	T0	$38,3 \pm 0,7$ a,A	$17,5 \pm 0,7$ b,A	$34,3 \pm 0,8$ b,A
M-A	T2	41 ± 1 a,A	$18,1 \pm 1,5$ b,A	$33,0 \pm 0,8$ b,A
	T4	$41,4 \pm 1,3$ a,A	$18,4 \pm 0,8$ b,A	$32,3 \pm 1,5$ b,A
	T6	42 ± 1 a,A	$19,8 \pm 1,1$ b,A	$31,4 \pm 1,9$ b,A

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar ($n = 6$). Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre tiempos de almacenamiento para cada formulación, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias entre formulaciones para cada tiempo de almacenamiento (valor- $p \leq 0,05$).

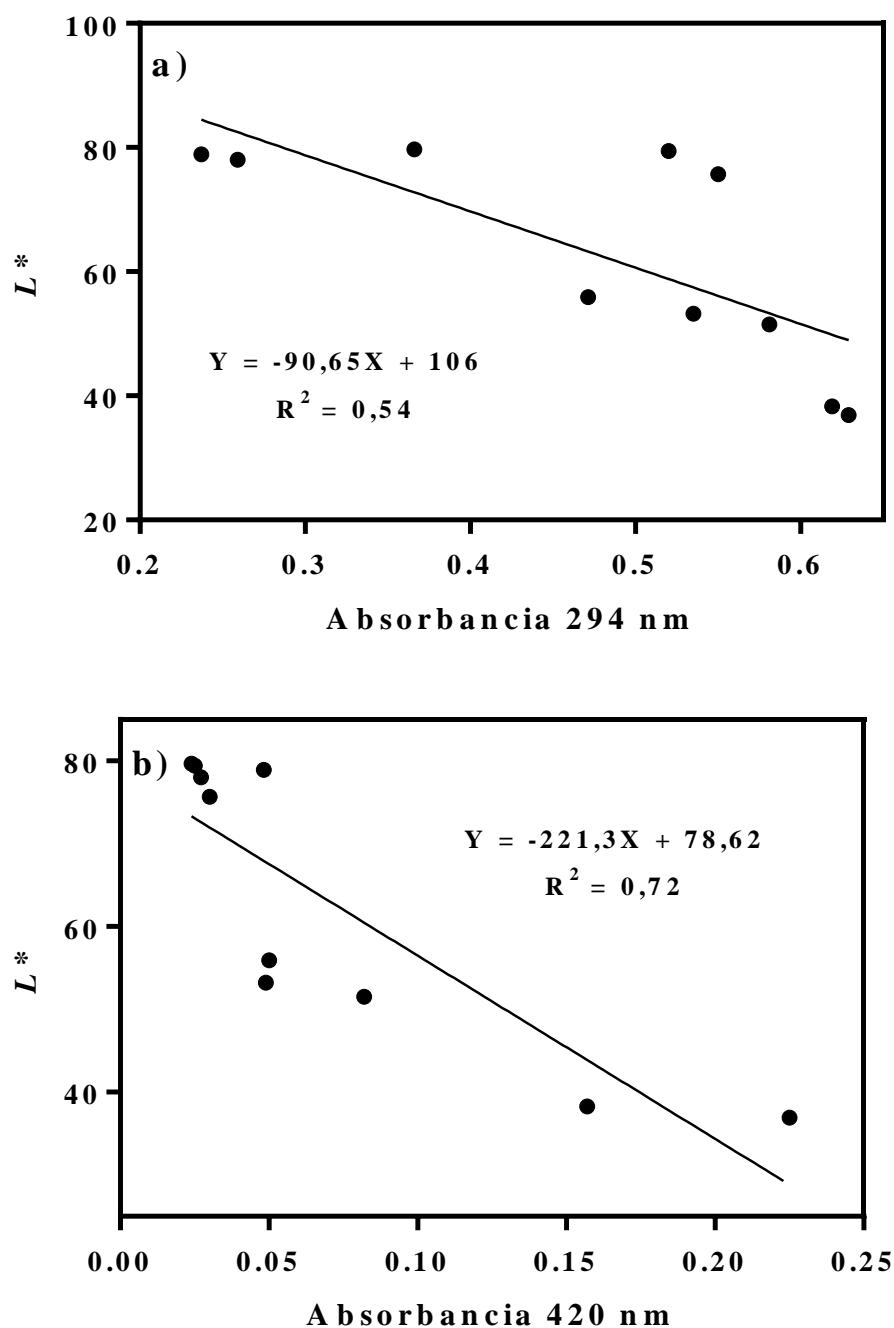


Figura 34: Correlación entre luminosidad (L^*) y absorbancia a **a)** 294 nm y **b)** 420 nm de la fracción soluble de sistemas crudos y productos laminados a T0 para todas las formulaciones.

Según se observa en la Tabla 18, en T0 los valores de a^* son similares en todas las formulaciones, salvo en M-Q que presentó los resultados más altos. Por su parte, respecto a b^* hubo diferencias significativas entre las formulaciones, ordenándose de manera creciente de la forma M > M-M > M-S > M-Q > M-A. Los aumentos de b^* luego del tratamiento pueden deberse también a una mayor exposición de compuestos polifenólicos o carotenoides que se encontraban retenidos estructuralmente o asociados a compuestos de la matriz, tales como proteínas o fibra (Ortak y col., 2017; Rolandelli y col., 2021). Esta exposición genera cambios en la apariencia y el color del producto. Esto es particularmente aplicable para el caso del control (M), que presenta altos contenidos de carotenoides y donde los valores de b^* resultaron ser los mayores. Sin embargo, la exposición de carotenoides y compuestos polifenólicos también supone un aumento en la susceptibilidad a la oxidación o degradación (Cueto y col., 2017).

Con el tiempo de almacenamiento se observa una tendencia general en todos los casos: aumentan progresivamente L^* y a^* , pero disminuye b^* . Estos cambios son leves y se hacen más marcados en el último período de almacenamiento (T6). Si bien no existieron diferencias significativas en los valores de L^* en el tiempo para cada formulación, se observa un leve aumento en todos los casos. Para mostrar el aumento progresivo de L^* durante el almacenamiento, se graficó la diferencia de luminosidad (ΔL^*) respecto al sistema crudo (L^* a cada tiempo – L^* crudo) para cada formulación y los resultados se muestran en la Figura 35. Allí se visualiza cómo las muestras se van aclarando de manera progresiva con el paso del tiempo, lo que puede relacionarse con el aumento de contenido acuoso (Tabla 16, Sección 4.2.3.1), que se ha demostrado genera tonalidades más claras en otros productos a base de cereales (Ogawa y Adachi, 2014).

Además, durante el almacenamiento también puede haber ocurrido descomposición de los pigmentos carotenoides que haya influido en los cambios de los parámetros de color.

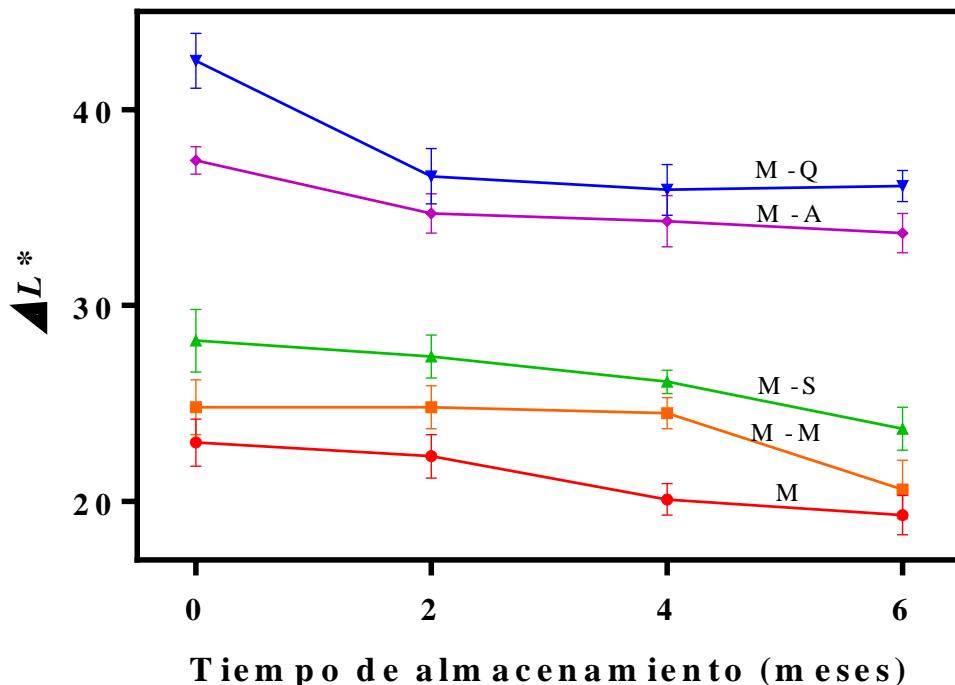
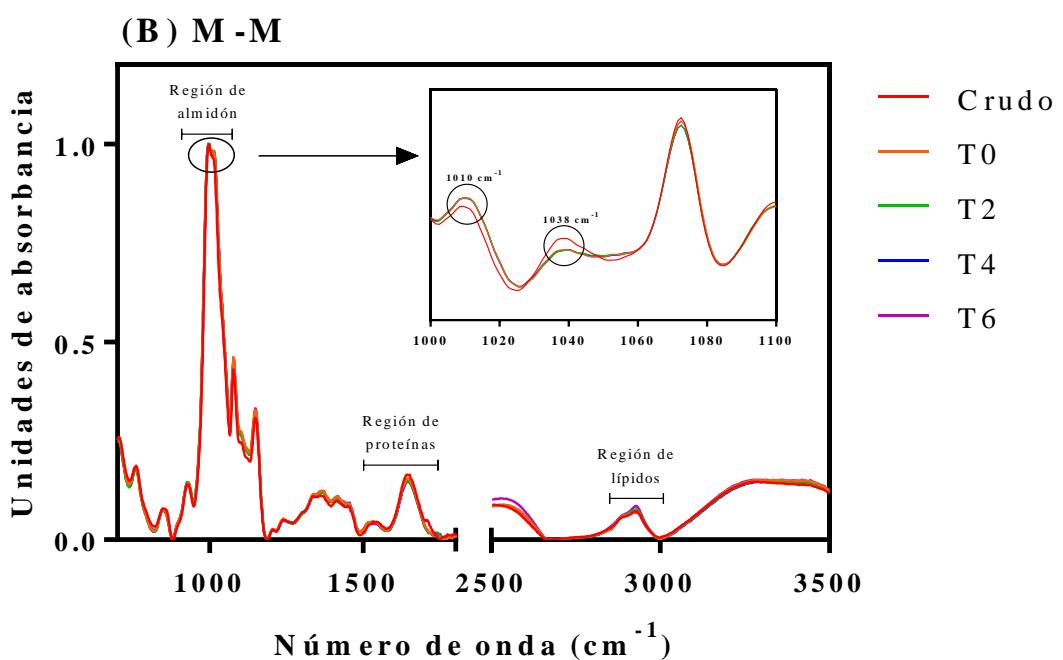
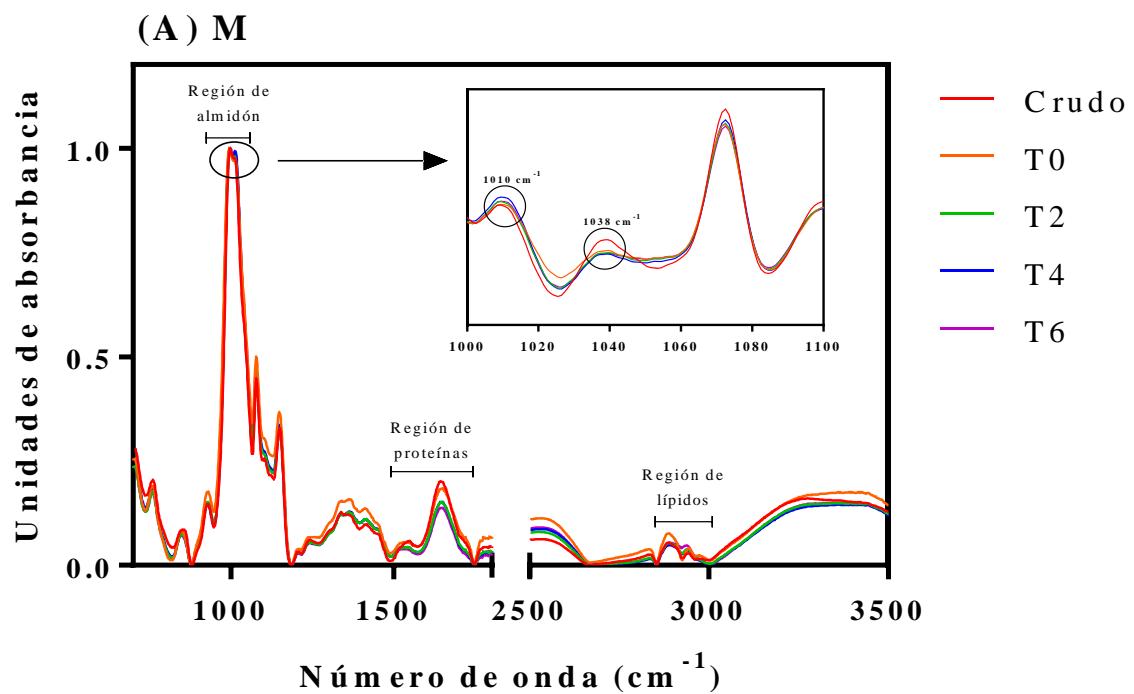


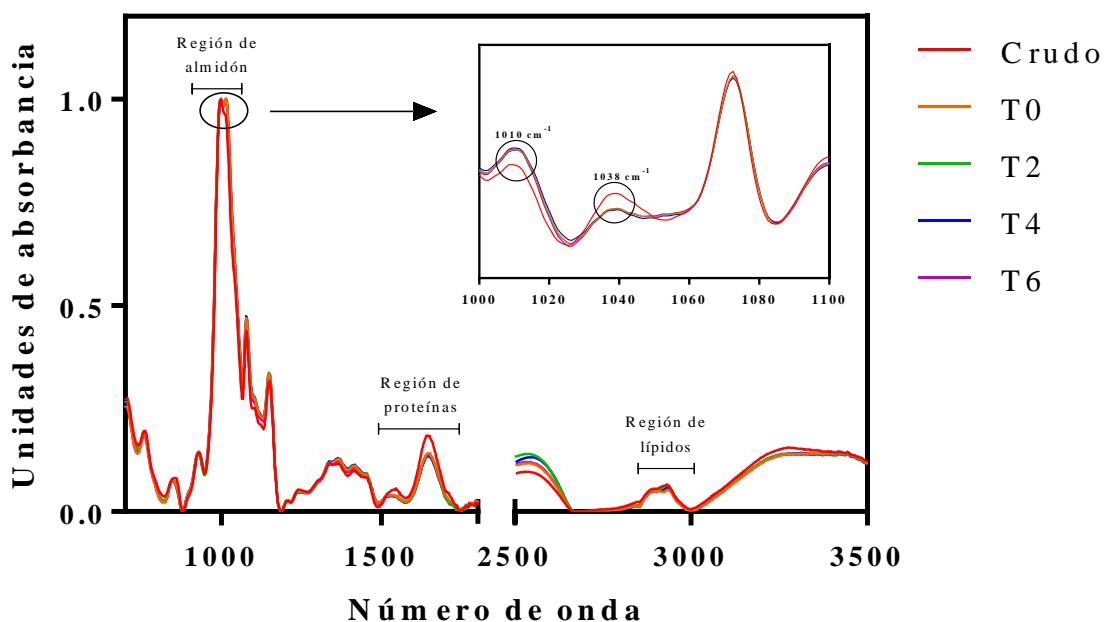
Figura 35: Modificación de la luminosidad (ΔL^*) respecto al sistema crudo durante el almacenamiento para las diferentes formulaciones de productos laminados. M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. Las barras indican las desviaciones estándar de los valores informados.

4.2.3.4 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

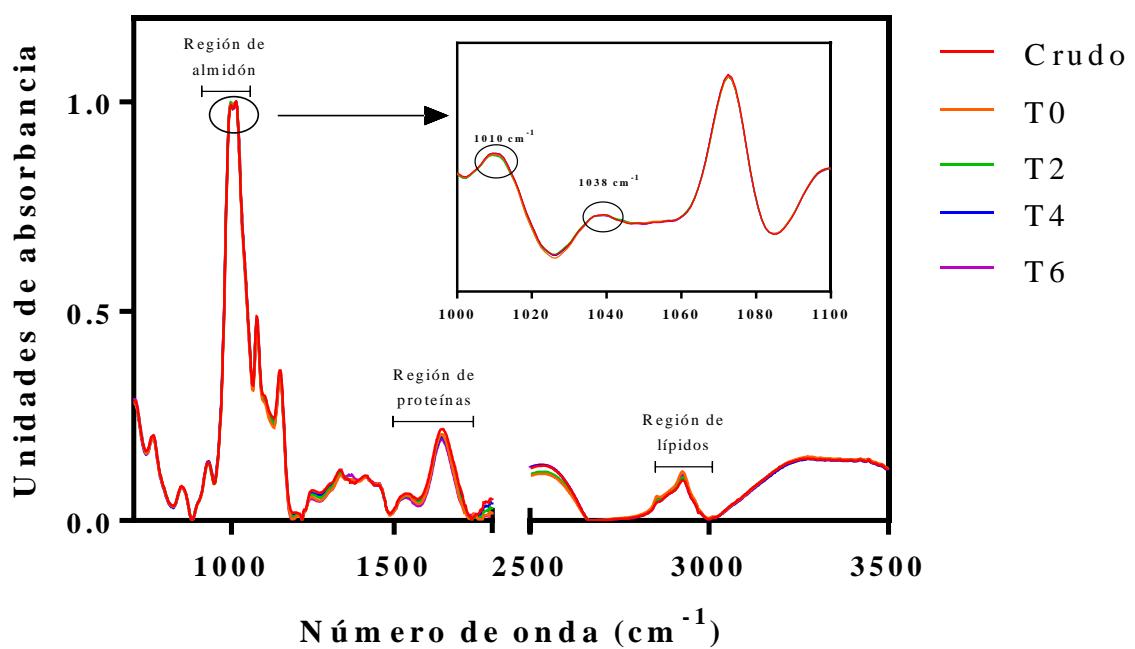
En la Figura 36 se presentan los espectros infrarrojos de los sistemas crudos y productos finales de las cinco formulaciones durante el período de almacenamiento de seis meses. De la misma manera que para los productos extrudidos, algunas bandas pueden atribuirse a modos vibracionales de grupos químicos y, por lo tanto, asociarse a compuestos de la matriz (Tabla 9).



(C) M -S



(D) M -Q



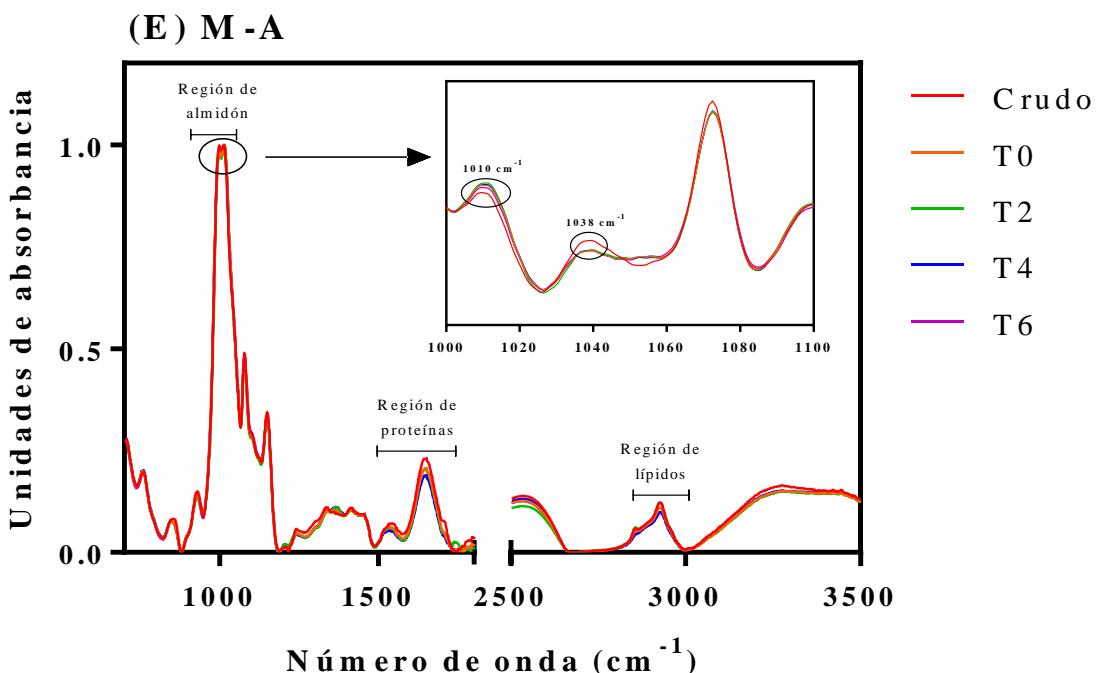


Figura 36: Espectros FT-IR de los diferentes sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos. **(A)** M = control; **(B)** M-M = maíz + mijo; **(C)** M-S = maíz + sorgo; **(D)** M-Q = maíz + quínoa; **(E)** M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento. En los insertos se amplió la región del almidón, se aplicó la primera derivada y se muestran los cambios de las bandas a 1010 cm^{-1} y 1038 cm^{-1} .

En todos los casos, incluyendo sistemas crudos y los diferentes tiempos de almacenamiento, las bandas principales son las de 998 cm^{-1} y 1014 cm^{-1} , asociadas a la flexión C-O y al estiramiento C-O y la flexión C-O-C del grupo glicosídico, respectivamente, que se atribuyen al almidón (Cueto y col., 2018; Wiercigroch y col., 2017). Similarmente a los productos extrudidos, se observaron modificaciones luego del procesamiento en la región de frecuencia $1000-1100 \text{ cm}^{-1}$, que se relacionan con cambios en la estructura y conformación del almidón (Warren y col., 2016). Para maximizar las diferencias, y en línea con lo planteado por Fetterman (2005), en esa región se aplicó la primera derivada con el fin de mejorar las relaciones entre las señales y el ruido, que se

presenta como un inserto en cada espectro. De este análisis se visualiza en todas las formulaciones un aumento en la intensidad y el área de la banda de 1010 cm⁻¹, propia de modos vibracionales de los enlaces de la porción amorfa, y una disminución en la intensidad y el área de la banda de 1038 cm⁻¹, correspondiente a modos de vibración de la región cristalina, luego del procesamiento (Zhao y col., 2020; Bernardino-Nicanor y col., 2017). Esta modificación es mínima para el sistema M-Q (Figura 36 D). El aumento de la porción amorfa y disminución de la región cristalina u ordenada son consecuencia de la gelatinización del almidón que se produce durante la elaboración de los productos (Sección 1.4.3.1) (Cervantes-Ramírez y col., 2020). Salvo en algunas excepciones, estas bandas no modifican su intensidad con el tiempo de almacenamiento, indicando que la estructura general del almidón no cambia durante los 6 meses evaluados.

Otra de las señales importantes que se presenta en todos los espectros como una única banda ancha ubicada en la región de 3000-3500 cm⁻¹ es la asociada al estiramiento O-H, que se asocia con el agua, fibra dietaria y cualquier otra molécula que contenga cantidades considerables de grupos oxhidrilos (Zhao y col., 2020; Cervantes-Ramírez y col., 2020). De manera general no se observan modificaciones significativas con el procesamiento o almacenamiento. De todos modos, en la mayoría de las formulaciones los sistemas crudos presentan una señal un poco más intensa, que podría deberse al mayor contenido acuoso en estos casos. Sin embargo, dada la cantidad de compuestos involucrados en esta señal, no es posible atribuir el cambio únicamente al contenido de agua, ya que modificaciones fisicoquímicas en carbohidratos y fibra, con numerosos grupos -OH, también repercuten en la intensidad de la banda. De hecho, si sólo dependiera del contenido de agua, se esperaría un aumento de la banda con el tiempo de almacenamiento, dado el incremento en los valores de a_w en todos los casos (Tabla 16).

Las bandas de la región 1600-1700 cm⁻¹ y 1540 cm⁻¹ están asociadas al grupo amida I y amida II, respectivamente, de las proteínas. Estas bandas corresponden al estiramiento C=O y flexión N-H (amida I) y al estiramiento N-H (amida II) (Cueto y col., 2018; Wang y col., 2017). Además, como el máximo de la banda amida I se encuentra a 1640 cm⁻¹ en todos los sistemas, se confirma que las proteínas presentan conformación α -hélice (Jafari y col., 2017; Reszczynska y col., 2015). Se puede relacionar las intensidades de las bandas con mayores contenidos proteicos en las formulaciones M-A (Figura 36 E) y M-Q (Figura 35 D) crudos, mientras que en los sistemas M-M (Figura 36 B) y M-S (Figura 36 C) los niveles son más bajos. Luego del procesamiento (T0) las intensidades de las mencionadas bandas disminuyen, reflejando cambios en las fracciones proteicas. Esta disminución es muy marcada para la mezcla M-S. Por su parte, los sistemas M-A y M-Q continúan presentando las mayores intensidades de las bandas correspondientes a las proteínas, incluso luego del tratamiento térmico. Otro aspecto importante para destacar es el corrimiento del máximo de absorción del grupo amida II a menores longitudes de onda (~ 1527 cm⁻¹) luego del procesamiento. Esto indica cambios en la estructura secundaria de las proteínas, que adoptan conformaciones desordenadas o aleatorias tras el calentamiento, posiblemente asociadas a un cierto grado de desnaturalización o apertura de la cadena polipeptídica (Jafari y col., 2017). Estos cambios conformacionales pueden promover mayores interacciones de las proteínas con otros componentes de la matriz por un aumento en la exposición de grupos funcionales, incluyendo el desarrollo del pardeamiento no enzimático, o con otras moléculas proteicas, favoreciendo la formación de aglomerados proteicos y modificando las propiedades mecánicas de los productos (Wang y col., 2017; Jebalia y col., 2019; Téllez-Morales y col., 2020). De hecho, este cambio podría justificar las modificaciones de color y de absorbancias a 294 y 420 nm, como consecuencia de la reacción de Maillard entre sistemas crudos y recién preparados

discutidos en secciones anteriores. La modificación estructural de las proteínas también puede influir en el grado de asociación con carotenoides o compuestos polifenólicos, limitando o favoreciendo la exposición, susceptibilidad de degradación y funcionalidad de estos compuestos (Reszczynska y col., 2015). Durante el almacenamiento (T2, T4 y T6) se producen disminuciones progresivas de las intensidades de las bandas correspondientes a las proteínas, siendo de mayor magnitud en el control (Figura 36 A), donde las reducciones son más considerables con el paso del tiempo. Estas variaciones se generan como consecuencia de transformaciones fisicoquímicas de las proteínas durante el almacenamiento (Romani y col., 2016).

Por otro lado, las bandas a 2922 y 2853 cm^{-1} corresponden a estiramientos simétricos y asimétricos de $-\text{CH}_2$, respectivamente, y se asocian a los lípidos (Cervantes-Ramírez y col., 2020; Cueto y col., 2018). Dado que todas las formulaciones se elaboraron a partir de *grits* de maíz, donde el germen que contiene la mayor parte de los lípidos se elimina, las intensidades de estas bandas en los sistemas crudos (M) son muy bajas (Figura 36 A). Por este motivo, las señales en las mezclas corresponderán al aporte lipídico de las harinas evaluadas. Los mayores contenidos de lípidos se observan en M-A y M-Q (Figuras 36 E y D, respectivamente), donde las señales son más intensas. Si bien luego del procesamiento las modificaciones de estas bandas no siguen una tendencia general, se puede observar que, en principio, hay un aumento de la señal en los sistemas T0 y que con el tiempo de almacenamiento (T2, T4 y T6), nuevamente las intensidades disminuyen. La ruptura de estructuras celulares y liberación de lípidos como consecuencia del tratamiento térmico puede explicar las mayores señales de las bandas en T0. Esta exposición favorecerá la susceptibilidad al desarrollo de la oxidación de los

lípidos durante el almacenamiento, que puede ser responsable de la disminución de las intensidades de las bandas asociadas con el tiempo.

Finalmente, los carotenoides pueden evaluarse a través de las bandas de 1100 y 960 cm^{-1} , que corresponden a vibraciones de deformación de enlaces C-H de la cadena de polienos y estiramientos C-O de xantófilas, respectivamente (Quijano-Ortega y col., 2020). Del análisis de estas bandas se observa que el control presenta las mayores intensidades (Figura 36 A) y que en las formulaciones la señal disminuye como consecuencia del efecto de dilución. Además, en los sistemas recién preparados (T0) la banda es más intensa que en las formulaciones crudas, lo cual podría atribuirse a la ruptura de las interacciones que presentaban los carotenoides con las proteínas como consecuencia de la desnaturalización producida por el calentamiento, aumentando su exposición (Reszczynska y col., 2015). Sin embargo, la oxidación, isomerización o destrucción de los carotenoides durante el almacenamiento conduce a una disminución progresiva de las intensidades de las bandas, de manera similar al caso de los lípidos. En relación con ellos, al actuar los carotenoides como agentes antioxidantes, su concentración irá disminuyendo con el paso del tiempo en su función de prevenir la oxidación de los lípidos u otros componentes susceptibles en el alimento.

4.2.3.5 CPT y actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante de las formulaciones crudas y productos finales a los diferentes tiempos de almacenamiento, evaluada por el contenido de compuestos polifenólicos totales (CPT) y mediante las técnicas de DPPH• y FRAP, se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Valores de contenido de compuestos polifenólicos totales (CPT) y actividad antioxidante mediante técnica DPPH• y FRAP (mg AG/mL) para los sistemas crudos y los productos finales almacenados a diferentes tiempos*

Sistema	Tiempo	CPT (mg AG/g)	DPPH• (mg AG/g)	FRAP (mg AG/g)
M	Crudo	0,38 ± 0,01 a,A	0,32 ± 0,01 a,AB	0,046 ± 0,002 a,A
	T0	0,387 ± 0,025 a,A	0,46 ± 0,01 c,A	0,126 ± 0,009 c,A
	T2	0,33 ± 0,06 a,A	0,40 ± 0,04 abc,A	0,092 ± 0,001 b,A
	T4	0,32 ± 0,01 a,A	0,39 ± 0,01 abc,A	0,091 ± 0,006 b,A
	T6	0,314 ± 0,006 a,A	0,332 ± 0,004 ab,AB	0,0812 ± 0,0009 b,A
	Crudo	0,48 ± 0,03 a,A	0,30 ± 0,02 a,AB	0,079 ± 0,003 a,B
M-M	T0	0,49 ± 0,04 a,AB	0,49 ± 0,02 b,A	0,174 ± 0,003 d,B
	T2	0,46 ± 0,08 a,AB	0,47 ± 0,01 b,AB	0,157 ± 0,003 cd,B
	T4	0,398 ± 0,025 a,AB	0,450 ± 0,009 b,A	0,144 ± 0,005 c,B
	T6	0,36 ± 0,01 a,AB	0,412 ± 0,009 ab,AB	0,113 ± 0,001 b,B
	Crudo	0,53 ± 0,04 a,A	0,29 ± 0,01 a,A	0,0786 ± 0,0025 a,B
	T0	0,61 ± 0,05 a,B	0,60 ± 0,03 c,B	0,227 ± 0,006 d,C
M-S	T2	0,54 ± 0,04 a,B	0,531 ± 0,005 c,B	0,197 ± 0,008 c,C
	T4	0,495 ± 0,002 a,B	0,498 ± 0,005 bc,AB	0,169 ± 0,004 bc,B
	T6	0,47 ± 0,06 a,AB	0,476 ± 0,009 b,B	0,154 ± 0,004 b,C
	Crudo	0,89 ± 0,09 a,B	0,4 ± 0,1 a,B	0,1396 ± 0,0009 a,C
	T0	1,25 ± 0,04 b,D	0,92 ± 0,02 c,D	0,46 ± 0,03 c,E
	T2	1,13 ± 0,07 b,D	0,91 ± 0,05 c,D	0,43 ± 0,02 c,E
M-Q	T4	0,93 ± 0,05 a,D	0,70 ± 0,04 b,C	0,32 ± 0,01 b,C
	T6	0,88 ± 0,09 a,C	0,66 ± 0,01 b,C	0,298 ± 0,005 b,E
	Crudo	1,04 ± 0,09 c,B	0,337 ± 0,007 a,AB	0,138 ± 0,003 a,C
	T0	1,048 ± 0,055 c,C	0,80 ± 0,02 c,C	0,41 ± 0,01 e,D
	T2	0,84 ± 0,03 b,C	0,73 ± 0,02 c,C	0,378 ± 0,008 d,D
	T4	0,7 ± 0,1 b,C	0,59 ± 0,02 b,B	0,3258 ± 0,0095 c,C
M-A	T6	0,505 ± 0,009 a,B	0,51 ± 0,03 b,B	0,2571 ± 0,0095 b,D

M = control; M-M = maíz + mijo; M-S = maíz + sorgo; M-Q = maíz + quínoa; M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento.

*Los resultados están expresados como promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre tiempos de almacenamiento para cada formulación, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias entre formulaciones para cada tiempo de almacenamiento (valor- $p \leq 0,05$).

De los resultados de la Tabla 19 se observa que el control (M) presentó los valores más bajos de CPT, DPPH• y FRAP, tanto en los sistemas crudos como a los distintos tiempos de almacenamiento. Esto indica que la incorporación de un 25 % de las harinas evaluadas aumenta el contenido de compuestos benéficos y de las propiedades antioxidantes de los productos laminados. Particularmente, el reemplazo de maíz con harina de quínoa (M-Q) y alpiste (M-A) aumenta significativamente el contenido de CPT y los valores de FRAP en los sistemas crudos.

En los productos laminados recién preparados (T0) se produjo un aumento en los valores de actividad antioxidante evaluada por las técnicas FRAP y DPPH• en las cinco formulaciones. El control presentó los valores más bajos, mientras que el sistema M-Q los más altos, seguido por M-A. Particularmente, la formulación con quínoa también presentó un aumento significativo en los valores de CPT tras el calentamiento, que podría explicar las mayores actividades antioxidantes para este sistema. La liberación de compuestos fenólicos que se encontraban retenidos en estructuras celulares, o la disociación de complejos con proteínas u otros componentes de la matriz (Kim y col., 2020; Călinoiu y Vodnar, 2020) podrían explicar estos aumentos. Simultáneamente, la generación de productos de la reacción de Maillard con propiedades antioxidantes como consecuencia del procesamiento también puede favorecer el aumento de los valores obtenidos por las determinaciones de las técnicas DPPH• y FRAP. Hay que recordar que M-Q y M-A presentaron las mayores absorbancias a 294 y 420 nm (Tabla 17), lo que

indicaría también mayor formación de productos de Maillard con propiedades antioxidantes que justifiquen los resultados más altos de DPPH• y FRAP.

Durante el tiempo de almacenamiento se observa una reducción de los valores obtenidos de la actividad antioxidante en todas las formulaciones. Por su parte, la disminución de CPT en el tiempo sólo fue significativa para los sistemas M-Q y M-A. La pérdida de los compuestos funcionales puede darse por degradación en las condiciones de almacenamiento mientras ejercen su función antioxidante, retrasando, por ejemplo, la oxidación de los lípidos. La disminución de las intensidades de las bandas correspondientes a los lípidos durante el almacenamiento se discutió en la Sección 4.2.3.4 por análisis espectroscópico. Las mayores caídas de la capacidad antioxidante ocurren durante el sexto mes. Sin embargo, M-Q continúa presentando los valores más altos de todas las formulaciones, seguido por M-A, mientras el control reúne los resultados más bajos en las tres categorías.

4.2.3.6 Carotenoides

Los espectros UV-Vis de los extractos con compuestos carotenoides de las distintas formulaciones y sus modificaciones con el tiempo de almacenamiento se muestran en la Figura 37.

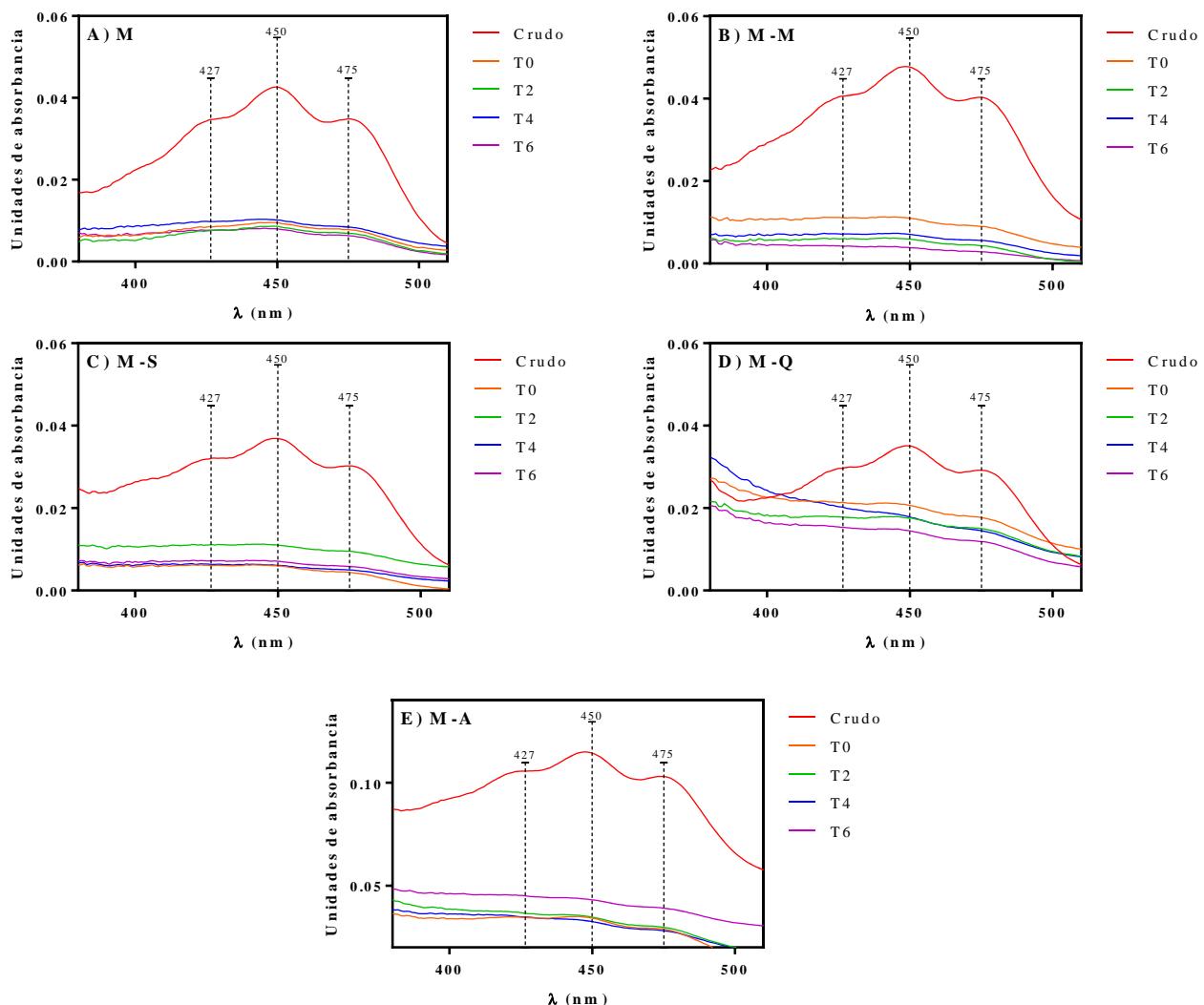


Figura 37: Espectros de extractos conteniendo carotenoides de los diferentes sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos. **(A)** M = control; **(B)** M-M = maíz + mijo; **(C)** M-S = maíz + sorgo; **(D)** M-Q = maíz + quínoa; **(E)** M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento. Se identifican los picos típicos de los carotenoides a 427, 450 y 475 nm (Reszczynska y col., 2015).

En los espectros UV-Vis de todos los extractos provenientes de sistemas crudos se pueden observar tres picos que son característicos de los carotenoides, que se ubican a 427, 450 y 475 nm (Reszczynska y col., 2015). Para el caso de la mezcla M-A (Figura 37 E), las intensidades de estos picos son las más altas en comparación con el resto. Sin embargo, luego del procesamiento (T0) y durante el almacenamiento (T2, T4 y T6) se

produce la pérdida total de los picos, indicando una destrucción de los carotenoides en todos los casos. Si bien el proceso pudo favorecer la exposición de los carotenoides, tal como se manifestó por las bandas características en los espectros FT-IR en los sistemas T0, su elevada susceptibilidad a la oxidación por exposición a condiciones desfavorables (luz, presencia de oxígeno) pudo haber conducido a un marcado descenso en sus concentraciones. Esto se condice, también, con las menores actividades antioxidantes en los sistemas laminados durante el almacenamiento (Tabla 19) y las menores intensidades de bandas propias en los espectros FT-IR (Figura 36).

4.2.3.7 Cuantificación de hidroperóxidos

Los resultados de la cuantificación de hidroperóxidos (meq/kg de muestra) de las formulaciones crudas y a los distintos tiempos de almacenamiento de los sistemas laminados se muestran en la Figura 38.

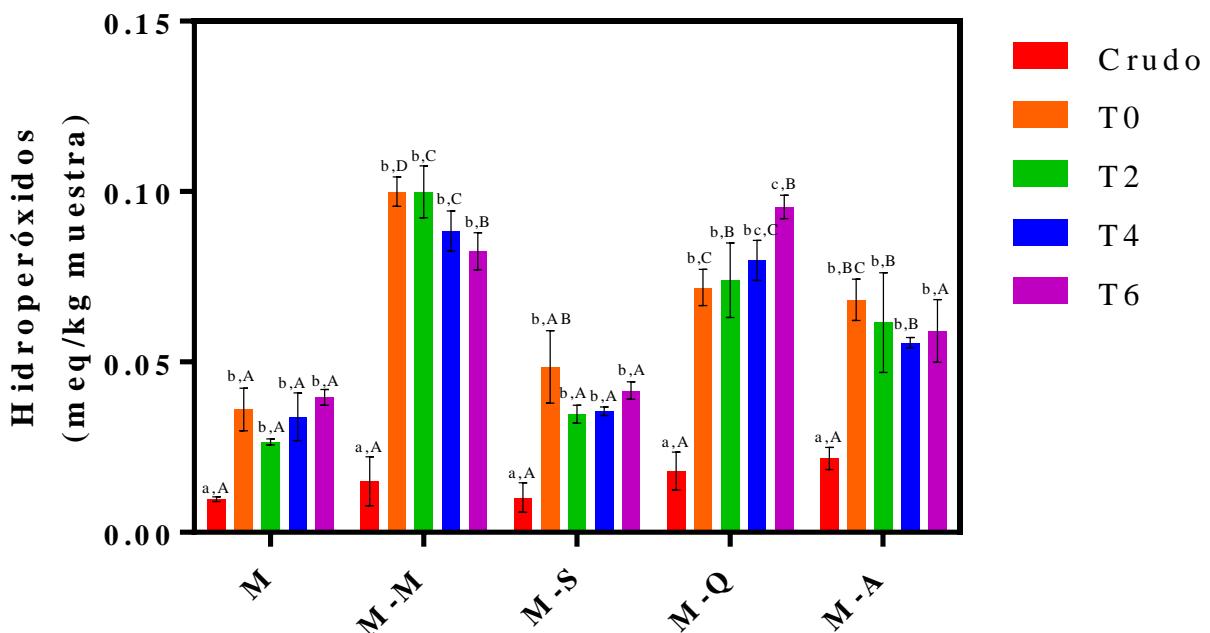


Figura 38: Cuantificación de hidroperóxidos (meq/kg de muestra) de los sistemas crudos y productos finales almacenados a diferentes tiempos. **(A)** M = control; **(B)** M-M = maíz + mijo; **(C)** M-S = maíz + sorgo; **(D)** M-Q = maíz + quínoa; **(E)** M-A = maíz + alpiste. T0 = recién preparado; T2 = 2 meses de almacenamiento; T4 = 4 meses de almacenamiento; T6 = 6 meses de almacenamiento. Las barras indican el desvío estándar para cada muestra. Los valores acompañados por diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas: las letras minúsculas indican diferencias entre tiempos de almacenamiento para cada formulación, mientras que las letras mayúsculas representan diferencias entre formulaciones para cada tiempo de almacenamiento (valor- $p \leq 0,05$).

Del análisis de la Figura 38 se visualiza que los sistemas crudos presentaron los menores contenidos de hidroperóxidos, sin diferencias entre las formulaciones. Dado que los sistemas se elaboraron a partir de *grits* de maíz, donde gran parte de la porción lipídica se retiró, el bajo contenido de lípidos presente limita el desarrollo de la oxidación. Además, si bien la molienda puede favorecer la oxidación, los bajos contenidos de hidroperóxidos en las formulaciones crudas confirma el bajo grado de oxidación previo al procesamiento.

La situación se modificó con el tratamiento térmico, donde se produjeron aumentos significativos en los contenidos de hidroperóxidos en todos los casos. Mediante comparación entre formulaciones, se observa que el control (M) y la mezcla con sorgo (M-S) tuvieron los menores valores al tiempo T0, seguido por M-A, M-Q y, finalmente, M-M, que presentó los mayores contenidos de hidroperóxidos. Por un lado, en estos análisis se evidencia que el proceso de obtención de los productos laminados promueve significativamente la oxidación de los lípidos, a partir de la cual se producen los hidroperóxidos. Al mismo tiempo se visualiza que las formulaciones con mayor grado de oxidación son las que tuvieron mayores intensidades de bandas asociadas al estiramiento simétrico y asimétrico de -CH₂ de los lípidos (2922 y 2853 cm⁻¹), según resultados de los espectros FT-IR (Figura 36).

Con el tiempo de almacenamiento (T2, T4 y T6) se producen cambios en los contenidos de hidroperóxidos, que evolucionan de manera diferente según la formulación. Si bien no existen diferencias significativas a los distintos tiempos, la tendencia que se observa en el caso de M y M-S es que, tras un máximo de concentración a T0, se produce una disminución en la cantidad de hidroperóxidos a T2, que luego aumentan progresivamente hacia T6. Para M-Q la situación es similar, aunque los valores de hidroperóxidos aumentan continuamente desde T0 hasta T6, donde se obtienen los resultados más altos. Finalmente, para M-M y M-A se produce una disminución progresiva en la concentración de hidroperóxidos desde T0 hasta T6. Si bien para la mezcla con mijo se obtiene un mínimo a T6, para M-A el valor más bajo se registró a T4 y en T6 se observó un pequeño aumento, aunque sin diferencias significativas.

La disminución en el contenido de hidroperóxidos con el paso del tiempo se puede atribuir a transformaciones de los productos primarios de la oxidación de lípidos hacia la generación de productos secundarios por reacciones de β -escisión, a partir de los cuales se generan los compuestos responsables de los aromas rancios, principalmente aldehídos y cetonas (Hall, 2010; Barden y Decker, 2013). Sin embargo, es importante destacar que los productos laminados no presentaban aromas desagradables, incluso luego de 6 meses de almacenamiento. De hecho, las concentraciones de hidroperóxidos fueron muy inferiores respecto a otros *snacks* a base de cereales para condiciones de almacenamiento similares (Amft y col., 2019; Jan, Saxena y Singh, 2017; Romani y col., 2016). En ese sentido, el rol de los antioxidantes pudo haber sido fundamental, previniendo o retrasando la fase *lag* de la oxidación. Esto justificaría también las marcadas reducciones en los contenidos de carotenoides (Figura 37), así como también de compuestos polifenólicos y de las propiedades antioxidantes durante el almacenamiento de los productos (Tabla 19).

Es importante destacar que, en casi todas las formulaciones, el contenido máximo de hidroperóxidos se presentó a T0 (Figura 38), donde los valores de a_w y humedad son mínimos (Tabla 16, Sección 4.2.3.1) y se encuentran por debajo del valor de monocapa. En estas condiciones se promueve la oxidación de lípidos (Labuza y Dugan, 1971). Durante el tiempo de almacenamiento la humedad del producto aumentó progresivamente en todos los sistemas (Tabla 16), acercándose al valor de monocapa, lo cual trae aparejado mayores movilidades moleculares. La adsorción de agua de una muestra de muy baja humedad dificulta la difusión del oxígeno hacia el interior de la matriz, disminuyendo la velocidad de oxidación lipídica (Romani y col., 2016). Este fenómeno podría estar relacionado con la disminución del contenido de hidroperóxidos en M-M, M-S y M-A con el paso del tiempo. Por otro lado, como los hidroperóxidos son compuestos intermediarios de oxidación, su disminución también puede deberse a transformaciones hacia productos secundarios, como se discutió anteriormente. Paralelamente, la degradación de los carotenoides y los compuestos polifenólicos con actividad antioxidante (Secciones 4.2.3.5 y 4.2.3.6) también pudo haber influido en la disminución del progreso de la oxidación.

En el caso particular de M-Q, el contenido de hidroperóxidos aumentó con el tiempo de almacenamiento. En este sistema, el contenido de humedad a T0 era el mayor de todas las formulaciones y se encontraba por encima del valor de monocapa (Sección 4.2.3.1), lo cual podría explicar los menores contenidos de hidroperóxidos en estas condiciones (Romani y col., 2016). Sin embargo, el aumento del contenido acuoso durante el almacenamiento promueve la movilidad de los componentes de la matriz, favoreciendo la oxidación, con aumento de la concentración de hidroperóxidos (Labuza y Dugan, 1971).

5. Resultados destacados y discusión final

La adición de 25 % de harina de mijo, sorgo, quínoa y alpiste a productos extrudidos y laminados a base de maíz mejoró las propiedades nutricionales y funcionales y cambió las características microestructurales, térmicas, visuales y fisicoquímicas de los sistemas obtenidos. Desde el punto de vista nutricional, las mezclas extrudidas tuvieron menores contenidos de lípidos y carbohidratos y mayores valores de proteína. En cuanto a los componentes funcionales, los sistemas con las mezclas de harinas presentaron mayores contenidos de fibra dietaria y, en algunos casos, mayores capacidades antioxidantes. Estos aumentos promovieron mayor retención de agua y la formación de una matriz más elástica que favoreció la expansión de los productos extrudidos. Con respecto al color, y en relación con el desarrollo de la reacción de Maillard, los productos elaborados a partir de las mezclas tuvieron mayor grado de pardeamiento que los de harina de maíz, lo que es atribuible a sus mayores contenidos proteicos.

La cristalinidad del almidón, el grado de expansión, la microestructura y los índices de absorción y solubilidad en agua se relacionaron directamente con la composición de los productos y las interacciones entre los principales componentes. Los mayores contenidos de fibra indujeron mayor cristalinidad y menor dureza de los extrudidos.

A través de una combinación de técnicas espectroscópicas (FT-IR, FT-Raman, XPS) y microscópicas (SEM, CLSM) se analizaron las interacciones a nivel molecular de los componentes y las modificaciones promovidas por los procesos, tales como desnaturalización proteica, formación de complejos amilosa-lípidos, modificaciones de la estructura del almidón y exposición de carotenoides. Se analizaron para cada

formulación la distribución superficial de los componentes principales y sus modificaciones luego del proceso. De especial importancia resultaron la gelatinización del almidón y la formación de aglomerados proteicos, los cuales pueden influir en la estructura de la matriz y sus propiedades mecánicas. Las características microestructurales y los arreglos tridimensionales de cada formulación se correlacionaron con la composición y las propiedades fisicoquímicas, tales como adsorción de agua, dureza, susceptibilidad a la oxidación lipídica, estabilidad de compuestos polifenólicos y carotenoides, entre otras.

En los sistemas laminados el estudio de superficie de respuesta fue de utilidad en la definición de las condiciones de proceso orientadas a lograr características específicas de los productos: color adecuado, minimizar la formación de HMF y el contenido de agua final. El tostado de las formulaciones con bajos contenidos acuosos durante largos tiempos y a elevadas temperaturas generó productos con bajos valores de L^* y b^* y altos de a^* , debidos al desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático, confirmado por los contenidos de HMF. El proceso también produjo un aumento de la actividad antioxidante, evidenciando que con un adecuado diseño es posible generar compuestos funcionales, minimizando la formación de compuestos no deseados, como el HMF.

Es de destacar que el parámetro ΔE_{ab}^* ha sido utilizado con frecuencia como índice de evolución del color en las reacciones de pardeamiento no enzimático; sin embargo, este parámetro representa una distancia en el espacio CIELAB y no es informativo del tipo de cambio de color que está ocurriendo. En su lugar, mediante relaciones entre los cambios de L^* , b^* y HMF se propone a estos parámetros de color como indicadores del daño térmico en los productos.

Cuando los productos laminados se almacenaron durante 6 meses se observaron cambios en varias de sus propiedades, las cuales pudieron relacionarse entre sí. Por un lado, se produjo un leve aumento en sus contenidos de agua, dada su naturaleza higroscópica y la captación de agua que se libera en la reacción de Maillard. Como consecuencia de esto la oxidación de lípidos resulta desfavorecida. En simultáneo, las transformaciones de los hidroperóxidos a productos secundarios de la oxidación pueden explicar la disminución de sus contenidos durante el almacenamiento. Paralelamente, se produjo una disminución del contenido de compuestos polifenólicos, que podrían contribuir a evitar el progreso de la oxidación lipídica. De todas maneras, las concentraciones de hidroperóxidos en todos los casos no fueron relevantes para afectar la estabilidad de los productos en el tiempo del experimento y sus valores se encontraron por debajo de otros alimentos a base de cereales.

Los contenidos de agua de los sistemas obtenidos por ambas técnicas se encontraron por debajo del valor de monocapa para la mayoría de las formulaciones, indicando que los productos se encuentran en la zona de estabilidad microbiológica y física. Los modelos matemáticos de GAB y GDW ajustaron correctamente a los datos de sorción y proveyeron información de las interacciones del agua con los sólidos y sus arreglos microestructurales, que resultan útiles para establecer parámetros de calidad y condiciones de almacenamiento. Particularmente, los valores de agua de monocapa del modelo GDW en los sistemas laminados fueron menores que los de GAB, mientras que lo opuesto ocurrió para los productos extrudidos.

Los diferentes grados de asociación del agua con los sólidos y el estudio de la movilidad molecular pudieron analizarse utilizando DSC y varias secuencias de pulsos de ¹H-RMN como técnicas complementarias. La transición vítreo pudo observarse por

DSC y midiendo los tiempos de relajación obtenidos mediante FID. También pudo observarse una transición endotérmica, la cual, luego de un estudio más profundo, pudo identificarse como una relajación entálpica. Los cambios dinámicos de los T_2 utilizando la secuencia de ecos de espín de Hahn revelaron poblaciones de protones cuyos cambios en movilidad se relacionaron con las relajaciones entálpicas observadas por DSC. Los parámetros obtenidos confirmaron que estas relajaciones corresponden a asociaciones energéticas entre el agua y grupos hidrofílicos de polisacáridos que se incrementan con el contenido de agua del sistema y se dan de manera espontánea en estructuras vítreas con movilidad reducida durante el almacenamiento. Estas asociaciones se rompen durante el calentamiento y generan reacomodamientos estructurales dinámicos de los biopolímeros que influyen sobre aspectos físicos y estructurales. El análisis integral incluyendo los tiempos de relajación de ^1H -RMN permitió definir que la relajación entálpica está más relacionada al agua que no se encuentra interactuando fuertemente con los sólidos (“monocapa”), sino con moléculas que tienen cierto grado de libertad, o en “multicapa”.

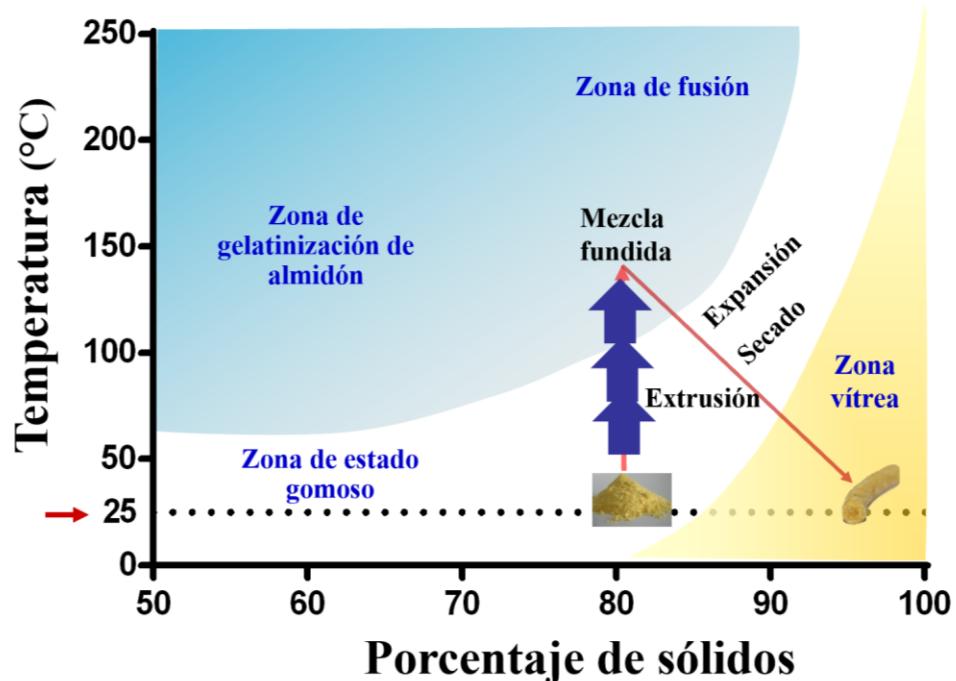
En la Figura 39 se muestran los procesos de extrusión y cocción-laminación-tostado en el diagrama de fase y estado. Estos diagramas de temperatura vs. porcentaje de sólidos incluyen las curvas de equilibrio termodinámico correspondiente a las temperaturas de fusión de agua, o descenso crioscópico, y de solubilidad, que en el caso del almidón corresponden a la gelatinización. Mediante estos diagramas se pueden interpretar los cambios fisicoquímicos que sufren las materias primas durante la transformación hacia los productos finales. Si bien las características de ambos productos parecieran ser similares (bajas humedades, se encuentran en estado vítreo, el almidón se encuentra completamente gelatinizado, entre otras), el camino que siguen los materiales a través de las diferentes fases y estados es muy diferente. Este camino es determinado

por la tecnología aplicada para cada proceso, así como los tiempos y temperaturas utilizadas.

En los sistemas extrudidos las porciones amorfas de las harinas crudas deben encontrarse en la zona de estado gomoso, con un adecuado contenido acuoso necesario para la extrusión y, posteriormente, todos los cambios y transiciones de fase se concentran en dos etapas. En la etapa de extrusión la mezcla llega a la zona de fusión sin cambio en el contenido de agua y allí se producen las principales transformaciones. Al llegar a la boquilla del extrusor, el material se expande y seca atravesando la zona de estado gomoso para alcanzar, finalmente, el estado vítreo al enfriarse.

En los sistemas laminados, en cambio, las transformaciones se producen en un mayor número de etapas, cada una de ellas determinada por un paso específico del proceso: cocción con alto contenido de agua para lograr la máxima gelatinización, secado que hace posible la laminación con un contenido de agua intermedio en la zona gomosa, tostado a alta temperatura con rápida pérdida de agua y, luego, enfriamiento que lleva al producto a la zona vítreo. La consecuencia de transitar estos diferentes caminos para llegar a un producto de baja humedad y en estado vítreo a temperatura ambiente es la generación de diferentes microestructuras en cada uno de los productos, lo cual influye directamente en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y superficiales. La expansión y el rápido secado en los productos extrudidos genera materiales porosos que presentan asociaciones con el agua diferentes que los productos que se comprimieron durante la laminación. Estas diferencias también modifican las propiedades en las cuales el agua tiene un rol protagonista, tales como transiciones térmicas, propiedades mecánicas, desarrollo de reacciones de deterioro, entre otras.

El proceso de extrusión en el diagrama de fase y estado



El proceso de cocción-laminación-tostado en el diagrama de fase y estado

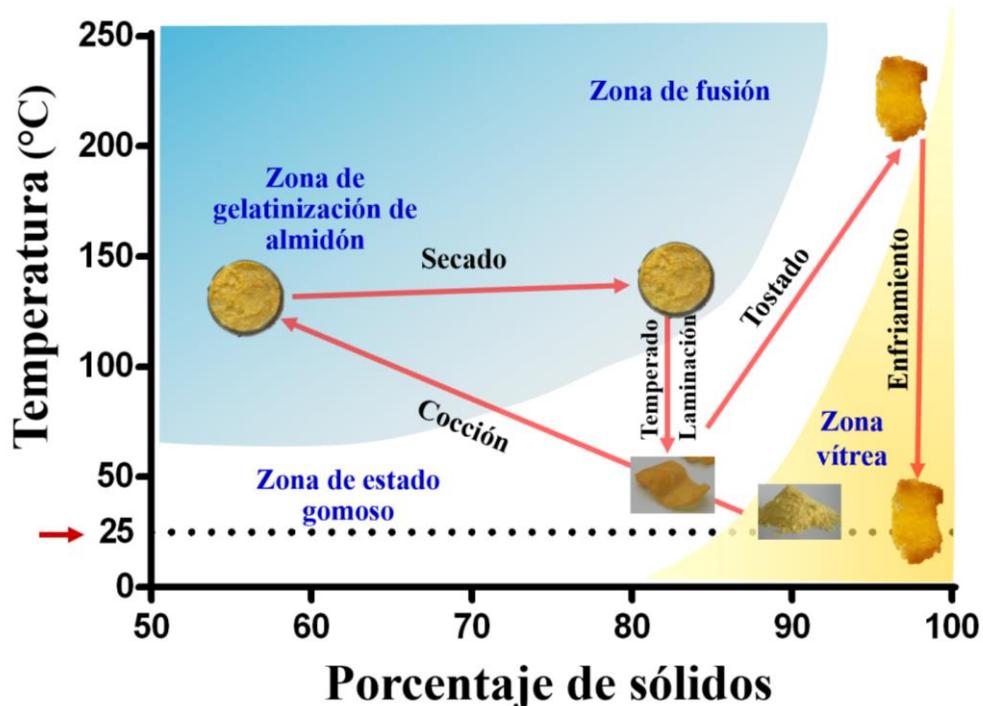


Figura 39: Los procesos de extrusión y cocción-laminación-tostado en el diagrama de fase y estado.

Todos estos resultados demuestran que los productos obtenidos a partir de las mezclas de harinas mostraron mejores propiedades nutricionales, funcionales, fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y microestructurales en comparación al control. Paralelamente, estas incorporaciones generaron productos con características organolépticas y visuales distintivas. Así, se ejemplifica la potencial aplicación y utilización de estos ingredientes subvalorados en formulaciones alimentarias destinadas al consumo humano a nivel industrial para la obtención de productos innovadores.

6. Conclusiones

En conjunto, las características de los productos analizados estuvieron definidas no sólo por la combinación de ingredientes, sino por las condiciones del procesamiento y el método de elaboración utilizado. En todos los casos la combinación de maíz con los cereales y pseudocereales propuestos generó productos con propiedades fisicoquímicas, mecánicas y microestructurales diferenciadas.

Las condiciones de los procesos de elaboración fueron establecidas a partir de variables experimentales donde se consideraron propiedades fisicoquímicas de interés, así como aspectos visuales, características organolépticas de los productos y la mínima generación de reacciones indeseadas. Posteriormente, y teniendo en cuenta que todas las formulaciones fueron obtenidas en iguales condiciones, fue posible atribuir las diferencias en los productos finales a la composición de las mezclas de harinas evaluadas, así como a los cambios a nivel molecular y las interacciones generadas por los tratamientos.

La incorporación de un 25 % de las harinas de mijo, sorgo, quínoa y alpiste generó mejoras en los perfiles nutricionales y funcionales en los sistemas extrudidos en comparación con los productos elaborados únicamente con harina de maíz. Los aumentos en los contenidos de proteínas y fibra dietaria, y los cambios en las interacciones de los componentes tras el procesamiento, trajeron como consecuencia diferentes relaciones de los productos con el agua y los procesos mediados por ella.

En los sistemas extrudidos el análisis de las isotermas de adsorción de agua, las propiedades térmicas por DSC y la movilidad molecular por $^1\text{H-RMN}$ para las diferentes formulaciones permitió establecer relaciones composición-proceso-propiedades finales. Los valores de temperatura de transición vítrea no se vieron afectados en forma

significativa por el agregado de otras harinas. En cambio, las propiedades de sorción de agua, la microestructura de las matrices y sus características superficiales se modificaron según la formulación como consecuencia del aumento del contenido de grupos hidrofílicos y sus interacciones, o la disposición de los lípidos.

Mediante el uso de herramientas de diseño experimental se definieron las condiciones del proceso de cocción-laminación-tostado orientadas a conseguir características deseadas en el producto final, que se verificaron experimentalmente. El tiempo y la temperatura de tostado, así como el contenido inicial de agua tuvieron roles críticos en la definición del color de los productos, la humedad final y el grado de desarrollo de la reacción de Maillard. Particularmente, el análisis de los cambios de color asociados al pardeamiento reveló que es posible predecir el daño térmico a partir de parámetros físicos como L^* o b^* . Por otro lado, todas las mezclas de productos laminados presentaron mayores contenidos de compuestos polifenólicos totales y mayor actividad antioxidante que el control. La actividad antioxidante aumentó significativamente luego del proceso de elaboración en comparación a los sistemas crudos, debido a la exposición, síntesis o liberación de compuestos con esta funcionalidad. Esto revela la importancia del proceso de elaboración como generador de compuestos antioxidantes que influyen en la preservación del producto.

Las mezclas que contuvieron quínoa y alpiste fueron las que presentaron mayores diferencias con el resto en ambos procesos: presentaron mayores valores de proteínas, fibra dietaria y lípidos y fueron menos higroscópicas. A su vez, no sólo los contenidos sino también las conformaciones de los componentes resultaron importantes, ya que se presentaron diferencias significativas en la microestructura de ambos sistemas. En ese sentido, las formulaciones con quínoa fueron las menos porosas, las más duras y con

mayores IAA, mientras que las que contenían alpiste mostraron bajos valores de dureza y una matriz porosa y frágil. Estas características tienen influencia en la relación de los productos con el agua y los procesos asociados. En los sistemas laminados estas formulaciones mostraron, a su vez, los niveles más altos de polifenoles y actividad antioxidante, y también mayor pardeamiento. Estos resultados confirman que estas propiedades pueden ser controladas por una adecuada elección de ingredientes y sus proporciones.

La combinación de metodologías analíticas complementarias y no destructivas como las empleadas en esta tesis facilitó el análisis y la obtención de resultados valiosos. En conjunto permitieron establecer relaciones entre la incorporación de las harinas, los cambios a nivel molecular promovidos por los distintos procesos de elaboración y las propiedades finales de los productos. Así se comprobó la relación entre los aspectos moleculares y las propiedades macroscópicas (porosidad, cristalinidad, formación de aglomerados proteicos y dureza). La disposición de los componentes y los cambios estructurales fueron útiles para predecir la susceptibilidad a reacciones de deterioro. De esta manera, es posible relacionar las características organolépticas, visuales y mecánicas a partir de la determinación de parámetros microscópicos y asociaciones moleculares.

Las diferencias metodológicas de los procesos de elaboración (extrusión vs. cocción-laminación-tostado) generaron conformaciones diferentes de los componentes principales de los alimentos estudiados. Esto trae como consecuencia, por ejemplo, mayores valores de agua límite de hidratación para los productos expandidos en comparación con los laminados. Estas diferencias pudieron asociarse a la microestructura generada por cada proceso. Por un lado, los productos extrudidos son materiales porosos y expandidos, que se generan a través de un proceso termo-mecánico que dura unos pocos

segundos. Por el contrario, los sistemas laminados se obtienen a través de cocción, seguida de una fuerte compresión para darles forma y, finalmente, un tostado a temperaturas superiores a los 200 °C. Las diferencias entre los procesos modifican la asociación de los componentes mayoritarios y las características de la superficie externa, que está en contacto con el medio.

De todas maneras, algunas transformaciones fueron comunes a ambos procesos. En este grupo se destacaron la gelatinización del almidón, a partir de la cual disminuyó la cristalinidad de los productos y se generó la estructura básica de los diferentes sistemas, la generación de complejos amilosa-lípidos, la exposición o liberación de carotenoides, acompañado de un aumento de la actividad antioxidante del producto, la desnaturalización proteica, que favoreció la asociación de proteínas entre sí generando aglomerados o la exposición de grupos reactivos para dar lugar al pardeamiento no enzimático, con consecuentes cambios en la coloración de los productos y generación de compuestos asociados, entre otros.

Estos resultados alientan a la inclusión a escala industrial de cultivos subvalorados y con mejores propiedades agronómicas para el diseño de productos alimentarios económicos a partir de harinas integrales, libres de gluten y con características distintivas e innovadoras para el consumo humano. Por otro lado, resaltan la accesibilidad económica del equipamiento, la fácil preparación de productos laminados y la versatilidad de la extrusión para la preparación de productos con mezclas de harinas.

La interpretación de los fenómenos que ocurren durante la cocción de harinas de granos permitirá elaborar productos innovadores sobre bases científicas y agregar valor a los productos de maíz, que es una de las principales cosechas del país. Además, favorecerá el empleo de harinas de granos subvalorados para la alimentación humana, y aptos para

cultivar en suelos semiáridos, lo que se considera importante para favorecer la seguridad alimentaria y el desarrollo económico en zonas vulnerables.

7. Referencias

- Abdel-Aal, E.-S. M. (2021). Nutritional and functional attributes of hairless canary seed groats and components and their potential as functional ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 111, 680-687. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.029>
- Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P. J., & Sosulski, F. W. (1997). Structural and compositional characteristics of canaryseed (*Phalaris canariensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3049-3055. <https://doi.org/10.1021/jf970100x>
- Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P., Miller, S. S., Patterson, C. A., & Gray, D. (2011a). Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chemistry*, 125, 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.021>
- Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P., Patterson, C. A., & Gray, D. (2011b). Phytochemicals and heavy metals content of hairless canary seed: A variety developed for food use. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 904-910. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.019>
- Abdel-Aal, E.-S. M., Hernandez, M., Rabalski, I., & Hucl, P. (2020). Composition of hairless canary seed oil and starch-associated lipids and the relationship between starch pasting and thermal properties and its lipids. *LWT – Food Science and Technology*, 125, 109257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109257>
- Acevedo, N. C., Schebor, C., & Buera, P. (2008). Non-enzymatic browning kinetics analyzed through water-solids interactions and water mobility in dehydrated potato. *Food Chemistry*, 108, 900-906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.057>
- Ačkar, Đ., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Balentić, J. P., & Šubarić, D. (2018). Resolving the problem of poor expansion in corn extrudates enriched with food industry by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.004>
- Agudelo-Laverde, L. M., Schebor, C., & Buera, M. P. (2013). Water content effect on the chromatic attributes of dehydrated strawberries during storage, as evaluated by image analysis. *LWT – Food Science and Technology*, 52, 157-162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.022>
- Ai, Y., & Jane, J. (2016). Macronutrients in corn and human nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 581-598. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12192>
- Ajita, T., & Jha, S. K. (2017). Extrusion Cooking Technology: Principal Mechanism and Effect on Direct Expanded Snacks – An Overview. *International Journal of Food Studies*, 6, 113-128. <https://doi.org/10.7455/ijfs/6.1.2017.a10>
- Almeida, M. R., Alves, R. S., Nascimbem, L. B. L. R., Stephani, R., Poppi, J., & de Oliveira, F. C. (2010). Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2693-2701. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3566-2>

Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. A. (2018). Composition, protein profile and rheological properties of pseudocereal-based protein-rich ingredients. *Foods*, 7, 73. <https://doi.org/10.3390/foods7050073>

Althwab, S., Carr, T. P., Weller, C. L., Dweikat, I. M., & Schlegel, V. (2015). Advances in grain sorghum and its co-products as a human health promoting dietary system. *Food Research International*, 77, 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.011>

Ameur, L. A., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2006). Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry*, 98(4), 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.038>

Amft, J., Bauer, J. L., Rostek, J., Spielvogel, S., & Schwarz, K. (2019). Effect of water addition on the microstructure, lipid incorporation, and lipid oxidation of corn extrudates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121, 1800433. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800433>

Appelqvist, I. A. M., Cooke, D., Gidley, M. J., & Lane, S. J. (1993). Thermal properties of polysaccharides at low moisture: 1 – An endothermic melting process and water-carbohydrate interactions. *Carbohydrate Polymers*, 20, 291-299. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(93\)90102-A](https://doi.org/10.1016/0144-8617(93)90102-A)

Arora, B., Yoon, A., Sriram, M., Singha, P., & Rizvi, S. S. H. (2020). Reactive extrusion: A review of the physicochemical changes in food systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64, 102429. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102429>

Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65, 1199-1221. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.001>

Barden, L., & Decker, E. A. (2013). Lipid oxidation in low-moisture food: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2467-2482. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848833>

Batterman-Azcona, S. J., & Hamaker, B. R. (1998). Changes occurring in protein body structure and α -zein during cornflake processing. *Cereal Chemistry*, 75, 217-221. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.2.217>

Beck, S. M., Knoerzer, K., Foerster, M., Mayo, S., Philipp, C., & Arcot, J. (2018). Low moisture extrusion of pea protein and pea fiber fortified rice starch blends. *Journal of Food Engineering*, 231, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.03.004>

Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2012). Lípidos. Química de los alimentos. 3era edición. Editorial Acribia, S. A.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bernardino-Nicanor, A., Acosta-García, G., Güemes-Vera, N., Montañez-Soto, J. L., Vivar-Vera, M. A., & González-Cruz, L. (2017). Fourier transform infrared and Raman

spectroscopic study of the effect of the thermal treatment and extraction methods on the characteristics of acoyote bean starches. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 933-943. [10.1007/s13197-016-2370-1](https://doi.org/10.1007/s13197-016-2370-1)

Bisharat, G. I., Oikonomopoulou, V. P., Panagiotou, N. M., Krokida, M. K., & Maroulis, Z. B. (2013). Effect of extrusion conditions on the structural properties of corn extrudates enriched with dehydrated vegetables. *Food Research International*, 53, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.043>

Blasco, J., Aleixos, N., Gutiérrez, A., & Moltó, E. (2012). Measurement of physical properties of fruits using image analysis. *Physical properties of food: novel measurement techniques and applications*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11542>

Bolsa de Comercio de Rosario. Informes de estimaciones mensual nacional de producción. Julio 2021.

Bosmans, G. M., Pareyt, B., & Delcour, J. A. (2016). Non-additive response of blends of rice and potato starch during heating at intermediate water contents: A differential scanning calorimetry and proton nuclear magnetic resonance study. *Food Chemistry*, 192, 586-595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.056>

Boye, J. I. *Nutraceutical and Functional Food Processing Technology*. Canadá: WILEY Blackwell; 2015.

Busch, V. M., Santagapita, P. R, Díaz-Calderón, P., Enrione, J. I., & Buera, M. P. (2019). About the endothermal transitions of galactomannans: A multi-analytical DSC, LF-¹H-NMR and DMA study. *Carbohydrate Polymers* 211, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.092>

Călinoiu, L. V., & Vodnar, D. C. (2020). Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. *Biomolecules*, 10, 21. [10.3390/biom10010021](https://doi.org/10.3390/biom10010021)

Cervantes-Ramírez, J. E., Cabrera-Ramírez, A. H., Morales-Sánchez, E., Rodríguez-García, M. E., Reyes-Vega, M. A., Ramírez-Jiménez, A. K., Contreras-Jiménez, B. L., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Amylose-lipid complex formation from extruded starch mixed with fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116555>

Chaillou, L. L., & Nazareno, M. A. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8397-8402. <https://doi.org/10.1021/jf061729f>

Chanvrier, H., Colonna, P., Della Valle, G., & Lourdin, D. (2005). Structural and mechanical behavior of corn flour and starch-zein based materials in the glassy state. *Carbohydrate Polymers*, 59, 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.09.005>

Chaunier, L., Della Valle, G., & Lourdin, D. (2007). Relationships between texture, mechanical properties and structure of cornflakes. *Food Research International*, 40, 493-503. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.014>

Chen, L., Tian, Y., Sun, B., Wang, J., Tong, Q., & Jin, Z. (2017). Rapid, accurate, and simultaneous measurement of water and oil contents in the fried starchy system using low-field NMR. *Food Chemistry*, 233, 525-529. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.147>

Choi, S. G., & Kerr, W. L. (2003). ¹H NMR studies of molecular mobility in wheat starch. *Food Research International*, 36, 341-348. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00225-9)

CIE (2001). Improvement to Industrial colour-difference evaluation. Technical Report. Viena, Central Bureau of the CIE: Pub No 142.

Claude, J., & Ubbink, J. (2006). Thermal degradation of carbohydrate polymers in amorphous states: A physical study including colorimetry. *Food Chemistry*, 96, 402-410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.003>

Coulter, L. A., & Lorenz, K. (1991). Extruded corn grits-quinoa blends: II. Physical characteristics of extruded products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15, 243-259. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1991.tb00170.x>

Cova, A., Müller, A. J., Laredo, E., & Sandoval, A. J. (2012). Effect of two different lipid sources on glass transition temperatures and tensile properties of corn semolina. *Journal of Food Engineering*, 113, 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.040>

Cueto, M. A. (2016). Transformaciones físico-químicas de granos de maíz en la elaboración de laminados y extrudados para el desayuno. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5964_Cueto

Cueto, M. A., Pérez Burillo, S., Rufián-Henares, J. A., Farroni, A. E., & Buera, M. P. (2017). Toasting time and cooking formulation affect browning reaction products development in corn flakes. *Cereal Chemistry*, 94(3), 380-384. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-03-16-0053-R>

Cueto, M., Farroni, A., Rodríguez, S. D., Schoenlechner, R., Schleining, G., & Buera, M. P. (2018). Assessing changes in enriched maize flour formulations after extrusion by means of FTIR, XRD, and chemometric analysis. *Food and Bioprocess Technology*, 11(8), 1586-1595. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2113-6>

Cueto, M., Farroni, A., Schöenlechner R., Schleining, G., & Buera, P. (2017). Carotenoid and color changes in traditionally flaked and extruded products. *Food Chemistry*, 229, 640-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.138>

Cueto, M., Porras-Saavedra, J., Farroni, A., Alamilla-Beltrán, L., Schöenlechner R., Schleining, G., & Buera, P. (2015). Physical and mechanical properties of maize extrudates as affected by the addition of chia and quinoa seeds and antioxidants. *Journal of Food Engineering*, 167, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.027>

Cui, H., Yu, J., Zhai, Y., Feng, L., Chen, P., Hayat, K., Xu, Y., Zhang, X., & Ho, C.-T. (2021). Formation and fate of Amadori rearrangement products in Maillard reaction.

Trends in Food Science and Technology, 115, 391-408.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.055>

D'Arcy, R. L., & Watt, I. C. (1970). Analysis of sorption isotherms of non-homogeneous sorbents. *Transactions of the Faraday Society*, 66.

Dalbhagat, C. G., Mahato, D. K., & Mishra, H. N. (2019). Effect of extrusion processing on physicochemical, functional and nutritional characteristics of rice and rice-based products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 85, 226-240.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.001>

Dar, B. N., Sharma, S., & Nayik, G. A. (2016). Effect of storage period on physicochemical, total phenolic content and antioxidant properties of bran enriched snacks. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10, 755-761.
[10.1007/s11694-016-9360-x](https://doi.org/10.1007/s11694-016-9360-x)

Debelo, H., Li, M., & Ferruzzi, M. G. (2020). Processing influences on food polyphenol profiles and biological activity. *Current Opinion in Food Science*, 32, 90-102.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.001>

Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219.
<https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

Dias-Martins, A. M., Pessanha, K. L. F., Pacheco, S., Rodrigues, J. A. S., & Carvalho, C. W. P. (2018). Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: food security, processing, health benefits and nutritional products. *Food Research International*, 109, 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.023>

Fäldt, P., Bergenstahl, B., & Carlson, G. (1993). The surface coverage of lipids on food powders analyzed by ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). *Food Structure*, 12, 225–234.

Fan, D., Ma, W., Wang, L., Huang, J., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2012). Determination of structural changes in microwaved rice starch using Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. *Starch/Stärke*, 64, 598-606.
<https://doi.org/10.1002/star.201100200>

Fan, F., & Roos, Y. (2017). Glass Transition-Associated Structural Relaxations and Applications of Relaxation Times in Amorphous Food Solids: a Review. *Food Engineering Reviews*, 9, 257-270. <https://doi.org/10.1007/s12393-017-9166-6>

Farroni, A. E. (2011). Transformaciones estructurales y físico-químicas de maíces argentinos en la producción de alimentos obtenidos por procesos de gelatinización-laminación. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Farroni, A. E., & Buera, M. del P. (2014). Cornflake Production Process: State Diagram and Water Mobility Characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2902-2911.
<https://doi.org/10.1007/s11947-014-1270-5>

Farroni, A. E., Matiacevich, S. B., Guerrero, S., Alzamora, S., & Buera, P. (2008). Multi-level approach for the analysis of water effects in corn flakes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6447-6453. <https://doi.org/10.1021/jf800541f>

Farroni, A., & Buera, M. P. (2012). Color and surface fluorescence development and their relationship with Maillard reaction markers as influenced by structural changes during cornflakes production. *Food Chemistry*, 135, 1685-1691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.114>

Favre, L. C., Rolandelli, G., Mshicileli, N., Vhangani, L. N., dos Santos Ferreira, C., van Wyk, J., & Buera, M. P. (2020). Antioxidant and anti-glycation potential of green pepper (*Piper nigrum*): Optimization of β -cyclodextrin-based extraction by response surface methodology. *Food Chemistry*, 316, 126280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126280>

Félix-Medina, J. V., Montes-Ávila, J., Reyes-Moreno, C., Perales-Sánchez, J. X. K., Gómez-Favela, M. A., Aguilar-Palazuelos, E., & Gutiérrez-Dorado, R. (2020). Second-generation snacks with high nutritional and antioxidant value produced by an optimized extrusion process from corn/common bean flours mixtures. *LWT – Food Science and Technology*, 124, 109172. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109172>

Fetterman, M. R. (2005). Fourier-transform infrared derivative spectroscopy with an improved signal-to-noise ratio. *Optics Letters*, 30, 2311-2313. [10.1364/ol.30.002311](https://doi.org/10.1364/ol.30.002311)

Fullerton, G. D., & Cameron, I. L. (1988). Relaxation of biological tissues. In F. W. Wehrli & J. B. Kneeland (Eds.), *Biomedical magnetic resonance imaging principles, methodology, and application* (pp. 115–155). New York, USA: VCH Publishers Inc.

Furmaniak, S., Terzyk, A. P., Gołembiewski, R., Gauden, P. A. & Czepirski, L. (2009). Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Research International*, 42, 1203–1214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.004>

Gerrano, A. S., Labuschagne, M. T., van Biljon, A., & Shergie, N. G. (2014). Genetic variability among sorghum accessions for seed starch and stalk total sugar. *Scientia Agricola*, 71, 472-479. <http://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0322>

Giovanelli, G., & Cappa, C. (2021). 5-hydroxymethylfurfural formation in bread as a function of heat treatment intensity: correlations with browning indices. *Foods*, 10, 417. <https://doi.org/10.3390/foods10020417>

Gökmen, V., Çetinkaya Açı̄ar, Ö., Köksel, H., & Acar, J. (2007). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, 104, 1136-1142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.008>

Gómez-Narváez, F., Pérez-Martínez, L., & Contreras-Calderón, J. (2019). Usefulness of some Maillard reaction indicators for monitoring the heat damage of whey powder under conditions applicable to spray drying. *International Dairy Journal*, 99, 104553. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104553>

Gonzalez, D. C., Khalef, N., Wright, K., Okos, M. R., Hamaker, B. R., & Campanella, O. H. (2010). Physical aging of processed fragmented biopolymers. *Journal of Food Engineering*, 100, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.009>

Gordon, M., & Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*, 2, 493-500. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010020901>

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry*. 81, 89-96.

Guimarães, J. L., Wypych, F., Saul, C. K., Ramos, L. P., & Satyanarayana, K. G. (2010). Studies of the processing and characterization of corn starch and its composites with banana and sugarcane fibers from Brazil. *Carbohydrate Polymers*, 80, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.002>

Gulati, P., Brahma, S., & Rose, D. J. (2020). Impacts of extrusion processing on nutritional components in cereals and legumes: Carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, and minerals. En: *Extrusion cooking. Cereal grains processing*. Ed: Ganjyal, G. M. Woodhead Publishing and AACC International Press, 415-443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815360-4.00013-4>

Gümüşay, Ö. A., Şeker, M., & Sadıkoğlu, M. (2019). Response surface methodology for evaluation of the effects of screw speed, feed moisture and xanthan gum level on functional and physical properties of corn half products. *LWT – Food Science and Technology*, 111, 622-631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.083>

Hahn, E. L. (1950). Spin echoes. *Physical Reviews*, 80(4), 580-594.

Hall, C. (2010). Oxidation of cereals and snack products. En: *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. Ed: Decker, E. A., Elias, R. J., & McClements, D. J. Woodhead Publishing, 369-390. <https://doi.org/10.1533/9780857090331.2.369>

Hemdane, S., Jacobs, P. J., Bosmans, G. M., Verspreet, J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2017). Study of biopolymer mobility and water dynamics in wheat bran using time-domain ¹H NMR relaxometry. *Food Chemistry*, 236, 68-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.020>

Ildiz, G. O., Kabuk, H. N., Kaplan, E. S., Halimoglu, G., & Fausto, R. (2019). A comparative study of the yellow dent and purple flint maize kernel components by Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Molecular Structure*, 1184, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.034>

Ilo, S., Schoenlechner, R., & Berghofe, E. (2000). Role of lipids in the extrusion cooking processes. *Grasas y aceites*, 51, 97-110. <https://doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i1-2.410>

Irani, M., Abdel-Aal., E. S. M., Razavi, S. M. A., Hucl, P., & Patterson, C. A. (2017). Thermal and functional properties of hairless canary seed (*Phalaris canariensis* L.) starch in comparison with wheat starch. *Cereal Chemistry*, 94, 341-348. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-16-0083-R>

Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2017). Effect of extrusion cooking on chemical structure, morphology, crystallinity and thermal properties of sorghum flour extrudates. *Journal of Cereal Science*, 75, 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.05.005>

Jan, R., Saxena, D. C., & Singh, S. (2017). Effect of storage conditions and packaging materials on the quality attributes of gluten-free extrudates and cookies made from germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 1071-1080. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9484-7>

Jebalia, I., Maigret, J-E., Réguerre, A-L., Novales, B., Guessasma, S., Lourdin, D., Della-Valle, G., & Kristiawan, M. (2019). Morphology and mechanical behavior of pea-based starch-protein composites obtained by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115086. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115086>

Kasprzak, M., Rzedzicki, Z., Wirkijowska, A., Zarzycki, P., Sobota, A., Sykut-Domańska, E., & Błaszcak, W. (2013). Effect of fiber-protein additions and process parameters on microstructure of corn extrudates. *Journal of Cereal Science*, 58, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.09.002>

Katz, E. E., & Labuza, T. P. (1981). Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04871.x>

Kim, M. Y., Yoon, N., Lee, Y. J., Woo, K. S., Kim, H. Y., Lee, J., & Jeong, H. S. (2020). Influence of thermal processing on free and bound forms of phenolics and antioxidant capacity of rice hull (*Oryza sativa* L.). *Preventive Nutrition and Food Science*, 25, 310-318. [10.3746/pnf.2020.25.3.310](https://doi.org/10.3746/pnf.2020.25.3.310)

Kovrlija, R., & Rondeau-Mouro, C. (2017). Hydrothermal changes in wheat starch monitored by two-dimensional NMR. *Food Chemistry*, 214, 412-422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.051>

Kovrlija, R., & Rondeau-Mouro, C. (2017). Hydrothermal changes of starch monitored by combined NMR and DSC methods. *Food Bioprocess Technology*, 10, 445-461. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1832-9>

Kovrlija, R., Goubin, E., & Rondeau-Mouro, C. (2020). TD-NMR studies of starches from different botanical origins: Hydrothermal and storage effects. *Food Chemistry*, 308, 125675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125675>

Kręcisz, M., Wójtowicz, A., & Oniszczyk, A. (2015). Effect of selected parameters on process efficiency and energy consumption during the extrusion-cooking of corn-rice instant grits. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 7, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.12.008>

Krishnan, V., Mondal, D., Thomas, B., Singh, A., & Praveen, S. (2021). Starch-lipid interaction alters the molecular structure and ultimate starch bioavailability: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 626-638. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.030>

Kumar, R., Martin Xavier, K. A., Lekshmi, M., Balange, A., & Gudipati, V. (2018). Fortification of extruded snacks with chitosan: Effects on techno functional and sensory quality. *Carbohydrate Polymers*, 194, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.050>

Labuza, T. P., & Dugan, L. R. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 2, 355-405. <https://doi.org/10.1080/10408397109527127>

Lestienne, I., Buisson, M., Lullien-Pellerin, V., Picq, C., & Trèche, S. (2007). Losses of nutrients and anti-nutritional factors during abrasive decortication of two pearl millet cultivars (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 100, 1316-1323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.027>

Lewicki, P. P. (1997). The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. *International Journal of Food Science & Technology*, 32, 553-557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb02131.x>

Li, W., & Beta, T. (2012). An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canaryseed. *Food Chemistry*, 133, 782-786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.092>

Li, W., Qiu, Y., Patterson, C. A., & Beta, T. (2011). The analysis of phenolic constituents in glabrous canaryseed groats. *Food Chemistry*, 127, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.033>

Lin, X., Ruan, R., Chen, P., Chung, M., Ye, X., Yang, T., Doona, C., & Wagner, T. (2006). NMR state diagram concept. *Journal of Food Science*, 71(9), 136-145. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00193.x>

Liu, Y., Bhandari, B., & Zhou, W. (2006). Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5701-5717. <https://doi.org/10.1021/jf060188r>

Magnuson, B. A., Patterson, C. A., Hucl, P., Newkirk, R. W., Ram, J. I., & Classen, H. L. (2014). Safety assessment of consumption of glabrous canary seed (*Phalaris canariensis* L.) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.041>

Mahajan, P., Bera, M. B., Panesar, P. S., & Chauhan, A. (2021). Millet starch: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 61-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.063>

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364-373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)

Masavang, S., Roudaut, G., & Champion, D. (2019). Identification of complex glass transition phenomena by DSC in expanded cereal-based food extrudates: Impact of plasticization by water and sucrose. *Journal of Food Engineering*, 245, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.008>

Mason, E., L'Hocine, L., Achouri, A., & Karboune, S. (2018). Hairless canaryseed: a novel cereal with health promoting potential. *Nutrients*, 10, 1-16. [10.3390/nu10091327](https://doi.org/10.3390/nu10091327)

Mehmood, S., Orhan, I., Ahsan, Z., Aslan, S., & Gulfraz, M. (2008). Fatty acid composition of seed oil of different *Sorghum bicolor* varieties. *Food Chemistry*, 109, 855-859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.014>

Mesías, M., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2019). Risk/benefit evaluation of traditional and novel formulas for snacking: Acrylamide and furfurals as process contaminants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 79, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.03.011>

Mesías, M., Sáez-Escudero, L., Morales, F. J., & Delgado-Andrade, C. (2019). Reassessment of acrylamide content in breakfast cereals. Evolution of the Spanish market from 2006 to 2018. *Food Control*, 105, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.026>

Ministerio de Desarrollo Productivo, Centro de Estudios para la Producción. Informe de Coyuntura Agrícola, Junio 2020.

Mir, S. A., Bosco, S. J. D., Bashir, M., Shah, M. A., & Mir, M. M. (2016). Physicochemical and structural properties of starches isolated from corn cultivars grown in Indian temperate climate. *International Journal of Food Properties*, 20, 821-832. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1184274>

Moisio, T., Forssell, P., Partanen, R., Damerau, A., & Hill, S. E. (2015). Reorganization of starch, proteins and lipids in extrusion of oats. *Journal of Cereal Science*, 64, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.001>

Morales, P., Cebadera-Miranda, L., Cámara, R. M., Reis, F. S., Barros, L., De J. Berrios, J., Ferreira, I. C. F. R., & Cámara, M. (2015). Lentil flour formulations to develop new snack-type products by extrusion processing: Phytochemicals and antioxidant capacity. *Journal of functional foods*, 19, 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.044>

Mua, J. P., & Jackson, D. S. (1997). Relationships between functional attributes and molecular structure of amylose and amylopectin fractions from corn starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3848-3854. <https://doi.org/10.1021/jf9608783>

Navruz-Varli, S., & Sanlier, N. (2016). Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Cereal Science*, 69, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.05.004>

Nawaz, M. A., Gaiani, C., Fukai, S., & Bhandari, B. (2016). X-ray photoelectron spectroscopic analysis of rice kernels and flours: Measurement of surface chemical composition. *Food Chemistry*, 212, 349-357. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.188>

Nguyen, H. T., van der Fels-Klerx, H. J. I., & van Boekel, M. A. J. S. (2017). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during biscuit baking. Part II: Effect of the ratio of reducing sugars and asparagine. *Food Chemistry*, 230, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.009>

Nguyen, H. T., Van der Fels-Klerx, H. J. I., Peters, R. J. B., & Van Boekel, M. A. J. S. (2016). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type. *Food Chemistry*, 192, 575-585. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.016>

Nickel, J., Pio Spanier, L., Torma Botelho, F., Arocha Gularce, M., & Helbig, E. (2016). Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. *Food Chemistry*, 209, 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.031>

Nikmaram, N., Garavand, F., Elhamirad, A., Beiraghi-toosi, S., & Goli-movahhed, G. (2015). Production of high quality expanded corn extrudates containing sesame seed using response surface methodology. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7(5), 713–720. <https://doi.org/10.3920/QAS2014.0507>

Nithya, D. J., Saravanan, M., Jagan Mohan, R., & Alagusundaram, K. (2014). Influence of moisture, particle size and pulse flour composition on phase transition behavior of rice flour. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2485-2488. [10.1007/s13197-014-1568-3](https://doi.org/10.1007/s13197-014-1568-3)

Nowak, V., Du, J., & Charrondière, U. R. (2016). Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chemistry*, 193, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>

Ogawa, T., & Adachi, S. (2014). Measurement of moisture profiles in pasta during rehydration based on image processing. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1465-1471. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1156-y>

Oliveira, L. C., Alencar, N. M. M., & Steel, C. J. (2018). Improvement of sensorial and technological characteristics of extruded breakfast cereals enriched with whole grain wheat flour and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel. *LWT – Food Science and Technology*, 90, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.017>

Ortak, M., Caltinoglu, C., Sensoy, I., Karakaya, S., & Mert, B. (2017). Changes in functional properties and *in vitro* bioaccessibilities of β-carotene and lutein after extrusion processing. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 3543-3551. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2812-4>

Patterson, C. A., Malcolmson, L., Lukie, C., Young, G., Hucl, P., & Abdel-Aal, E.-S. M. (2018). Glabrous canary seed: A novel food ingredient. *Cereal Foods World*, 63, 194–200. <https://doi.org/10.1094/CFW-63-5-0194>

Pepa, L. S., Rodríguez, S. D., dos Santos Ferreira, C., & Buera, M. P. (2020). Interpretation of the color due to the ubiquitous nonenzymatic browning phenomena in foods. *Color Research and Application*, 1-10. <https://doi.org/10.1002/col.22574>

Pérez-Lucas, C., & Yaylayan, V. A. (2010). The Maillard reaction and food quality deterioration. En: *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Eds: Skibsted, L. H., Risbo, J., & Andersen, M. L. Woodhead Publishing, 70-94. <https://doi.org/10.1533/9781845699260.1.70>

Philipp, C., Emin, M. A., Buckow, R., Silcock, P., & Oey, I. (2018). Pea protein-fortified extruded snacks: Linking melt viscosity and glass transition temperature with expansion behavior. *Journal of Food Engineering*, 217, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.022>

Philipp, C., Oey, I., Silcock, P., Beck, S. M., & Buckow, R. (2017). Impact of protein content on physical and microstructural properties of extruded rice starch-pea protein snacks. *Journal of Food Engineering*, 212, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.024>

Porras-Saavedra, J., Favre, L. C., Alamilla-Beltrán, L., Mazzobre, M. F., Gutiérrez-López, G. F., & Buera, M. P. (2019). Thermal transitions and enthalpic relaxations as related to the stability of microencapsulated paprika powders. *Journal of Food Engineering*, 245, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.010>

Porras-Saavedra, J., Palacios-González, E., Lartundo-Rojas, L., Garibay-Febles, V., Yáñez-Fernández, J., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., & Alamilla-Beltrán, L. (2015). Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 152, 105-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.014>

Quijano-Ortega, N., Fuenmayor, C. A., Zuluaga-Domínguez, C., Diaz-Moreno, C., Ortiz-Grisales, M., & Grassi, S. (2020). FTIR-ATR spectroscopy combined with multivariate regression modeling as a preliminary approach for carotenoids determination in *Cucurbita* spp. *Applied Sciences*, 10, 3722. <https://doi.org/10.3390/app10113722>

Ramos Díaz, J. M., Kirjoranta, S., Tenitz, S., Penttilä, P. A., Serimaa, R., Lampi, A. M., & Jouppila, K. (2013). Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks. *Journal of Cereal Science*, 58, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.003>

Ramos Díaz, J. M., Rinnan, Å., & Jouppila, K. (2019). Application of NIR imaging to the study of expanded snacks containing amaranth, quinoa and kañiwa. *LWT – Food Science and Technology*, 102, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.029>

Rashwan, A. K., Yones, H. A., Karim, N., Taha, E. M., & Chen, W. (2021). Potential processing technologies for developing sorghum-based food products: an update and comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.087>

Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J-M., & Mattila, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>

Reszczynska, E., Welc, R., Grudzinski, W., Trebacz, K., & Gruszecki, W. I. (2015). Carotenoid binding to proteins: Modeling pigment transport to lipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 584, 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.09.004>

Reyes Moreno, C., Reyes Fernández, P. C., Cuevas Rodríguez, E. O., Milán Carrillo, J., & Rochín, S. M. (2018). Changes in nutritional properties and bioactive compounds in

cereals during extrusion cooking. En: *Extrusion of metals, polymers, and food products*. Ed: Qamar, S. Z. IntechOpen. 103-124. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68753>

Robin, F., Schuchmann, H. P., & Palzer, S. (2012). Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities. *Trends in Food Science and Technology*, 28, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.008>

Rolandelli, G., Gallardo-Navarro, Y. T., García-Pinilla, S., Farroni, A. E., Gutiérrez-López, G. F., & Buera, M. P. (2021). Components interactions and changes at molecular level in maize flour-based blends as affected by the extrusion process. A multi-analytical approach. *Journal of Cereal Science*, 103186. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103186>

Rolandelli, G., García Navarro, Y. T., García Pinilla, S., Farroni, A. E., Gutiérrez López, G. F., & Buera, M. P. (2020). Microstructural characteristics and physical properties of corn-based extrudates affected by the addition of millet, sorghum, quinoa and canary seed flour. *Food Structure*, 25, 100140. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100140>

Romani, S., Rocculi, P., Tappi, S., & Dalla Rosa, M. (2016). Moisture adsorption behaviour of biscuit during storage investigated by using a new Dynamic Dewpoint method. *Food Chemistry*, 195, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.114>

Roos, Y. H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 469-496. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124139>

Roudaut, G., Farhat, I., Poirier-Brulez, F., & Champion, D. (2009). Influence of water, temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field ¹H NMR. *Carbohydrate Polymers*, 77, 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.029>

Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. (2016). Maize – a potential source of human nutrition and health: a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1166995. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1166995>

Ruan, R. R., & Chen, P. L. (1998). Nuclear magnetic resonance techniques. En *Water in foods and biological materials: a nuclear magnetic resonance approach* (pp. 17-24). Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Co.

Rufián-Henares, J. Á., & Pastoriza, S. (2016). Browning: Non-enzymatic browning. *Encyclopedia of Food and Health*, 515-521. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00089-1>

Rufián-Henares, J. Á., & Delgado-Andrade, C. (2009). Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Research International*, 42, 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.011>

Rufián-Henares, J. Á., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2009). Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chemistry*, 114, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.021>

Sahu, C., & Patel, S. (2020). Moisture sorption characteristics and quality changes during storage in defatted soy incorporated maize-millet based extruded product. *LWT – Food Science and Technology*, 133, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110153>

Saldanha do Carmo, C., Varela, P., Poudroux, C., Dessev, T., Myhrer, K., Rieder, A., Zobel, H., SahlstrØm, S., & Knutsen, S. H. (2019). The impact of extrusion parameters on physicochemical, nutritional and sensorial properties of expanded snacks from pea and oat fractions. *LWT – Food Science and Technology*, 112, 108252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108252>

Scanlin, L., & Lewis, K. A. (2017). Quinoa as a sustainable protein source: production, nutrition, and processing. En: *Sustainable Protein Sources*. Eds: Nadathur, S. R., Scanlin, L., & Wanasundara, J. P. D. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00014-7>

Schaich, K. M. (2013). Challenges in elucidating lipid oxidation mechanisms. When, where, and how do products arise? En: *Lipid oxidation. Challenges in Food Systems*. Ed: Logan, A., Nienaber, U., & Pan, X. Academic Press and AOCS Press, 1-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-6-3.50004-7>

Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77, 421-424. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.421>

Sheng, S., Li, T., & Liu, R. (2018). Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 7, 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.003>

Shogren, R. L. (1992). Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. *Carbohydrate Polymers*, 19, 83-90. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90117-9](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90117-9)

Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219-231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)

Singha, P., Singh, S. K., Muthukumarappan, K., & Krishnan, P. (2018). Physicochemical and nutritional properties of extrudates from food grade distiller's dried grains, garbanzo flour, and corn grits. *Food Science and Nutrition*, 1-13. <https://doi.org/10.1002/fsn3.769>

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Song, J., Sun, C., Gul, K., Mata, A., & Fang, Y. (2021). Prolamin-based complexes: Structure design and food-related applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1120-1149. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12713>

Srikaeo, K., & Rahman, M. S. (2018). Proton relaxation of waxy and non-waxy rice by low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) to their glassy and rubbery states. *Journal of Cereal Science*, 82, 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.014>

Sruthi, N. U., & Rao, P. S. (2021). Effect of processing on storage stability of millet flour: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.043>

Strocchi, A. (1982). Fatty acid composition and triglyceride structure of corn oil, hydrogenated corn oil, and corn oil margarine. *Journal of Food Science*, 47, 36-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb11021.x>

Suma, F., & Urooj, A. (2015). Isolation and characterization of starch from pearl millet (*Pennisetum typhoidium*) flours. *International Journal of Food Properties*, 18, 2675-2687. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.981640>

Sumithra, B., & Bhattacharya, S. (2008). Toasting of corn flakes: Product characteristics as a function of processing conditions. *Journal of Food Engineering*, 88, 419-428. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.001>

Suriano, S., Balconi, C., Valoti, P., & Redaelli, R. (2021). Comparison of total polyphenols, profile anthocyanins, color analysis, carotenoids and tocopherols in pigmented maize. *LWT – Food Science and Technology*, 144, 111257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111257>

Taylor, J. R. N., & Emmambux, M. N. (2008). Products containing other speciality grains: sorghum, the millets and pseudocereals. En: *Technology of Functional Cereal Products*. Ed: Hamaker, B. R. CRC Press, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. <https://doi.org/10.1533/9781845693886.2.281>

Taylor, J. R. N., Belton, P. S., Beta, T., & Duodu, K. G. (2014). Increasing the utilization of sorghum, millets and pseudocereals: Developments in the science of their phenolic phytochemicals, biofortification and protein functionality. *Journal of Cereal Science*, 59, 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.009>

Téllez-Morales, J. A., Herman-Lara, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Rodríguez-Miranda, J. (2020). Techno-functional properties of the starch-protein interaction during extrusion-cooking of a model system (corn starch and whey protein isolate). *LWT – Food Science and Technology*, 132, 109789. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109789>

Van Den Berg C. y Bruin S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. En: *Water Activity: Influence on Food Quality*. L. Rockland y G. Stewart. New York, Academic Press: 1-61.

Van Der Fels-Klerx, H. J., Capuano, E., Nguyen, H. T., Ataç Mogol, B., Kocadağlı, T., GöncüoğluTaş, N., Hamzalioğlu, A., Van Boekel, M. A. J. S., & Gökmen., V. (2014). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature-time profile effects and kinetics. *Food Research International*, 57, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.039>

van Nieuwenhuijzen, N. H., Tromp, R. H., Mitchell, J. R., Primo-Martín, C., Hamer, R. J., & van Vliet, T. (2010). Relations between sensorial crispness and molecular mobility of model bread crust and its main components as measured by PTA, DSC and NMR. *Food Research International*, 43, 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.015>

Vilcacundo, R., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Current Opinion in Food Science*, 14, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.007>

Wang, K., Sun, D. W., Pu, H., & Wei, Q. (2017). Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.015>

Wang, Y., Chen, L., Yang, T., Ma, Y., McClements, D. J., Ren, F., Tian, Y., & Jin, Z. (2021). A review of structural transformations and properties changes in starch during thermal processing of foods. *Food Hydrocolloids*, 113, 106543. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106543>

Wani, S. A., & Kumar, P. (2016). Moisture sorption isotherms and evaluation of quality changes in extruded snacks during storage. *LWT – Food Science and Technology*, 74, 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.005>

Warren, F. J., Gidley, M. J., & Flanagan, B. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to characterize starch ordered structure – a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydrate Polymers*, 139, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.066>

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., & Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta A*, 185, 317-335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>

Yadav, U., Singh, R. R. B., & Arora, S. (2018). Evaluation of quality changes in nutritionally enriched extruded snacks during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3939-3948. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3319-3>

Yam, K. L., & Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61, 137-142. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00195-X)

Yang, G., Wang, Q., Liu, C., Wang, X., Fan, S., & Huang, W. (2018). Rapid and visual detection of the main chemical compositions in maize seeds based on Raman hyperspectral imaging. *Spectrochimica Acta A*, 200, 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.04.026>

Yousaf, L., Hou, D., Liaqat, H., & Shen, Q. (2021). Millet: a review of its nutritional and functional changes during processing. *Food Research International*, 142, 110197. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110197>

Zhang, X., Chen, Y., Zhang, R., Zhong, Y., Luo, Y., Xu, S., Liu, J., Xue, J., & Guo, D. (2016). Effects of extrusion treatment on physicochemical properties and *in vitro* digestion of pregelatinized high amylose maize flour. *Journal of Cereal Science*, 68, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.01.005>

Zhang, Y., Zhao, X., Bao, X., Xiao, J., & Liu, H. (2021). Effects of pectin and heat-moisture treatment on structural characteristics and physicochemical properties of corn

starch. *Food Hydrocolloids*, 117, 106664.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106664>

Zhao, G., Kuang, G., Wang, Y., Yao, Y., Zhang, J., & Pan, Z. (2020). Effect of steam explosion on physicochemical properties and fermentation characteristics of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *LWT – Food Science and Technology*, 129, 109579.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109579>

Zobel, H. F. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch*, 40, 1-7. <https://doi.org/10.1002/star.19880400102>