



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

Enriquecimiento de alimentos funcionales a base de Soja
(*Glycine max*) y Nuez de Macadamia (*Macadamia
tetraphylla*) con Omega-3 y Probióticos

SANDRA ALVAREZ TRINIDAD

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Febrero – 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

Enriquecimiento de alimentos funcionales a base de Soja (*Glycine max*) y Nuez de Macadamia (*Macadamia tetraphylla*) con Omega-3 y Probióticos

SANDRA ALVAREZ TRINIDAD

Orientador: **PhD. DANIELA LAMAS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Febrero – 2020

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)

DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

Enriquecimiento de alimentos funcionales a base de soja (*Glycine max*) y nuez de macadamia (*Macadamia tetraphylla*) con Omega-3 y probióticos

SANDRA ALVAREZ TRINIDAD

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial.

Fecha de aprobación: de de 2020.

MESA EXAMINADORA}

MIEMBROS:

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Autónoma de Barcelona, España

Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de la Pampa, Argentina

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha de de 2019.

Prof. MSc. Andrea Weiler

Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres

Don Esteban Antonio Alvarez y Doña Catalina Trinidad de Alvarez que me dieron su apoyo en todo momento

A mis Hermanas Mariam Alvarez Trinidad y Katherine Alvarez Trinidad que también me han acompañado de cerca

A mis compañeros de maestría en quienes nos apoyamos mutuamente para llegar a la meta

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial. Al Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero – INIDEP de la ciudad de Mar del Plata, Argentina, por el apoyo al trabajo de tesis y recibimiento en sus laboratorios.

Enriquecimiento de alimentos funcionales a base de Soja (*Glycine max*) y Nuez de Macadamia (*Macadamia tetraphylla*) con Omega-3 y Probióticos

Autor: SANDRA ALVAREZ TRINIDAD

Orientador: DR. DANIELA LAMAS

RESUMEN

El consumo de alimentos funcionales que contribuyen benéficamente con la salud humana es un tema relevante de actualidad, las bebidas vegetales constituyen una nueva alternativa de gran aceptación por parte de los consumidores y las galletitas son productos de consumo habitual, que desempeñan un papel importante en el requerimiento de energía debido a su importante aporte de carbohidratos y fibra dietética. Sin embargo, estos productos tienden a ser bajos en ciertos nutrientes como proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). La soja y la nuez de macadamia, son cultivos de gran interés a nivel industrial debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, sin embargo, no presentan cantidades detectables PUFAs de la serie eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Estos ácidos grasos se destacan por los notables beneficios de su consumo sobre la salud humana y su principal fuente son los aceites de pescado. En el caso de las bebidas vegetales, el uso de probióticos ha aumentado notablemente en la industria de los alimentos, ya que estos consiguen obtener efectos beneficiosos para la mejora en la salud de la población en general y es de gran importancia que lleguen vivos al intestino en un número adecuado, por lo cual utilizarlos en forma de capsulas es una solución para que las bacterias lleguen vivas en el proceso de digestión. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar bebidas y galletitas enriquecidos en ácidos grasos Omega-3 provenientes de aceite de hígado de raya, en forma de capsulas y emulsiones, y bebidas vegetales con probióticos, logrando obtener productos estables y de buen aspecto, con un contenido nutricional importante a nivel proteico en especial las galletitas a base de soja con un porcentaje del 17%, resultado bastante alto con respecto a lo obtenido en otros trabajos y de un alto nivel ácidos grasos en ambos productos.

Palabras clave: nuez de macadamia, soja, alimentos funcionales, Omega-3, probióticos

Título del trabajo de investigación en inglés

Author: SANDRA ALVAREZ TRINIDAD

Advisor: DR. DANIELA LAMAS

SUMMARY

The consumption of functional foods that contribute beneficially to human health is a relevant current issue, vegetable drinks are a new alternative that is widely accepted by consumers and cookies are products of regular consumption, which play an important role in energy requirement due to its important contribution of carbohydrates and dietary fiber. However, these products tend to be low in certain nutrients such as protein and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Soybeans and macadamia nuts are crops of great interest at an industrial level due to their beneficial properties for health, however, they do not present detectable amounts of PUFAs from the eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) series. These fatty acids stand out for the remarkable benefits of their consumption on human health and their main source is fish oils. In the case of vegetable drinks, the use of probiotics has increased remarkably in the food industry, since they manage to obtain beneficial effects for the improvement of the health of the general population and it is of great importance that they reach the intestine alive in an adequate number, so using them in capsule form is a solution for bacteria to arrive alive in the digestion process. The objective of this work was to develop beverages and cookies enriched in Omega-3 fatty acids from ray liver oil, in the form of capsules and emulsions, and vegetable drinks with probiotics, achieving stable and good-looking products, with a content Nutritional content at a protein level, especially soy-based cookies with a percentage of 17%, a fairly high result compared to that obtained in other works and a high level of fatty acids in both products.

Keywords: Macadamia nuts, Soybean, Functional foods, Omega-3, Probiotics

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.	Tema de investigación	12
1.2.	Planteamiento del problema	14
1.3.	Pregunta de investigación	16
1.4.	Justificación	16
1.5.	Objetivos.....	17
1.6.	Hipótesis.....	18
2.	MARCO TEÓRICO.....	18
2.1.	Antecedentes.....	18
2.2.	Bebidas vegetales	19
2.3.	Bebida Vegetal a Base de Soja (Glycine max).....	20
	2.3.1. Características generales	22
	2.3.2. Composición química de la soja.....	23
2.4.	Bebida vegetal a base de Nuez de macadamia (Macadamia integrifolia).....	25
	2.4.1. Características generales.....	26
	2.4.2. Composición Química de la Nuez de Macadamia	27
2.5.	Alimentos Funcionales.....	29
	2.5.1 Probióticos.....	30
	2.5.2 Ácidos Grasos.....	31
3.	METODOLOGÍA.....	32
3.1.	Elaboración de productos a base de soja: PRIMER LOTE	32
	3.1.2. Caracterización de la materia prima	33
	3.1.3 Protocolo de elaboración de las cápsulas de Omega-3 y las cápsulas de probióticos.....	34
	3.1.4. Protocolo de elaboración y formulaciones de las bebidas de soja	35
	3.1.5 Elaboración de Galletitas de Okara	38
	3.1.6. Parámetros fisicoquímicos de calidad	39

3.1.7.	Análisis sensorial de los alimentos formulados.....	40
3.2.	Elaboración de productos a base de soja: SEGUNDO LOTE.....	40
3.3.	Elaboración de productos a base de nuez de macadamia	42
3.3.1.	Materia prima para la elaboración de bebidas de Nuez de Macadamia.....	42
3.3.2.	Caracterización de la materia prima	42
3.3.4.	Protocolo de elaboración y formulaciones de las bebidas de nuez de macadamia	43
3.3.6.	Protocolo y formulación de Galletitas de Nuez	45
3.3.7.	Análisis sensorial de los alimentos formulados	47
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1.	Resultados de resistencia de la cepa <i>Lactobacillus rhamnosus</i> como probiótico.....	48
4.2.	Resultados obtenidos en productos a base de Soja.....	50
4.2.1.	Caracterización de la materia prima	50
4.2.2.	Caracterización fisicoquímica de las bebidas vegetales de soja	51
4.2.2.1.	Caracterización Microbiológica de las semillas y bebidas vegetales de soja.....	57
4.2.3.	Caracterización fisicoquímica de las galletitas de soja	57
4.2.4.	Análisis sensorial de los productos obtenidos	60
4.3.	Resultados obtenidos de productos a base de nuez de macadamia.....	62
4.3.1.	Características fisicoquímicas de los frutos de Nuez de Macadamia	62
4.3.2.	Elaboración y formulaciones de las leches.....	64
4.3.3.	Perfil lipídico de las Nueces de Macadamia	65
4.3.4.	Caracterización fisicoquímica de las Bebidas de Nuez de Macadamia	66

4.3.6. Análisis sensorial de las bebidas de Nuez de Macadamia.....	73
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	74
5.1. Conclusion.....	74
5.2. Recomendaciones.....	75
6. BIBLIOGRAFIA.....	76

INTRODUCCION

Las denominadas leches vegetales, o mejor llamadas bebidas vegetales, están en el centro de atención gracias a sus características de ser libres de lactosa y colesterol, que se encuadra correctamente con la demanda actual de productos alimenticios saludables o enriquecidos. Sin embargo, y a excepción de la soja, hay poca información disponible sobre este tipo de bebidas y sus derivados provenientes de otros frutos secos o semillas. Sobre la información obtenida por Bernat *et al.*, (2014), las bebidas vegetales y sus derivados tienen excelentes propiedades nutricionales que les proporcionan un alto potencial y una expectativa de mercado positiva. Sin embargo, se deben investigar las condiciones óptimas de procesamiento para cada materia prima o la aplicación de nuevas tecnologías para mejorar la calidad de los productos. Además, según Comarella *et al.*, (2012), la creciente búsqueda de alimentos que no solo satisfagan las necesidades básicas, sino que también realicen otras funciones beneficiosas para la salud, impulsa a la investigación dirigida al desarrollo de nuevas tecnologías capaces de agregar valor nutricional a los alimentos, sin causar pérdidas en la calidad sensorial y así, proporcionar un producto seguro para el consumidor y con una generación mínima de residuos perjudiciales para el medio ambiente.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, la soja (*Glycine max*) es un cultivo muy interesante debido a la versatilidad de la aplicación de sus productos para alimentación humana. Los principales productos derivados de la misma son el tofu, el yogur de soja, la proteína texturizada, el miso, la salsa de soja, el concentrado y aislado proteico, el aceite refinado, el salvado, la harina, el extracto de soja hidrosoluble y la

bebida de soja. Además de estos derivados en la industria alimenticia, la soja está presente en la composición de muchos productos como embutidos, chocolates, especias, productos cárnicos, bebidas mixtas, pastas, alimentos para bebés y productos dietéticos (Barros *et al*, 2018). Si bien la bebida más conocida y desarrollada de forma industrial es a base de soja, existen investigaciones sobre la posibilidad de desarrollar otra bebida a base de Nuez de Macadamia (*Macadamia integrifolia*) cuyo su cultivo en Paraguay es relativamente reciente y cuya demanda va en aumento a nivel mundial, avalada por los beneficios a la salud asociados al consumo frecuente de sus frutos atributos a sus propiedades nutricionales, saludables y sensoriales y se ha informado, además, que la nuez exhibe una mayor capacidad antioxidante que cualquier otra nuez (Arranz *et al*, 2008). Estas nueces se consumen crudas, asadas, fritas, saladas, como coberturas de caramelos y helados (De Toledo *et al*, 2014). También se utilizan como ingredientes en galletas y tortas, y la extracción de sus aceites es en gran parte destinada a la industria cosmética y farmacéutica (Mundo *et al*, 2010). Ambos frutos son muy demandados en el mercado en distintas presentaciones, motivo por el cual fueron seleccionados para la realización de este trabajo.

Al señalar la importancia de desarrollar alimentos funcionales, existen varios compuestos que son utilizados en la actualidad para enriquecer o fortificar alimentos, ya sea fibra, Calcio, Hierro, Vitamina E, Omega 3, 6 y 9, Probióticos, entre otros. El trabajo se centra en la incorporación de ácidos grasos de la serie Omega-3 y cepas de probióticos en este caso, de la cepa *Lactobacillus rhamnosus*. Los ácidos grasos poliinsaturados PUFAs principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), han sido exhaustivamente estudiados por los notables beneficios de su consumo sobre la salud humana. Los ácidos grasos ejercen muchas funciones de vital importancia en el organismo intervienen en el control y regulación la coagulación sanguínea, la respuesta inflamatoria, la regulación de la temperatura del cuerpo, el funcionamiento normal del cerebro, la salud de la piel, uñas y cabello. Se ha demostrado que el consumo de grandes cantidades de omega-3 aumenta considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre, lo cual explica por qué en comunidades que consumen muchos alimentos con omega-3, la incidencia de enfermedades cardiovasculares es sumamente baja. Algunas experiencias sugieren que el consumo de omega-3 tiene efectos benéficos sobre el cerebro y también existen

estudios que sugieren que el consumo de omega 3, durante del embarazo puede tener una buena influencia en el feto (Ilbay, 2014).

1.1.TEMA DE INVESTIGACIÓN

"Enriquecimiento de alimentos funcionales a base de soja (*Glycine max*) y nuez de macadamia (*Macadamia tetraphylla*) con Omega-3 y probióticos"

Lugar de la investigación: El trabajo fue realizado en las instalaciones de los laboratorios del departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Asunción, ubicada en la ciudad de San Lorenzo como se muestra en la Figura 1

Los alimentos fueron elaborados en la zona de alimentos del Laboratorio de Biotecnología Industrial y Bioprocesos. La fase experimental preliminar donde fue desarrollada primeramente la metodología de la tesis fue en el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) en la Ciudad de Mar del Pata, Argentina, como se muestra en la Figura 2.



Fig. 1.: Ubicación del laboratorio de Biotecnología Industrial y Bioprocesos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción donde se realizaron los experimentos.

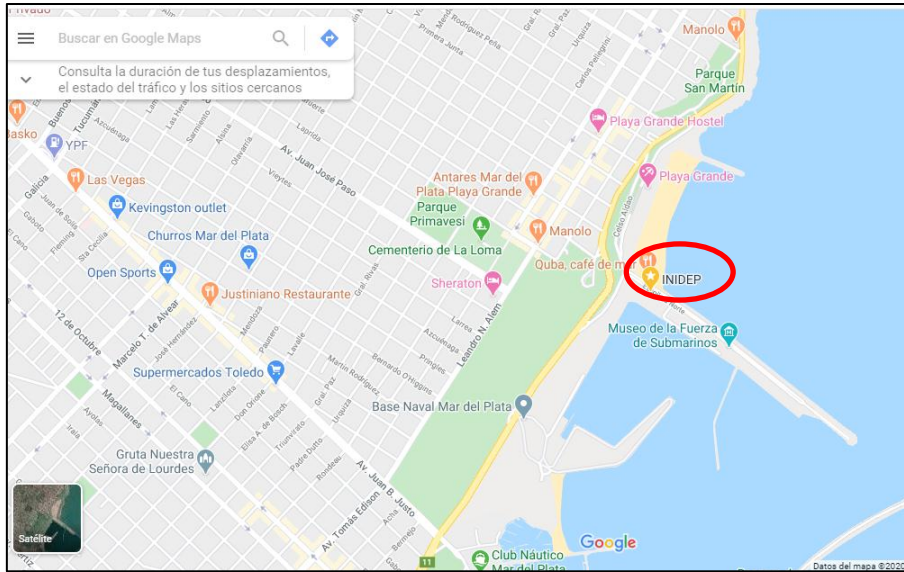


Fig. 2.: Ubicación del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero de la ciudad de Mar del Plata – Argentina donde se realizaron los experimentos preliminares.

Descripción del tema: Los alimentos funcionales elaborados son bebidas vegetales y galletitas a base de soja y nuez de macadamia, ricos en ácidos grasos y proteínas. Las bebidas vegetales fueron enriquecidas con Omega-3 y probióticos, característica ausente en este tipo de alimentos, mientras que las galletitas fueron enriquecidas solo con Omega-3. El Omega-3 se utilizó en dos presentaciones: aceite y micro cápsulas, tanto en las bebidas como en las galletitas, mientras que los probióticos fueron inoculados solo en forma de micro cápsulas en las bebidas vegetales.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Paraguay, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados de la serie Omega-3 es escaso con respecto a los valores nutricionales sugeridos por la OMS. Esto puede ser debido a que el alimento que contiene mayor cantidad de Omega-3 es el pescado, cuyo consumo diario no logra alcanzar los valores nutricionales necesarios sugeridos. Por lo tanto, elaborar alimentos de consumo diario como bebidas vegetales y galletitas en forma de barra nutricionales enriquecidos con estos ácidos grasos esenciales, se vuelve una alternativa interesante para el aumento de su ingesta. Por otro lado, la intolerancia o la alergia a la lactosa es la alergia alimentaria más frecuente en los lactantes, niños

pequeños y adultos mayores, y esta prevalencia ha aumentado en los últimos años. Según reportes de divulgación actuales, en Paraguay no existen estadísticas que evidencien esta prevalencia, pero el aumento de las consultas médicas a raíz de estos cuadros habla de un incremento de casos clínicos con intolerancia a la lactosa, siendo los antecedentes familiares y la administración temprana de alimentos lácteos los principales desencadenantes de esta intolerancia, la cual, por lo general, se manifiesta antes del primer año de vida, o en el caso de los adultos mayores en edad avanzada. Por consiguiente, el consumo de bebidas vegetales a base de soja y nuez, se vuelven opciones convenientes para personas que tienen estas condiciones de salud.

Los problemas planteados que constituyen el fundamento y las bases del presente trabajo son:

- Bajo consumo de ácidos grasos poliinsaturados, Omega-3
- Intolerancia a la lactosa.

En Paraguay existen productos lácteos sin lactosa o deslactosados producidos por industrias lecheras de origen animal. También existen industrias nacionales que elaboran bebidas vegetales a base de soja pero son poco conocidas y sus productos no se encuentran en gran cantidad en los supermercados, en cambio, si existen productos de industrias extranjeras en el mercado a base de soja, almendras, arroz y avena. En el caso de la nuez de macadamia no existen industrias que produzcan la bebida a base de esta nuez, pero si existen industrias que extraen el aceite del fruto, el cual es muy utilizado en la industria de cosméticos, pero no es muy conocida en el país y sus productos solo se encuentran en algunos supermercados de calidad gourmet. Por lo tanto, el uso de esta materia prima producida en nuestro país no es aprovechado en su totalidad, ya que del mismo se pueden obtener varios productos alimenticios y existen muchos cultivos de esta especie de nuez en varias zonas del país.

En cuanto al consumo de alimentos con probióticos, su aceptación se encuentra en aumento, y están instalándose en el mercado. La desventaja actual es que las cepas probióticas utilizadas en estas industrias son adquiridas del exterior y no existen cepas nativas que se estén utilizando en industrias nacionales. En el presente trabajo se utilizaron cepas bacterianas que han sido aisladas de quesos y leches elaborados de forma rústica en el interior del país, lo cual da un relevante interés, debido a que las

cepas aisladas han sido evaluadas para su uso como probióticos en otros proyectos de investigación, que será descrito más adelante.

La importancia del consumo de probióticos radica en sus efectos beneficiosos para la mejora en la salud de la población en general. El problema con el uso de cepas probióticas es la pobre supervivencia de los probióticos en estos productos y en el tracto gastrointestinal, que es afectada por un grupo de factores, como las condiciones ambientales, tecnológicas y gastrointestinales a los cuales son sometidos. En este sentido, las investigaciones se han enfocado hacia el empleo de micro cápsulas como estrategia para mejorar la viabilidad de los probióticos en los productos y durante su paso por el tracto gastrointestinal.

Teniendo en cuenta todos estos factores, la importancia de la producción de alimentos funcionales para el consumo humano aumenta, así como las investigaciones para obtener buenos y nuevos productos para la industria, que contribuyan o den un efecto positivo en la salud humana.

1.3. PREGUNTA DE LA INVESTIGACION

- ¿Es factible el enriquecimiento de las bebidas vegetales con omega-3 y probióticos?
- ¿Es factible la elaboración de galletitas a base del residuo producido en las bebidas vegetales?

1.4. JUSTIFICACIÓN

La finalidad del trabajo fue la elaboración de productos saludables con un contenido nutricional agregado que brindará al ser humano beneficios para la salud. Se elaboraron productos de consumo diario como bebidas vegetales, mayormente conocidas como leches vegetales a base de soja y nuez de macadamia, que serán enriquecidas con ácidos grasos Omega-3 y la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus*, sobre la cual se han realizado varios estudios acerca de sus propiedades como probiótico. Durante la elaboración de las bebidas se obtuvo un residuo que fue utilizado como harina (okara, término utilizado para el residuo obtenido en las bebidas vegetales,

tanto en soja como con otras semillas o frutos secos) para la elaboración de galletitas que fueron enriquecidas con Omega-3. El okara derivado de la nuez de macadamia, contiene una cantidad alta de proteínas y lípidos y en el caso de la soja un contenido alto en proteínas e isoflavonas. En ambos productos se utilizó aceite de pescado rico en Omega-3, que fue obtenido de hígados de raya de la región costera de la provincia de Buenos Aires, Argentina y fue empleado en forma de capsulas y en forma de emulsión de aceites.

Para que estas bacterias probióticas intervengan de la manera apropiada y esperada, es de gran importancia que lleguen vivas al intestino en un número adecuado. Dicha viabilidad podrá ser protegida mediante el procedimiento de micro encapsulación, las bacterias probióticas quedan atrapadas dentro de unas partículas con diámetro hasta unos pocos milímetros, para así sobrevivir al entorno de los procesos digestivos y poder conservar su actividad metabólica (Castillo *et al*, 2017).

En Paraguay, la economía se sustentó históricamente en el sector agrícola-ganadero, siendo el cultivo de soja uno de los rubros más resaltantes del país, debido a su alto impacto en las cuentas nacionales. En los últimos 40 años, el cultivo de la soja se ha propagado velozmente en vastas zonas de Sudamérica. A pesar de ser un cultivo que se originó en Asia, hoy en día es un importante componente de la dieta popular tradicional en el mundo (INBIO & UGP, 2011). La soja es, principalmente, un cultivo industrial, cultivado para aceite y proteína. A pesar del relativamente bajo contenido de aceite de la semilla, la soja es la mayor fuente de aceite comestible y representa aproximadamente el 50% de la producción total de semillas oleaginosas del mundo (FAO, 1992). El impulso de los países del sur, si bien partió de una demanda internacional, se vio influenciado por varios factores como ser: el incremento de nuevas áreas de cultivo, la disponibilidad de semilla de soja genéticamente modificada, los marcos que regulan la bioseguridad, y la adopción de los agricultores de tecnologías innovadoras al sistema de producción agrícola contribuyendo así al 50% de la producción mundial de la soja (IICA, 2015).

En el caso de la nuez de macadamia, es considerada una de las nueces gourmet más finas del mundo debido a su sabor único y delicado, su textura fina y crujiente y su rico color cremoso, la producción mundial es de aproximadamente 44,000 toneladas, 86% de las cuales provienen de Australia, Sudáfrica, Kenia, Estados Unidos y Malawi. Australia es el mayor productor mundial, con aproximadamente 14.100 toneladas.

Investigaciones, ensayos dietéticos y los estudios de población, demuestran que la macadamia contiene una variedad de componentes nutritivos y que promueven la buena salud. Estos incluyen grasas mono insaturadas, proteínas, fibra dietética, minerales, vitaminas y fitoquímicos. Se ha demostrado que, como muchos frutos secos, reduce la presión arterial en personas hipertensas y reduce el riesgo de enfermedades del corazón (Stephenson, 2005).

1.5.OBJETIVOS

1.5.1.Objetivo General

- Enriquecer alimentos a base de soja (*Glycine max*) y nuez de macadamia (*Macadamia tetraphylla*) con Omega-3 y probióticos.

1.5.2.Objetivos específicos

- Utilizar aceite proveniente de hígado de raya como fuente de Omega-3 en las galletitas y bebidas vegetales.
- Formular productos alimenticios a base de Soja y Nuez de Macadamia.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de los productos elaborados.

1.6.HIPOTESIS

H1: El enriquecimiento de las bebidas vegetales con Omega-3 y probióticos, es factible.

H0: El enriquecimiento de las bebidas vegetales con Omega-3 y probióticos, no es factible.

H2: El enriquecimiento de las galletitas con Omega -3, es factible.

H0: El enriquecimiento de las galletitas con Omega -3, no es factible.

2. MARCO TEÓRICO

2.1.Antecedentes

Durante las últimas décadas la industria de alimentos ha sufrido enormes cambios en la demanda de los consumidores, los cuales, asocian los efectos positivos de una dieta equilibrada en la salud y ya no se conforman con alimentos que solamente cubran

sus requerimientos nutricionales básicos, sino que prefieren productos alimenticios que contribuyan a promover la salud humana y a reducir el riesgo de enfermedades, y cuyo consumo, además, sea práctico y proporcione bienestar. Esta dinámica ha dado origen a un mercado creciente en los llamados "alimentos funcionales" (Bernat *et al.*, 2014). Existe una conciencia mundial sobre las enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. En su informe anual sobre los riesgos para la salud mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó una distribución de muertes atribuibles a 19 factores de riesgo principales en todo el mundo, de las cuales, más de la mitad de estos factores estaban relacionados con la nutrición: presión arterial debido al consumo de sodio, colesterol, obesidad, deficiencias de hierro y zinc, entre otros. La fortificación de alimentos ofrece la posibilidad de prevenir la malnutrición llegando a ser cada vez más popular en los países en vía de desarrollo.

En el sector lácteo el uso de aceites de origen marino propensos a la oxidación y generación de olores y sabores poco agradables se ha venido estudiando con el propósito de obtener alternativas viables de su inclusión en dichos productos. El uso de tecnologías como la micro encapsulación se perfila como una solución a dicho problema. La inclusión de aceites de salmón micro encapsulado no afectó significativamente las propiedades de calidad del yogur (pH, sinéresis, estabilidad oxidativa y percepción sensorial) al ser agregado en cantidades de 2% sobre el valor total de la grasa de forma directa antes de iniciar los procesos de homogenización y pasteurización (Estrada *et al.*, 2011).

Los lácteos de origen animal son una excelente fuente de alimentos, la leche ha sido reconocida como un alimento importante para bebés y niños en crecimiento, sin embargo, los investigadores han mostrado un gran interés en fuentes de bebidas vegetales debido a sus altos valores nutricionales y potencial económico. En vista del escaso suministro de leche en varios países y la brecha cada vez mayor entre el requerimiento y la población, se han realizado esfuerzos a lo largo de los años para desarrollar productos lácteos alternativos de fuentes vegetales. (Udeozor, 2012)

La soja, la avena, el arroz y el maní han recibido gran atención en las investigaciones para sustituir los lácteos de origen animal. Sin embargo, con respecto a la nuez de macadamia no se han encontrado estudios científicos sobre bebidas a base de este fruto. El efecto del consumo de la macadamia sobre la salud ha sido ampliamente estudiado, los primeros trabajos de estudios epidemiológicos mostraban un marcado

efecto de protección cardiovascular, corroborado en investigaciones posteriores, lo que ha despertado el interés por su composición y sus efectos beneficiosos sobre la salud. Se ha demostrado que el consumo de nuez de macadamia reduce los niveles de leucotrienos circulantes y de 8-isoprostano, fiable marcador in vivo de estrés oxidativo (Mereles *et al.*, 2015). Lo cual la convierte en un interesante fruto a ser estudiado para poder ser producido como bebida vegetal.

2.2. Bebidas Vegetales

Las bebidas vegetales, están en el centro de atención gracias a sus características libres de lactosa y colesterol que combinan con la demanda actual de productos alimenticios saludables, sin embargo y con la excepción de la soja, hay poca información disponible sobre estos tipos de bebidas y sus derivados. Estas bebidas tienen excelentes propiedades nutricionales que les proporcionan un alto potencial y una expectativa positiva para el mercado. Las ventas europeas de bebidas de soja y otras bebidas no lácteas aumentan más de un 20% al año, España es el país de la UE (Unión Europea) con más crecimiento en el mercado de bebidas no lácteas. Del mismo modo, las ventas minoristas totales de soja, almendra, arroz y otras bebidas vegetales en los Estados Unidos alcanzaron los \$ 1.3 mil millones en 2011 (Bernat *et al.*, 2014). En la actualidad, se encuentran disponibles en el mercado una amplia gama de bebidas vegetales de frutos secos y cereales en una amplia gama de formulaciones: saborizadas, endulzadas/sin azúcar, baja en grasa y/o fortificada con Calcio y Hierro. De hecho, las estrategias de comercialización de esos productos se centran en comparar sus beneficios para la salud con los de los productos lácteos de origen animal. Por otro lado, los expertos están considerando las posibles relaciones entre los productos vegetales y la prevención del cáncer, arterosclerosis o enfermedades inflamatorias, ya que los radicales libres desempeñan un papel clave en esas patologías, y estos tipos de alimentos son una excelente fuente de antioxidantes (Scalbert *et al.*, 2018).

Los intolerantes a la lactosa y aquellas personas alérgicas a la proteína de la leche de vaca son los principales consumidores de este tipo de bebidas, pero también tienen una gran demanda de personas que buscan un cambio en su alimentación diaria o personas que practican algún deporte. Teniendo en cuenta las materias primas y sus propiedades nutricionales, las bebidas vegetales pueden clasificarse en dos grandes grupos: *las nueces y las bebidas de cereales*. Ambos tipos de productos se encuentran en estudio debido al impacto de los nuevos conocimientos de sus compuestos en

algunas enfermedades crónicas actuales, como las enfermedades cardiovasculares, la Diabetes tipo 2 (DM-2), la obesidad y algunos tipos de cáncer. Estas enfermedades metabólicas están vinculadas con el estilo de vida diario, en particular una dieta rica en energía desequilibrada y no balanceada, que carece de compuestos bioactivos protectores, como los micronutrientes y los fitoquímicos (Fardet, 2010). Todos estos nutrientes limitados comentados anteriormente están disponibles tanto en cereales (soja), como en nueces. Además de las nueces y los cereales, otras materias primas se han utilizado industrialmente, como los tubérculos (por ejemplo, la nuez de tigre) y las plantas (por ejemplo, cáñamo, girasol) entre otros.

2.3. Bebida Vegetal a Base de Soja (*Glycine max*).

La bebida vegetal más conocida y más popular proviene de la soja, aunque la demanda de bebidas a base de almendra, arroz, avena y coco está en aumento, la soja es uno de los cultivos más interesantes, debido a la versatilidad de productos derivados de la misma para la alimentación humana. Los principales productos de soja son el tofu, el yogur de soja, la proteína texturizada, el miso, la salsa de soja, el concentrado proteico y aislado, el aceite refinado, el salvado, la harina, el extracto de soja hidrosoluble y la leche de soja (Missão, 2006). La bebida de soja se caracteriza por ser muy digestiva en comparación con la leche de vaca ya que no contiene lactosa ni las proteínas características que producen la alergia a la proteína de leche de vaca (APLV). La bebida de soja es rica en calcio y además se puede enriquecer con este mineral. Se ha comprobado cómo la sustitución de la leche de vaca por este alimento puede reducir hasta un 20% la tasa de colesterol en sangre.

La soja contiene una variedad de componentes biológicamente activos, los cuales se han estado consumiendo por casi 5.000 años. A diferencia de la mayoría de los alimentos vegetales, la soja es rica en proteínas. Los investigadores están interesados tanto en el valor nutricional como en los beneficios producidos en la salud humana. Investigaciones sobre los efectos en la salud que proporcionan los alimentos a base de soja han recibido una atención considerable, Experimentos clínicos o in vitro que incluyen una amplia gama de áreas, como cáncer, enfermedad coronaria (enfermedad cardiovascular), osteoporosis, función cognitiva (relacionada con la memoria), síntomas menopáusicos, función renal y muchos otros han sido determinados. Las moléculas que se encargan de estos beneficios son: isoflavonas, lípidos, lectinas, toxinas y vitaminas. (Kurosu, 2011).

El aumento de productos a base de soja, se debe en gran parte al hecho de que la FDA aprobó los productos de soja como un alimento oficial para reducir el colesterol, junto con otros beneficios para el corazón y la salud debido a la evidencia de que la ingesta de productos de soja se correlaciona con una disminución significativa en el colesterol sérico, bajo en lipoproteínas de alta densidad (LDL, colesterol malo) y triglicéridos (Kurosu, 2011). Según la FAO, la soja (*Glycine max*) se originó en Asia, pero ahora los principales productores son Estados Unidos y Brasil. Sin embargo, la soja que se produce en estos países se utiliza sobre todo en la industria para la extracción de aceite y como alimento para animales. En Asia todavía se produce gran parte de la soja para consumo humano directo, no así en África o América Latina donde no está ampliamente difundida. La soja contiene hasta un 40% de proteína, 18 % de grasa y 20 % de carbohidrato. La proteína es de mejor calidad biológica que la de otras fuentes vegetales. Los aceites vegetales que más se emplean son de soja, oliva, maíz, maní, girasol, sésamo, algodón y coco. En su forma pura, tienen un 100 % de grasa y no contienen agua ni otros nutrientes.

El residuo de la producción de las bebidas de soja se denomina okara, y tradicionalmente se lo ha utilizado para alimentación animal como fertilizante o desperdicio. Además, es un producto rico en fibras y proteínas y tiene un buen balance de aminoácidos, es un aditivo dietético adecuado para galletas y bocadillos porque reduce la ingesta de calorías y aumenta la fibra dietética. También se lo utiliza como aperitivo por sus valores nutricionales y como aditivo por su buena capacidad de retención de agua y calidad emulsionante (Park *et al.*, 2015). En general, los bocadillos se hacen con okara seca ya que el uso de okara fresca en la industria alimentaria es limitado debido a su alto contenido de agua (alrededor de 80-85 %) que causa el rápido deterioro. Otro limitante de la industria de las galletitas de okara es que requieren de otra materia prima anexa como almidón, arroz, entre otros (Radočaj *et al.*, 2013), debido a la mala calidad textural, propiedad que juega un papel esencial en la aceptación de galletas (Park *et al.*, 2015), si bien las propiedades nutricionales son altas, las galletitas deben tener un buen aspecto a la hora de ser elaboradas, por ello se utiliza otra materia prima a la par que el okara, para obtener unas galletitas mas uniformes

2.3.1. Características generales

Taxonomía: la soja cultivada es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. Hacia el año 3000 a.c. los chinos ya consideraban

a la soja como una de las cinco semillas sagradas. Las primeras semillas plantadas en Europa provenían de China y su siembra se realizó en el Jardín des Plantes de París en 1740. Años más tarde (1765) se introdujo en América (Georgia, EE.UU.). Sin embargo, no fue hasta la década del 40 donde se produce la gran expansión del cultivo en ese país, liderando la producción mundial de soja a partir de 1954 hasta la actualidad.

Actualmente Estados Unidos es el primer productor mundial de soja. En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó también en la década del 40, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja. Estados Unidos, Brasil, Argentina e India son los países que actualmente lideran dicha producción. En la figura 3 podemos observar las semillas de soja de la variedad sojapar R24 y la planta de la soja con las vainas formadas.

Nombre Científico: *Glycine max*

Nombre Tradicional: Soja, soya

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: Glycine

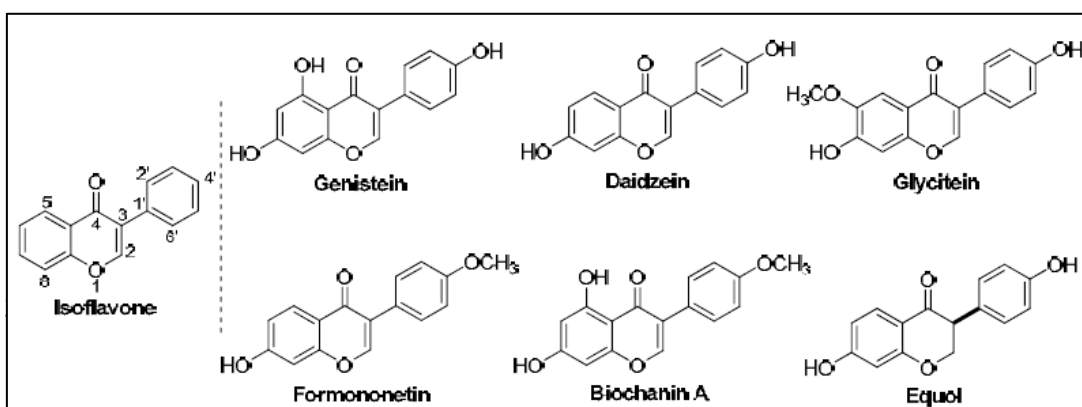
Especie: G. max.



Fig. 3: Imágenes de las semillas y plantas de soja.

2.3.2. Composición química de la soja

Las semillas de soja contienen niveles muy altos de proteínas, conjugados de carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos y materiales inorgánicos (minerales). Entre estos componentes, el contenido de proteínas y ácidos grasos representa aproximadamente el 40% y el 20% respectivamente. Los componentes restantes consisten en conjugados de carbohidratos, constituyentes inorgánicos y los componentes menores de moléculas pequeñas biológicamente interesantes. Por lo tanto,



la soja constituye un componente nutricional importante, se considera que es un buen sustituto de proteínas (aminoácidos esenciales), entre otros vegetales importantes, para productos animales. En la Figura 4 se pueden observar las distintas estructuras químicas de las isoflavonas que se encuentran dentro en la soja.

Fig. 4: Estructura de las isoflavonas de soja

Isoflavonas: Las principales isoflavonas en la soja son la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, que comprenden aproximadamente el 50, 40 y 10% del total de isoflavonas, respectivamente. La estructura química de las isoflavonas es similar a la de la hormona sexual femenina primaria, **el estrógeno**, y debido a esta similitud en la estructura pueden interferir con la acción del estrógeno, por lo tanto, las isoflavonas a menudo, se llaman "fitoestrógenos" y las funciones biológicas comunes de los fitoestrógenos son de proteger las plantas del estrés, y forman parte del mecanismo de defensa de una planta. Las isoflavonas también pueden reducir el efecto del estrógeno sobre las células y las capas de la piel cuando los niveles hormonales son altos, lo que reduce el riesgo de cánceres relacionados con el estrógeno (Kurosu, 2011).

Genisteina: Influye en células vivas, debido a su similitud con el estrógeno y puede unirse a los receptores del mismo. El estrógeno es un revelador clave del crecimiento y la diferenciación en una amplia gama de tejidos, incluido el sistema reproductivo, la glándula mamaria el sistema nervioso central y el esqueleto. En la década de 1960, muchas investigaciones sobre los efectos fisiológicos de la genisteina se limitaron a su actividad estrogénica, también se ha demostrado que la genisteina posee actividades anti fúngicas, efectos antiangiogénicos (bloqueo de la formación de vasos sanguíneos) y puede bloquear el crecimiento celular asociado con el cáncer, inhibe la actividad de sustancias en el cuerpo que regula la división celular y los factores de crecimiento celular. Varios estudios han encontrado que dosis moderadas de genisteina tienen efectos inhibitorios sobre cánceres de próstata, cuello uterino, cerebro, mama y colon, además se ha demostrado que hace que algunas células sean más sensibles a la radioterapia (Kurosu, 2011).

Lípidos de soja: La soja contiene 82% de triacilglicerol, 13% de fosfolípidos, aproximadamente 1% de esteroides y 4% de ácidos grasos saturados e insaturados. La composición de fosfolípidos en un extracto de lípidos de soja es fosfatidilcolina (42%), fosfatidiletanolamina (30%), fosfatidilinositol y fosfatidilserina (20%),

lisofosfatidilcolina (1%), esfingomilina (0,6%), ácido fosfatídico y otros, respectivamente. Los lípidos siguen siendo un tema de investigación importante debido a las asociaciones entre el consumo de lípidos y la incidencia de algunas afecciones crónicas, como la enfermedad arterial coronaria, la diabetes, el cáncer y la obesidad (Kurosu, 2011).

Esteroles de soja: La soja contiene esteroles vegetales, β -sitosterol, β -sitostanol, campesterol, campestanol, brasicasterol, estigmasterol y Δ 5-avenasterol y colesterol. Los esteroles vegetales son componentes dietéticos naturales y se sabe que tienen propiedades reductoras del colesterol. Se cree que la disminución del colesterol sérico por los esteroles vegetales es el resultado de una inhibición de la absorción de colesterol en el intestino delgado. Varios estudios sugieren que los esteroles vegetales saturados o insaturados mostraron diferentes efectos sobre la absorción de colesterol y la excreción de esteroles (Normén *et al.*, 2007).

Diversos estudios han atribuido propiedades benéficas sobre la salud a la proteína de soja como acciones hipocolesterolemias e hipotrigliceridemicas (Tovar *et al.*, 2002). Hay algunas condiciones clínicas específicas que requieren nutrición con base en fórmulas fundamentadas en soja, están limitadas a la galactosemia y a la intolerancia a la lactosa. Una de las razones del amplio uso de la proteína de soja en alimentos es su alta calidad proteica y se ha demostrado que el contenido de aminoácidos sumado a su alta biodisponibilidad la califica con el valor más alto (1 o 100%) igualando en calidad a las proteínas de suero, caseína y albúmina (Vanegas *et al.*, 2009). Sin embargo, la industria de alimentos, prefiere en muchos casos la sustitución de estas por soja, no solo por razones de salud sino también por costos (Hoogenkamp, 2008).

2.4. Bebida vegetal a base de Nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia*)

La nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia*) es originaria de Australia donde se extendió a regiones tropicales de América y África y en los últimos años, el área de plantación se ha incrementado fundamentalmente por su costo en el mercado y porque constituye una alternativa para muchos productores que desean sustituir los cultivos tradicionales por nuevas actividades agrícolas. La introducción de esta especie en Paraguay se inició en 1964 aproximadamente, en la zona de Amambay, distribuyéndose como cultivo en las zonas de los departamentos de Alto Paraná, Itapúa,

Central, Cordillera, Concepción. (Armadans, 2009). El desarrollo de las principales variedades comerciales y clones de macadamia se llevó a cabo en América Latina (Phatanayindee *et al.*, 2012).

Actualmente en el mercado, no existen bebidas vegetales a base de este fruto de forma industrializada. La bebida de nuez, que generalmente se produce en presencia de estabilizadores para una mejor homogeneización, se consume cada vez más en China debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Los productos de nueces más populares son en su forma tostada, sin embargo, la dificultad en el consumo de esta modalidad, es debido a la dificultad de eliminar la cáscara (Chen *et al.*, 2014). Por lo tanto, las bebidas vegetales constituyen una buena alternativa para el consumo de estos frutos o sus proteínas, generalmente la bebida de nuez se obtiene dejando en remojo los frutos, moliendo las nueces tostadas sin cáscara y posteriormente filtrándolas (proceso general). Se ha encontrado que la leche de nuez se separa en tres fracciones (flotante, sobrenadante y precipitado) dentro de un breve período de tiempo (aproximadamente 30 min). Se considera que este comportamiento se correlaciona con el gran tamaño de los cuerpos de aceite de nuez y la pobre solubilidad acuosa de la proteína de estos frutos (Gallier *et al.*, 2013).

Estudiar la estabilidad fisicoquímica y la vida útil de las emulsiones de bebidas de nueces se torna un tema importante de gran interés industrial y nutritivo, facilitando al consumidor la ingesta de este fruto. La utilización de emulsionantes se volvió una alternativa eficaz para evitar la separación de las bebidas en las fases citadas anteriormente, diferentes investigaciones encontraron que el uso de emulsionantes da buenos resultados en el producto final.

La Macadamia es un género de plantas con flores perteneciente a la familia Proteaceae, y solo dos especies la *Macadamia integrifolia* y la *Macadamia tetraphylla*, generan nueces comestibles que tienen importancia comercial. La nuez de *Macadamia integrifolia* es utilizada por el mercado gourmet como un aditivo especial en ensaladas, cocteles, etc (Jiménez, 2001). Estados Unidos y Australia son los dos principales países productores de nueces de macadamia de alta calidad (Australian Macadamia Society, 2006). En Paraguay existe una Sociedad de agricultores de macadamia, en la ciudad de San Joaquín del departamento de Caaguazú y la empresa *Boombera Nuts*, es una de las pocas industrias que se encargan de comercializar estos frutos tostados y envasados en

el mercado, la cual adquiere las nueces de los agricultores de la ciudad de San Joaquín de la especie *Macadamia integrifolia* variedad HAES 344.

2.4.1. Características generales

Origen: La nuez de macadamia es un cultivo alimenticio comercial autóctono de Australia, que se origina a lo largo de las franjas de los bosques lluviosos en la costa sureste de Queensland y el noreste de Nueva Gales del Sur (25 a 32°S de latitud). De las cuatro especies de macadamia, solo dos son comestibles la *Macadamia integrifolia* de cáscara lisa y la *M. tetraphylla* de cáscara áspera. Solo el primero se ha desarrollado comercialmente, mientras que *M. tetraphylla* es cultivada en una escala moderada en California y Nueva Zelanda, produce un grano crudo de excelente calidad alimenticia, pero contiene un mayor porcentaje de azúcares que pueden caramelizarse en el tostado, lo que disminuye su apariencia y reduce su vida útil efectiva (Stephenson, 2015).

Botánica: El árbol de macadamia posee hojas perennes de medianas a grandes, alcanza una altura de hasta 20m y una extensión de hasta 15m. Los racimos colgantes, de hasta 15 cm de largo y con aproximadamente 200 flores blancas y cremosas, están sobre madera endurecida. Menos del 5% de las flores dan fruto y las nueces tardan 6 meses en madurar, después de lo cual se extirpan naturalmente. Botánicamente, la fruta producida en el árbol son folículos y las "nueces" son semillas (Maguire *et al.*, 2004). En la figura 5 se pueden observar las flores de la nuez, los frutos no maduros y maduros, y el árbol de la nuez de macadamia



Nombre Científico: *Macadamia integrifolia*

Nombre Tradicional: Nuez de macadamia

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Proteales

Familia: Fabaceae

Género: *Macadamia*

Especie: *M. integrifolia* Maiden & Betche



Fig. 5: Imagen del fruto, flor y árbol de la nuez de macadamia

2.4.2. Composición Química de la Nuez de Macadamia

Los granos maduros de primer grado tienen un contenido de aceite de $\geq 72\%$ y una gravedad específica menor a 1. Los granos de mejor calidad contienen 72–78% de aceite y 1,5% de humedad. El grano promedio tiene un diámetro de 20 mm y pesa de 2,8 a 3,3 g, pero la masa del grano puede variar de 2,1 a 4,9 g y el grosor de la cáscara es de 2,7 a 3,2 mm, dependiendo del cultivar.

Contenido de humedad: Los granos de nueces de macadamia recién cosechados tienen 16-24% de humedad, dependiendo del clima del huerto. Estos contenidos de humedad corresponden a actividad de agua mayores a 0,8 a la cual el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y las tasas de reacción de ennegrecimiento son altas.

Contenido de aceite: Los granos de *Macadamia integrifolia* contienen 68–79% de aceite y se considera una nuez con alto contenido de aceite, similar a los pinos (68–75%), las nueces de pecan (70–73%) y las almendras (63–70%). Los granos de *M. tetraphylla* contienen menos aceite que *M. integrifolia*. Las nueces de macadamia tienen niveles más altos de ácidos grasos monoinsaturados que cualquier otra fuente de alimento conocida. Las dietas que contienen nueces de macadamia ricas en estos ácidos grasos, reducen los niveles de colesterol en plasma y disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular. Los aceites de macadamia contienen 83 a 85% de ácidos grasos insaturados y 15 a 17% ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos predominantes son el ácido oleico (56–65%), palmitoleico (18–23%) y palmítico (7–9%).

Contenido de azúcar: El contenido total de azúcar de los granos de macadamia fresca varía 2,9 a 5,6 g% de peso seco. Los azúcares reductores varían de 0,03 a 0,65 g% en granos de macadamia. Cuando las nueces de alta humedad se secan a temperaturas $>38^{\circ}\text{C}$, la hidrólisis de sacarosa proporciona sustratos de azúcares reductores para las reacciones de dorado durante la etapa de tostado. Los granos de *M. tetraphylla* tienden a tener mayores contenidos de azúcar que los cultivares de *M. integrifolia*. Los granos de macadamia se consideran maduros después de que se completa la acumulación de aceite. Durante el desarrollo de la nuez, los azúcares hexosa se convierten en ácidos grasos en el embrión.

Fitoquímicos: Las nueces de macadamia contienen fitoquímicos que pueden tener un efecto positivo en la salud humana y también protegen los granos de las reacciones de oxidación durante el almacenamiento, lo que prolonga la vida útil. Los tocoferoles, tocotrienoles, fenólicos, fitosteroles y escualeno están presentes en los granos de macadamia y tienen propiedades antioxidantes. Los granos de macadamia contienen bajas concentraciones de α -tocoferol y δ -tocoferol (0,6 a 2,8 μ g% de aceite) en comparación con la mayoría de los otros tipos de nueces. Los tocotrienoles apagan las reacciones de los radicales libres más fácilmente que los tocoferoles, posiblemente aumentando la estabilidad oxidativa de los granos de macadamia. Los tocotrienoles tienen propiedades reductoras del colesterol, anticancerígenas y neuroprotectoras, además de propiedades antioxidantes mejoradas. El escualeno se convierte en fitoesterol, en las células vegetales. El escualeno apaga el oxígeno y previene la peroxidación de lípidos. Los granos de macadamia contienen 72 a 185 μ g de escualeno y 1120 a 1870 μ g de fitosteroles por gramo de aceite, con la mayor contribución del β -sitosterol (901 a 1506 μ g / g de aceite) (Maguire *et al.*, 2004).

2.4.3. Aspectos nutricionales

Las nueces de macadamia proporcionan 3006 kJ de energía, 7,9 g de proteína, 8,6 g de fibra, 13,8 g de carbohidratos y 75,8 g de lípidos por 100 g de grano comestible. Los frutos secos tienen niveles significativos de vitaminas B y minerales y también contienen todos los aminoácidos esenciales. Ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, fenilalanina y leucina están presentes en las concentraciones más altas (0.6 a 2.3g/100 g). El consumo de 10 a 12 nueces de macadamia (28g, 1oz) aporta alrededor del 28-30% de la ingesta dietética recomendada (DRI) de tiamina y del 4 al 5% de las DRI de vitamina B 6, niacina y Riboflavina. La misma cantidad de nueces suministra aproximadamente 12.5% de DRI para hierro, 9–12% para magnesio, 7.5% para fósforo y 3-5% para zinc. Lo más importante es que el perfil lipídico del grano está enriquecido de forma exclusiva en ácidos grasos monoinsaturados (83-85% de MUFA). Las dietas que regularmente incluyen nueces de macadamia, con su alto contenido de MUFA y fitoquímicos, pueden reducir los niveles de colesterol, la inflamación, el estrés oxidativo y el riesgo de enfermedad cardiovascular.

2.5. Alimentos Funcionales

El término ingrediente funcional o alimento funcional, está destinado a medicamentos, nutrientes y aditivos alimentarios que producen beneficios en la salud a través de la actividad fisiológica en el cuerpo (Kruger *et al.*, 2003). El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en 1980 con la publicación de la reglamentación sobre "Alimentos para uso específico de salud" ("*Foods for specified health use*" o FOSHU) y se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan un papel específico en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional (Arai, 2001). En los países occidentales la historia de este tipo de alimentos se remonta a las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como también a la práctica de incluir ciertos componentes en los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia de la población. Algunos trabajos científicos han puesto interés en que ciertos ingredientes naturales de los alimentos proporcionan beneficios y resultan extraordinariamente útiles para la prevención de enfermedades e incluso para su tratamiento terapéutico (Bello, 2000).

El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo. En Europa se define alimento funcional a "aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad" (Roberfroid, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó sobre los riesgos de salud mundiales y la distribución de las muertes que fueron atribuibles a 19 factores de riesgo principales y más de la mitad de estos factores estaban relacionados con la nutrición: presión arterial debido al consumo de sodio, colesterol, obesidad, deficiencias de hierro y zinc, entre otros. (Stuckler *et al.*, 2011).

Los consumidores son más conscientes de la relación entre nutrición y salud. De hecho, los alimentos nuevos o de nuevas formulaciones, no sólo pretenden satisfacer el hambre y proporcionar nutrientes a los humanos, sino también intentan prevenir enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental (Burdock *et al.*, 2008). Esta tendencia se justifica si se consideran varios factores, como el aumento de la conciencia de salud pública (consecuencia de una población más

educada), el envejecimiento de la población y su deseo de mejorar la calidad de sus últimos años, un aumento en los costos de atención médica, avances en investigación y tecnología y cambios en las regulaciones gubernamentales y la rendición de cuentas.

2.5.1 Probióticos: Los alimentos funcionales (AF) más populares son alimentos fermentados por *bifidobacterias* y *lactobacilos*. Los probióticos son AF que se caracterizan por contener microorganismos vivos. El yogur y otros derivados lácteos fermentados, son los principales representantes de este grupo al que también pertenecen algunos vegetales y productos cárnicos fermentados (Silveira *et al.*, 2003).

La palabra “Probiótico” es un término de origen griego que significa "a favor de la vida". Este término se utiliza para definir a aquellos microorganismos, ya sean bacterias o levaduras, que sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y que producen un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo, proporcionando un mejor estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. También hay que destacar que pueden ser Alimentos Funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma. Estos microorganismos vivos, están incorporados especialmente en productos lácteos, también se pueden encontrar en otro tipo de alimentos fermentados como, por ejemplo, avena, verduras, embutidos o té. Sin embargo, existen otros productos comercializados que también incluyen probióticos en su composición, como son determinados complementos o suplementos alimenticios en los que el probiótico no está contenido en un alimento convencional, sino que está encapsulado (Gómez *et al.*, 2005).

Los efectos positivos de los probióticos dependen de la cepa bacteriana que se utiliza, de la existencia de un tipo o más cepas de bacterias y de su interacción, del tipo de producto en el que se incluyen, del tiempo de consumo del producto, de la genética propia del individuo, de la existencia o no de una patología, y de la dosis suministrada (Gómez *et al.*, 2005).

Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus acciones beneficiosas no son bien conocidos aun, se postulan como los más relevantes la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, la producción de sustancias antimicrobianas, la competición con microorganismos patógenos por sus receptores, lugares de unión y nutrientes precisos para su desarrollo, el estímulo del sistema inmune y la generación de citoquinas (Schiffrin *et al.*, 1995). Los lactobacilos y bifidobacterias potencian la

inmunidad, favorecen el equilibrio de la microbiota del colon, incrementan la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejoran el tránsito y la motilidad intestinal, estimulan la proliferación celular y elaboran ciertos productos fermentados beneficiosos. Se ha probado de forma concluyente en diversos estudios que disminuyen la intolerancia a la lactosa y la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes (Silveira *et al.*, 2003).

Lactobacillus rhamnosus, es uno de los microorganismos probióticos mejor estudiados clínicamente. Esta cepa es capaz de adherirse a la mucosa intestinal humana y persistir allí durante más de una semana después de ser ingerida oralmente por adultos sanos. También es capaz de formar biopelículas *in vitro* sobre una superficie abiótica (poliestireno), una característica fuertemente influenciada por el medio de cultivo utilizado y las condiciones asociadas con el entorno gastrointestinal, como pH bajo, alta osmolaridad o la presencia de bilis (Salas *et al.*, 2016).

Existe una tercera generación de productos probióticos definidos como microorganismos encapsulados o microencapsulados con una sola matriz polimérica, utilizando polímeros sintéticos, semisintéticos o naturales. La encapsulación se define como el proceso fisicoquímico o mecánico para atrapar sustancias en un determinado material y producir partículas con diámetros del orden de nanómetros a milímetros. El propósito de la encapsulación no es solo proteger los probióticos de ambientes externos sino también lograr su liberación en el sitio objetivo en una condición metabólicamente activa (en especial en el tracto intestinal) (Burgain *et al.*, 2011).

2.5.2. Ácidos grasos: Los ácidos grasos esenciales de las familias Omega-6 y Omega-3 son un grupo de lípidos saludables que han ganado una atención especial como ingredientes funcionales, debido a sus efectos positivos en la salud. Muchos estudios demuestran que los ácidos grasos principalmente el eicosapentanoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) de la serie Omega-3 tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo neuronal y visual y la prevención de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer, diabetes, fibrosis quística, asma, artritis, depresión, esquizofrenia y trastornos de déficit de atención (Figuroa *et al.*, 2013). Los alimentos de origen pesquero son las principales fuentes naturales de ácidos grasos esenciales Omega-3, seguidos por los aceites vegetales y las nueces. Actualmente se ha confirmado que tienen un gran impacto en la nutrición debido al gran número de efectos benéficos y

científicamente demostrados. Sin embargo, el bajo consumo en muchos países impide el acceso natural a estos nutrientes esenciales. Los productores pecuarios están enfocando su atención al enriquecimiento de los productos alimenticios, con ácidos grasos Omega-3, con el fin de hacer llegar a la mayor parte de la población los beneficios de estos nutrimentos especialmente a grupos vulnerables (Ilbay, 2014)

3. METODOLOGIA

Se presentan formulaciones y procedimientos de elaboración de productos a base de soja y nuez de macadamia (bebidas vegetales y galletitas), con dos lotes. Obteniéndose primeramente bebidas vegetales y a partir del residuo obtenido, se desarrollaron las galletitas.

También se realizaron análisis de los parámetros fisicoquímicos de calidad, análisis sensorial y microbiológicos de las bebidas vegetales obtenidas. Además, también se analizaron los parámetros fisicoquímicos de calidad y análisis sensorial de las galletitas. Una prueba de resistencia de *Lactobacillus rhamnosus* en acidez y porcentaje de bilis y viabilidad de la cepa encapsulada.

3.1. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE SOJA: PRIMER LOTE

3.1.1. Materia prima para la elaboración de Bebidas de Soja:

Semillas de Soja: Las semillas de soja fueron donadas por el Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) figura 6, de la ciudad de Caacupé – Paraguay, de la variedad SOJAPAR R24, resistente a plagas, enfermedades y estrés térmico. Las mismas fueron recibidas en bolsas de arpillera de 3kg y fueron almacenados libres de oxígeno, luz y humedad a temperatura ambiente, hasta su uso.



Fig. 6: Semillas de soja donadas por el IPTA

Aceite de Pescado: El aceite de pescado proveniente de hígados de raya refinado fue provisto por la empresa Omega Sur S.A. de la ciudad de Mar del Plata, cuyo contenido en EPA y DHA es 9,56 y 29,13% respectivamente.

Probiótico *Lactobacillus rhamnosus*: Cepa fue proveída por el Laboratorio de Biotecnología Industrial y Bioprocesos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción – UNA. La misma fue aislada de queso Paraguay proveniente de la ciudad de Itaugua en el marco del proyecto "*Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos*" del CONACYT con la autorización de los investigadores de dicho proyecto.

Aditivos: Para la elaboración de capsulas se utilizó Cloruro de Calcio, Goma Xantica y Alginato de Sodio; para las bebidas se utilizó Sorbato de potasio, Ácido Cítrico, saborizante de Naranja y CMC adquiridos de un local comercial especializado en alimentos, mientras que para la elaboración de las galletitas se utilizó: Harina de Arroz, mix de semillas, Aceite de Soja y Stevia, obtenidos también de un local comercial especializado. Todos los reactivos poseían grado alimenticio

3.1.2. Caracterización de la materia prima: 3 sub-lotes de semillas, conteniendo 10 semillas cada una, fueron pesadas en balanza analítica para calcular su peso promedio. También se trabajó con 3 sub-lotes de semillas para la longitud transversal a medición milimétrica.

La humedad se cuantificó mediante desecación en estufa a temperatura de 105°C hasta peso constante de acuerdo con las normas AOAC, 952.08; (1990). Las cenizas se determinaron por calcinación en mufla a 550°C de temperatura, hasta la obtención de cenizas blancas y peso constante (AOAC, 938.08; 1990). Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl usando el factor de conversión 5,7 (AOAC, 24.027; 1984). Se realizó la determinación de Grasas por el método de Randall (AOAC, 1990) y los lípidos fueron extraídos y cuantificados por el método de Bligh y Dyer (1959). El contenido de hidratos de carbono se calculó por diferencia.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica se llevó a cabo mediante metilación alcalina en frío de los mismos y posterior cromatografía gaseosa (ISO 12966-2:2011). Se utilizó un equipo Shimadzu® GC-2010 acoplado a un espectrómetro de masas GCMS-QP2010 plus, equipado con inyector Split/Splitless e inyector automático AOC-20i, se utilizó una columna capilar Supelco® Omegawax 320 (30m x 0,32mm x 0,25 µm) y Split 100:1.

3.1.3. Protocolo de elaboración de las cápsulas de Omega-3 y las cápsulas de probióticos.

Para el proceso de emulsión y encapsulación del aceite de pescado, el alginato de sodio se dispersó en agua destilada en concentración de 1% y se dejó en reposo durante la noche a temperatura ambiente para la hidratación completa del biopolímero. La pre-emulsión se obtuvo por homogeneización de velocidad media durante 2 minutos utilizando un mixer de uso doméstico con una concentración 1:5 de fase oleosa y alginato. La emulsión se llevó a cabo centrifugando a 3500rpm durante 35min. Finalmente, las perlas se obtuvieron por goteo en solución de CaCl_2 0,1 M y se secaron a 30°C durante 24 hs en una estufa y 7 días en desecador.

Por otra parte, para la encapsulación de los probióticos, se procedió de la misma manera con el alginato de sodio. Para la elaboración de la emulsión se utilizó una proporción 1:3 (10ml Goma Xantica y 30ml de Alginato) de Goma Xantica al 1% y Alginato de Sodio al 1%, respectivamente. Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* fueron activadas 24hs antes en 10ml de medio de cultivo MRSB, a 37°C en incubadora. Para la encapsulación de las cepas, se centrifugo el contenido del tubo de las bacterias activadas (10ml) a 3500 rpm por 20min a 4°C, realizando 3 lavados con 10ml de PBS para la eliminación del medio de cultivo. Una vez obtenidas las bacterias concentradas en el pellet, se agregó en el preparado 1:3 de la pre-emulsión. Para la emulsión se llevó el preparado 1:3 más la cepa con PBS de 10ml a centrifugación a 3500rpm por 35min. Finalmente, las perlas se obtuvieron por goteo en solución de CaCl_2 0,1 M con agitación a 20 rpm con ayuda de un agitador magnético y se conservó a 4°C, para su posterior análisis de viabilidad y uso en el producto final. En la figura 7 se puede observar las cápsulas obtenidas tanto las de aceite como las de los probióticos, en el caso de las cápsulas de aceite se observa una coloración amarilla después de los 7 días en desecador, y en el caso de los probióticos una coloración transparente.



Fig. 7: Cápsulas elaboradas de Omega-3 y probióticos

3.1.4. Protocolo de elaboración y formulaciones de las bebidas de soja

Las semillas de soja fueron clasificadas y desinfectadas con el proceso descrito anteriormente. El proceso de desinfección, observado en la figura 8, se realizó para la eliminación de hongos y bacterias que se podrían encontrar en la superficie del grano. Se tomaron sub-lotes de la muestra original (200g) y se sumergieron en agua destilada por 1min, luego se sumergió en Hipoclorito de Sodio al 5% por 2min, se enjuagaron las semillas hasta eliminar el hipoclorito y se sumergieron en alcohol al 70% por 1min. Por último, se enjuagó con agua destilada estéril. Durante este proceso se eliminaron las semillas verdes y las que ya no estaban en buen estado. Para comprobar la esterilidad de las semillas se cultivaron las semillas desinfectadas en AMS (Agar-malta-sal) y Sabouraud Dextrose Agar, por 5 días para controlar el crecimiento de hongos.

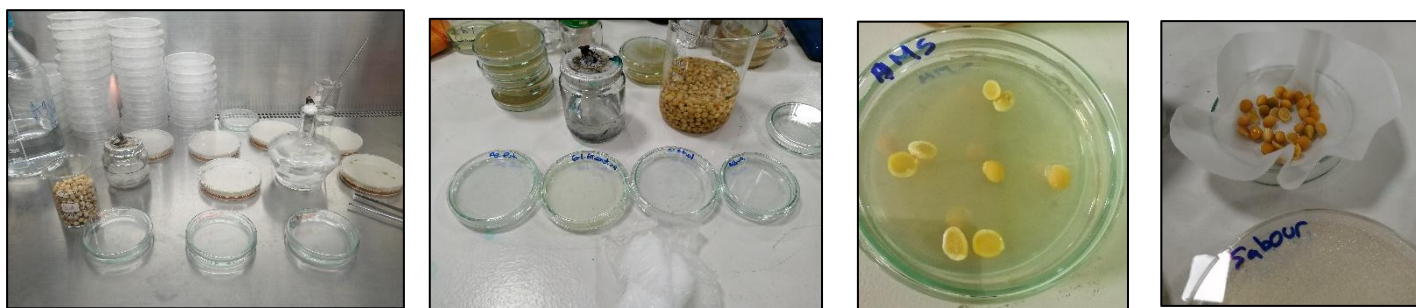


Fig. 8: Control Microbiológico de semillas de soja

A continuación, se procedió a elaborar la bebida, de acuerdo al protocolo descrito por Vaca 2011, con modificaciones. Se dejó en remojo 200g de soja durante 12hs y 200g de soja durante 18hs a temperatura ambiente, en proporción 1:6 y 1:9 de semillas y agua destilada respectivamente, con Bicarbonato de Sodio al 0,5%, en ambos tiempos de remojo, en total se elaboraron 4 tipos de bebidas.



Fig. 9: Proceso de elaboración de bebidas a base de Soja

Al culminar los tiempos de remojo, se escurrieron los granos hidratados enjuagando con agua destilada. Se procedió a descascarar los granos de forma manual y luego se realizó la cocción de los mismos en un nuevo lote de agua destilada con

Bicarbonato de Sodio al 0,5%. Este paso tiene como objetivo inactivar las enzimas lipoxigenasa y antitripsina responsables del mal sabor a las bebidas, y consiste en la ebullición, durante 15min a 100°C para su eliminación en forma de espuma y posterior desecho del agua amarga.

Una vez cocidos los granos, se procedió al licuado para obtener las bebidas, utilizando una licuadora de uso doméstico. Luego se procedió a filtrar la bebida obtenida separando el residuo (Okara) que luego será utilizado para la elaboración de las galletitas.

El proceso de filtración fue realizado con un filtro de tela. Una vez obtenido el filtrado, se procedió al agregado de los aditivos como el conservante, emulsionante y saborizante, como se observa en la Tabla 1, donde los códigos utilizados son L (leche) S2 (soja donada por el IPTA) y las letras a, b, c, d y e, representan a una formulación distinta y el blanco es la bebida sin aditivos. En el caso de la bebida de soja, se utilizó acida de sodio como conservante, Goma Xantica como emulsionante, Ácido Cítrico como antioxidante y saborizante de naranja. Luego se procedió a la pasteurización de las bebidas, entre 70-80°C durante 20min en placa eléctrica. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió al enriquecimiento con Omega-3 y probióticos. El enriquecimiento se realizó después de la pasteurización debido a que las propiedades del Omega-3 y la actividad de los probióticos (bacterias vivas encapsuladas) podrían verse afectadas con las altas temperaturas. Luego del enriquecimiento, el producto obtenido se conservó en la heladera hasta su consumo y análisis. El flujograma de la elaboración de las bebidas de soja se observa en la Figura 11.

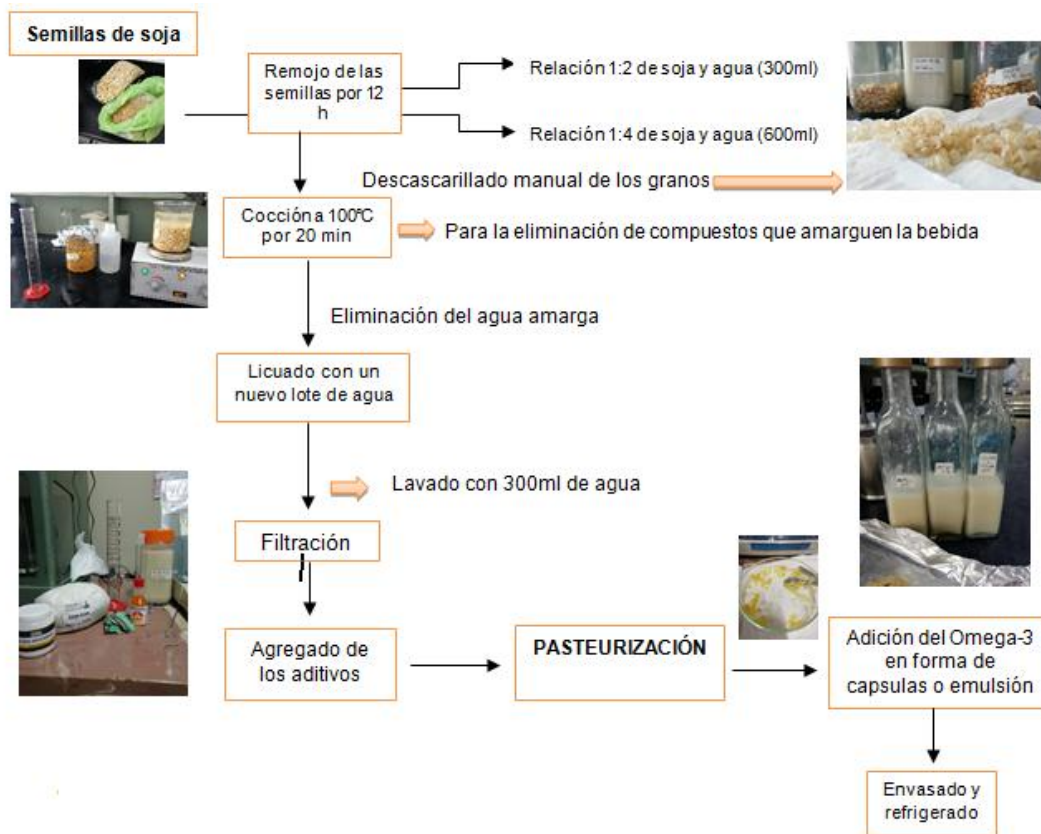
Tabla 1: Formulación porcentual de Bebidas obtenidas con relación soja:agua 1:4 y las mismas formulaciones para la relación soja:agua 1:6. Primer Lote

Muestras	Bebida	Stevia	Ac. cítrico	Cons.	G.X	Omega-3	Probióticos	Sabor
L1S2a	96	0,7	0,7	0,04	0,28	0,5 C	0,5	0,5
L1S2b	96	0,7	0,7	0,04	0,28	0,5 E	0,5	0,5
L1S2c	97	0,7	0,7	0,04	0,28	0,5 E	0,5	-
L1S2d	97	0,7	0,7	0,04	0,28	-	-	0,5

L1S2e	98	0,7	0,7	0,04	-	-	-
Blanco	100	-	-	-	-	-	-

GX indica Goma Xantica. **C** es agredado de cápsula y **E** de emulsión. **Cons.** indica conservante, este caso acida de sodio

Fig. 10: Flujograma de la elaboración de bebidas a base de soja



3.1.5. Elaboración de Galletitas de Okara

Después de la filtración realizada se procedió a secar el residuo obtenido en bandejas de acero inoxidable en horno eléctrico doméstico a 100°C por aproximadamente 48hs, para extraer el exceso de humedad.

Una vez seco el okara, se procedió a realizar las mezclas de ingredientes según la distribución de los componentes especificados en la Tabla 2. Se realizaron mezclas por separado en potes diferenciados para cada formulación, G1, G2, G3, G4, G5 y G6,

códigos que corresponden a cada formula desarrollada. Una vez realizadas las mezclas, se procedió al amasado y armado manual de las galletitas en forma circular hasta obtener una masa compacta, luego se llevó a hornear a 200°C por 30min, hasta obtener unas galletitas bien compactas y doradas. El flujograma de elaboración de las galletitas se observa en la figura 11 donde realizo la selección de las formulaciones que daban mejor textura a las galletitas.

Tabla 2: Formulación porcentual de galletitas de Okara de soja.

	Contenido en gramos					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Okara	40,4	36,2	24	5	24	24
H. Arroz	0	4,4	24	44	24	24
CMC	18,2	18	15	15	15	14
Ac. Soja	19,2	19	17	17	17	17
Stevia	1	1	1	1	1	1
A D.	18,2	18,4	15	15	14	15
Semillas	3	3	4	3	4	4
W-3 C	0	0	0	0	1	0
W-3 E	0	0	0	0	0	1

*Las formulaciones G1 y G2 fueron descartadas debido a que no se pudo obtener una buena textura. CMC indica carboximetilcelulosa, AD indica agua destilada. C es agregado de cápsula y E de emulsión.

Fig. 11: Flujograma de la elaboración de Galletitas a base de Soja



Luego del horneado, se dejaron enfriar las muestras obtenidas y se procedió al envasado y etiquetado de las galletitas por separado en bolsitas estériles para evitar su contaminación con agentes patógenos ambientales. Se mantuvo en refrigeración a 4°C de temperatura hasta su análisis.

3.1.6. Parámetros fisicoquímicos de calidad

Los índices físicos químicos determinados en las bebidas fueron: humedad y contenido de material volátil mediante el método de la estufa de vacío, (AOCS Ja 2a-46,2009), densidad relativa determinada utilizando un picnómetro calibrado a 20°C, índice de acidez mediante la técnica oficial (AOCS Ca 5a - 40, 2009), y contenido de proteínas por el método de Sorensen-Walker establecido por Meza *et al.*, (2013), utilizando un factor conversión de 2,24.

Para caracterizar las galletitas, la humedad se cuantificó mediante desecación en estufa a temperatura de 105°C hasta peso constante (AOAC, 952.08; 1990). Las cenizas se determinaron por calcinación en mufla a 550°C de temperatura, hasta la obtención de cenizas blancas y peso constante (AOAC, 938.08; 1990). Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl usando el factor de conversión 5,7 (AOAC, 24.027; 1984). Se realizó la determinación de grasas por el método de Randall (AOAC, 1990) y los lípidos fueron extraídos y cuantificados por el método de Bligh & Dyer, (1959). El contenido de hidratos de carbono se calculó por diferencia.

Para calcular el contenido de calorías se utilizaron los coeficientes Atwater, siendo 4,0 kcal/gramo para proteínas e hidratos de carbono y 9,0kcal/gramo para los lípidos.

3.1.7. Análisis sensorial de los alimentos formulados

La intensidad percibida de las bebidas atributos sensoriales de okara, fue analizada por 15 panelistas no entrenados (hombres y mujeres, de 25 a 60 años de edad). Los panelistas fueron instruidos previamente en los descriptores utilizados en este estudio. Se evaluó el color, aroma, sabor y textura de las 5 leches formuladas a fin

de conseguir un perfil sensorial del producto. A continuación, se elaboraron dos análisis discriminatorios y de preferencia entre todas las leches y solamente las leches enriquecidas con capsulas y emulsiones.

El análisis se realizó el día 7 post-elaboración. Suponiendo que este producto tiene una vida útil de 30 días, el período corresponde con la primera mitad de ese período. Por último, se desarrolló un cuestionario de aceptación del producto. Para los snacks de okara se evaluó el color, aroma, sabor y textura de los 3 snacks formulados con igual proporción de okara y harina de arroz. A continuación, se elaboraron dos análisis discriminatorios y de preferencia entre estos tres snacks y luego uno entre los snacks enriquecidas con capsulas y emulsiones. Por último, se desarrolló un cuestionario de aceptación del producto, a fin de conseguir un perfil sensorial del mismo. En este caso el análisis se realizó a las 48 h de elaborado el producto.

3.1.8. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por duplicado, y se expresaron como valor medio \pm desvío estándar. La diferencia entre los valores medios fue evaluada mediante el test de Duncan, y se consideró significativa con un valor P del 5%. Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat, de aplicación general desarrollado bajo la plataforma Windows (2017).

3.2. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE SOJA: SEGUNDO LOTE

Para el segundo lote de bebidas de soja, se realizaron cambios en las formulaciones debido a que las bebidas obtenidas en el primer lote no fueron estables y se producían dos fases, una de agua y otra de la parte solida de la soja, en el producto final, por lo cual se procedió a realizar varias pruebas con los aditivos utilizados, logrando obtener una mejor formulación para las mismas. La formulación final obtenida se puede observar en la Tabla 3.

Aditivos: Se emplearon los mismos reactivos utilizados en el Primer Lote, a excepción del ácido cítrico y del saborizante de naranja, que fue sustituido por ramas de canela obtenidas de un local comercial

Tabla 3: Formulación Segundo Lote bebidas de soja con relación soja:agua 1:6 y 1:9.

Muestras	Bebida	Conservante	G.X.	Omega-3	Probiótico	Canela
----------	--------	-------------	------	---------	------------	--------

L2S1a	98%	0,03	0,02	0,5 C.	0,5	1
L2S1b	96%	0,03	0,02	0,5 E	0,5	1
L2S1c	98%	0,03	0,02	0,5 E	0,5	0
L2S1d	98%	0,03	0,02	0	0	1
L2S1e	99%	0,03	0,02	0	0	0
Blanco	100%	0	0	0	0	0

GX indica Goma Xantica. C es agregado de cápsula y E de emulsión. El conservante utilizado fue Sorbato de potasio

Los procedimientos seguidos para la elaboración del segundo lote de bebidas de soja se describen en los puntos 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4 con las modificaciones detalladas en la Tabla 3. El antioxidante Ácido Cítrico fue eliminado de la formulación debido a que en pruebas realizadas se determinó que era uno de los causantes de la separación de las bebidas en dos fases, esto se concluyó ya que en las pruebas de las formulaciones se no se observó una separación en las bebidas que no contenían este aditivo. También se modificó el saborizante de naranja por ramas de canela, para eliminar los sabores cítricos utilizados inicialmente y obtener una bebida vegetal parecida a una leche normal. Esto permitió obtener una bebida de aspecto homogéneo y agradable a la vista. Los análisis de calidad fueron los mismos utilizados en el primer lote.

3.3. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE NUEZ DE MACADAMIA

3.3.1. Materia prima para la elaboración de bebidas de Nuez de Macadamia:

Frutos de nuez de macadamia: Se utilizó un lote de frutos secos de la variedad HAES 344 obtenidos de una empresa comercial de la ciudad de San Joaquín departamento de Caaguazú – Paraguay. Los frutos fueron recibidos en bolsas de

polietileno de 3Kg observado en la figura 12 y se almacenaron libres de oxígeno, luz y humedad a temperatura ambiente, hasta su uso.



Fig. 12: Nuez de macadamia utilizada en el proceso de elaboración de bebidas de nuez y galletitas, obtenida de la empresa Boombera Nuts

Aceite de Pescado: El aceite de pescado proveniente de hígados de raya refinado fue provisto por la empresa Omega Sur S.A. de la ciudad de Mar del Plata, cuyo contenido en EPA y DHA es 9,56 y 29,13% respectivamente.

Probiótico *Lactobacillus rhamnosus*: misma cepa utilizada en las bebidas vegetales a base de soja.

Aditivos: Para la elaboración de capsulas se utilizó Cloruro de Calcio, Goma Xantica y Alginato de Sodio; para las bebidas se utilizó Sorbato de potasio, saborizante de Chocolate y CMC adquiridos de un local comercial especializado en alimentos, mientras que para la elaboración de las galletitas se utilizó: avena, Aceite de Girasol y Stevia, obtenidos también de un local comercial especializado. Todos los reactivos poseían grado alimenticio.

3.3.2. Caracterización de la materia prima: 3 sub-lotes de semillas, conteniendo 10 semillas cada una, fueron pesadas en balanza analítica para calcular su peso promedio. También se trabajó con 3 sub-lotes de semillas para la longitud transversal a medición milimétrica.

La humedad se cuantificó mediante desecación en estufa a temperatura de 105°C hasta peso constante (AOAC, 952.08; 1990). Las cenizas se determinaron por calcinación en mufla a 550°C de temperatura, hasta la obtención de cenizas blancas y peso constante (AOAC, 938.08; 1990). Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl usando el factor de conversión 5,7 (AOAC, 24.027; 1984). Se realizó la determinación de Grasas por el método de Randall (AOAC, 1990) y los lípidos fueron extraídos y cuantificados por el método de Bligh y Dyer (1959). El contenido de

hidratos de carbono se calculó por diferencia. Además se estudió un método de extracción con metanol:isopropanol, como una modificación del método de Mereles *et al.*, 2015, a fin de evaluar la posible diferencia de los ácidos grasos obtenidos con esta metodología.



Fig. 13: Caracterización de la materia prima realizado en el INIDEP – Mar del Plata

El perfil de ácidos grasos se llevó a cabo mediante metilación alcalina en frío de los mismos y posterior cromatografía gaseosa (ISO 12966-2:2011). Se utilizó un equipo Shimadzu® GC-2010 acoplado a un espectrómetro de masas GCMS-QP2010 plus, equipado con inyector Split/Splitless e inyector automático AOC-20i, se utilizó una columna capilar Supelco® Omegawax 320 (30m x 0,32mm x 0,25 μ m) y Split 100:1.

3.3.3. Protocolo de elaboración de las capsulas de Omega-3 y las capsulas de Probióticos.

Se utilizó el mismo procedimiento que en las bebidas de soja. Ir a la página 34.

3.3.4. Protocolo de elaboración y formulaciones de las bebidas de nuez de macadamia

Los frutos de nuez fueron seleccionados y desinfectados de la misma manera que en las semillas de soja.

A continuación, se procedió a elaborar la bebida, de acuerdo al protocolo descrito por Salva (2017), para bebidas a base de almendras, del cual se realizaron algunas modificaciones.

Se dejaron en remojo los 200g de los frutos durante 3hs y 4hs a temperatura ambiente, en proporción 1:2 y 1:4 (100gr de frutos y 200 – 400ml de agua) de frutos y agua destilada respectivamente, en total se elaboran 4 tipos de bebidas. Al culminar los tiempos de remojo, se escurrieron los frutos hidratados enjuagando con agua destilada. Se realizó la cocción de los frutos en un nuevo lote agua destilada, para inactivar compuestos tóxicos que dan un mal sabor a las bebidas, por 15min a 100°C, en el

momento que entra en ebullición, se eliminan en forma de espuma, luego se eliminó el agua amarga. Una vez cocidos los frutos, se procedió a la realización de las bebidas, moliendo los mismos en una licuadora de uso doméstico.

Luego se procedió a filtrar la bebida obtenida separando el residuo que luego fue utilizado para la elaboración de las galletitas. El proceso de filtración se realizó con un filtro de tela.

Una vez obtenido el filtrado, se procedió al agregado de los aditivos como el conservante, emulsionante y saborizante con las proporciones detalladas en la Tabla 5, los códigos L1N1, corresponden a L de leche, y N de nuez de macadamia el numero 1 indica que es el primer lote, y el blanco no contiene los aditivos. En el caso de la bebida de nuez se utilizó, Sorbato de potasio como conservante, CMC como emulsionante y saborizante de chocolate. Luego se procedió a la pasteurización de las bebidas, entre 70-80°C durante 20min. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió al enriquecimiento con las capsulas y emulsión de Omega-3 y las capsulas con los probióticos. Esto se realizó después de la pasteurización por los motivos citados anteriormente. En la figura 14 se puede observar el proceso de cocción, licuado y filtrado de las bebidas vegetales, y el envasado de las mismas y en la figura 15 el flujograma de elaboración de las bebidas vegetales.



Fig. 14: Proceso de elaboración de las bebidas de Nuez de Macadamia

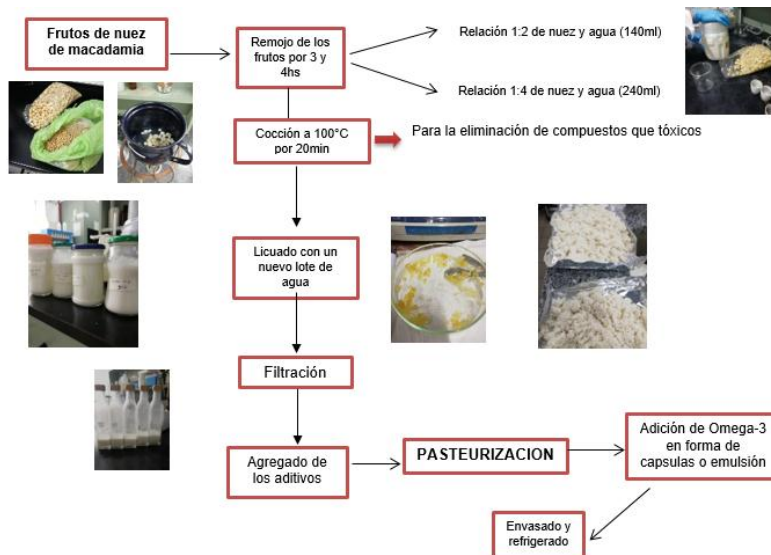


Fig. 15 Flujograma de la elaboración de bebidas a base de Nuez de Macadamia

3.3.5. Formulación de las bebidas realizadas: Datos en porcentaje de los aditivos utilizados en las formulaciones de las bebidas vegetales.

Tabla 4: Formulación de las bebidas a base de nuez de macadamia con distintos de tiempo de remojo y proporción de agua, 1:2 y 1:4 de proporción de agua, por 3hs y 4hs.

Muestras	Bebida	Stevia	CMC	Conservante	Omega-3	Probiótico	Saborizante
L1N1a	97,5	0,5	0,1	0,1	0,5 caps	0,15	1
L1N1b	97,5	0,5	0,1	0,1	0,5 emul	0,15	1
L1N1c	98	0,5	0,1	0,03	0	0	1
L1N1d	99	0	0,1	0,03	0,5 caps	0,15	0
Blanco	100	0	0	0	0	0	0

3.3.6. Protocolo y formulación de Galletitas de Nuez

Después del paso de filtración en la elaboración de la bebida, se obtuvo un residuo tipo harina, tal como se mencionó anteriormente, que fue destinado a la elaboración de galletitas. En la Tabla 5 se especifica la distribución porcentual de los componentes de cada fórmula seleccionada para la elaboración de galletitas de harina de nuez. Siendo los códigos G1 – G6 el número de galletitas elaboradas perteneciente a una formulación distinta,

Tabla 5: Formulación porcentual de las galletitas a base de Nuez de Macadamia

Contenido	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Nuez	39,02	38,65	38,65	39,41	39,41	14,39
Avena	39,02	38,65	38,65	39,41	39,41	57,55
Ac. Girasol	12,68	12,56	12,56	12,81	12,81	11,73
CMC 0,2%	5,37	5,31	5,31	5,42	5,42	5,90
Stevia	1,95	1,93	1,93	1,97	1,97	2,52

Capsulas	0	0,97	0	0,99	0	0
Emulsión	0	0	0,97	0	0,99	0
Chocolate	1,95	1,93	1,93	0	0	0

La forma de elaboración es la misma a la mencionada para galletitas de soja, con la diferencia que los residuos de nueces se secaron más rápido que los residuos de Soja.

Una vez seco el Okara, se procedió a realizar las mezclas de ingredientes observados en la tabla 6. Se realizaron las mezclas por separado en potes diferenciados para cada formulación (G1 – G6). En la figura 16 se puede observar el proceso de elaboración de las galletitas, desde el agregado los ingredientes, el preparado de las masas y el horneado de las mismas. Una vez realizada las mezclas, se llevó a hornear a 200°C por 30min, hasta obtener unas galletitas bien compactas y doradas. Y en la figura 17 se observa el flujograma de elaboración de las galletitas.

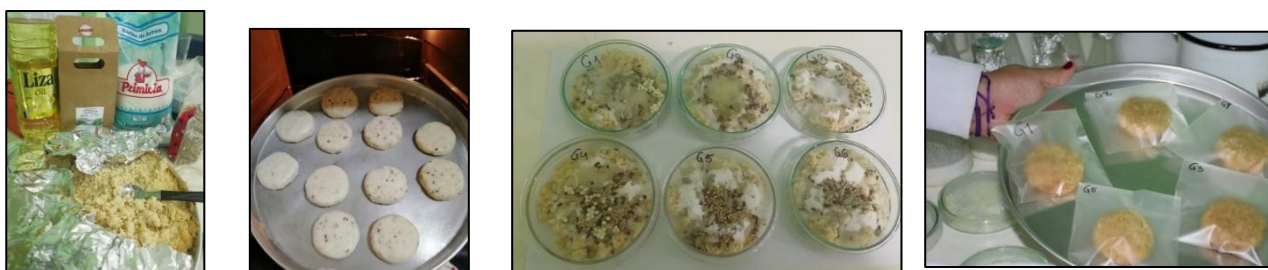


Fig. 16: Proceso de elaboración de las galletitas de okara de Nuez de Macadamia

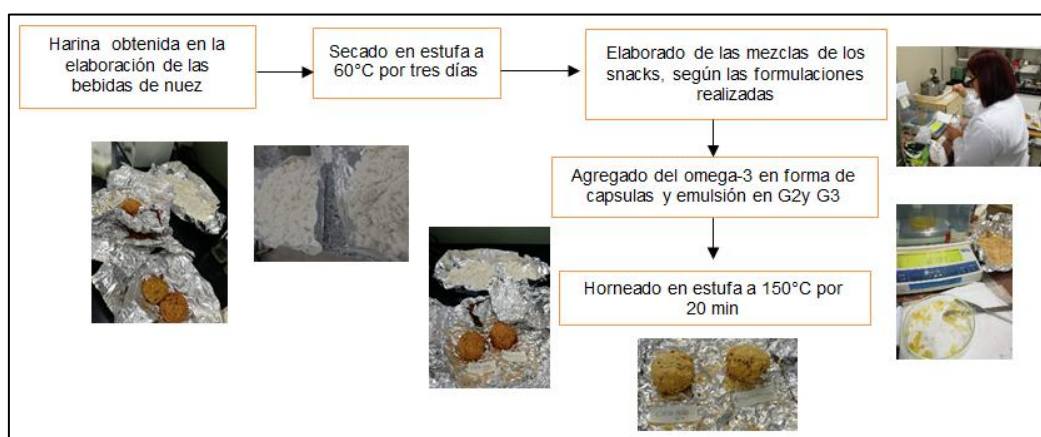


Fig.

17: Flujograma de elaboración de Galletitas de Nuez de Macadamia.

3.3.7. Análisis sensorial de los alimentos formulados

La intensidad percibida de las bebidas, fue analizada por 22 panelistas no entrenados (hombres y mujeres, de 25 a 65 años de edad). Los panelistas fueron instruidos previamente en los descriptores utilizados en este estudio. Se evaluó el color, aroma, sabor y textura de las 4 leches formuladas a fin de conseguir un perfil sensorial del producto. Se analizaron las leches a remojo de 3 hs en proporción 1:4 debido al mayor rendimiento. A continuación, se elaboraron dos análisis discriminatorios y de preferencia entre leches enriquecidas con capsulas y emulsiones.

El análisis se realizó el día 7 post-elaboración. Suponiendo que este producto tiene una vida útil de 30 días, el período corresponde con la primera mitad de ese período. Por último, se desarrolló un cuestionario de aceptación de compra del producto. Para las galletitas de nuez se evaluó el color, aroma, sabor y aceptación de las galletitas formuladas con igual proporción de avena y nuez. A continuación, se elaboraron dos análisis discriminatorios y de preferencia entre las galletitas enriquecidas con capsulas y emulsiones. Por último, se desarrolló un cuestionario de aceptación del producto. A fin de conseguir un perfil sensorial del mismo. En este caso el análisis se realizó a las 48 hs de elaborado el producto.

3.3.8. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Tanto las mediciones físicas de las materias primas utilizadas, como las determinaciones químicas de los productos obtenidos se analizaron por duplicado, realizándose triplicado en los casos que el coeficiente de variación de los resultados fuese mayor al 5%. Los resultados de estas determinaciones se expresaron como valor medio.

3.3.9. Parámetros físico químicos de calidad de los productos obtenidos

Los índices físicos químicos determinados para analizar las bebidas fueron: humedad y contenido de material volátil mediante el método de la estufa de vacío, (AOCS Ja 2a-46, 2009), densidad relativa determinada utilizando un picnómetro calibrado a 20°C, índice de acidez mediante la técnica oficial (AOCS Ca 5a - 40, 2009), y contenido de proteínas por el método de Sorensen-Walker citado por Meza et al., (2013), utilizando un factor conversión de 2,24.

Para caracterizar las galletitas de nuez se las determinaciones realizadas fueron humedad, cenizas, proteínas, grasas y el perfil de ácidos grasos descriptos anteriormente

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados de resistencia de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* como probiótico

Para poder utilizar las cepas de lactobacilos, se realizaron pruebas de resistencia a: acidez (pH) y bilis. Debido a que la cepa utilizada fue aislada de queso fresco (más conocido como queso Paraguay) proveniente de la ciudad de Itaugua, no se conoce el comportamiento de la cepa como probiótico, según bibliografías consultadas la especie de lactobacilo aislada es comúnmente utilizada como probiótico, por lo cual se realizaron estas pruebas para asegurar que podrán ser resistentes al someterse a un porcentaje de acidez y bilis crítico (pH 3 y 0,3% de Bilis).

Las pruebas, consistieron en verificar si las cepas sobrevivían a acidez crítica (Lim, 2009), realizándose una prueba en medio de cultivo MRSB modificando el pH del medio con Ácido Clorhídrico 0,1N e Hidróxido de sodio 0,1N. Los pH fueron 1, 2, 3, 4 y 5, siendo el pH más importante el pH 3, debido a que es el valor dentro del estómago.

Con respecto al porcentaje de Bilis se utilizó el medio de cultivo Caldo verde brillante de bilis (BRILA) que fue preparado en distintos porcentajes de concentración de bilis siendo de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5, respectivamente. En este caso el porcentaje de 0,3 es el más importante debido a que corresponde al porcentaje de bilis dentro del estómago.

Estos análisis se realizaron para evaluar y analizar si las cepas podrían resistir el proceso de digestión. Como se puede observar en la figura 18, se obtuvieron buenos resultados cuantificándose una cantidad elevada de unidades formadoras de colonias (UFC) a pH 3, el pH crítico. Lo mismo se puede observar en la figura 19, en donde se cuantificaron una cantidad elevada de UFC a una concentración de 0,3% de bilis.



Fig. 19:
resistencia
bilis

De la misma manera, se realizó un estudio de control de viabilidad de los probióticos encapsulados, luego de 24 y 48hs de preparación de las capsulas, donde se

seleccionaron 15 capsulas de probióticos y se procesó en 100ml de peptona wáter al 0,5% en una bolsa estéril de cultivo. Las capsulas fueron trituradas con ayuda de un mortero de porcelana y se inoculo en medio de cultivo MRSA y en placas petrifilm para detección de Bacterias Acido Lácticas (BAL). Se logró detectar presencia de estas bacterias y en cantidades optimas de UFC.

También se realizó una prueba de detección de los probióticos en las bebidas vegetales, para analizar la viabilidad de las mismas en sustratos diferentes y fueron detectadas en placas petrifilm. Se pudo detectar la presencia de los probióticos en las bebidas vegetales tanto en soja como en la nuez, sin que las mismas hayan sufrido cambios fisicoquímicos, como cuajado o cambios de pH debido a que los probióticos tienden a formar ácido láctico, lo que podría fermentar la bebida elaborada. Al estar encapsulados, este proceso se retrasa obteniendo buenos resultados durante 10 días, donde se observó una ligera disminución del pH de 7 a 6 y a partir del día 15, se observó un cambio en el pH de 7 a 4,5; este cambio podría afectar el sabor de las bebidas vegetales y deteriorarlas. Por lo tanto, la viabilidad de las cepas de BAL en las bebidas vegetales es de 10 días, sin producir ningún tipo de cambio

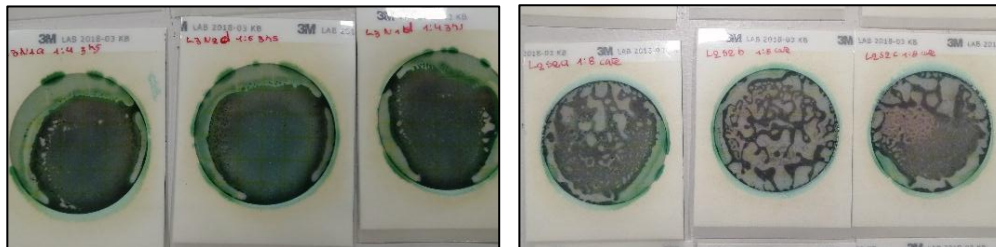


Fig. 20: Detección de BAL en bebidas vegetales a base de a) nuez y de b) soja

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN PRODUCTOS A BASE DE SOJA

4.2.1. Caracterización de la materia prima

Análisis proximal de la materia prima: en las Tablas 6 y 7 se detallan los resultados obtenidos en el análisis proximal de las semillas del primer y segundo lote. Se observan diferencias en ambos lotes, en especial en el contenido proteico, grasas y humedad. Podemos decir que estas diferencias se deben al tiempo de cosecha de los lotes de semillas, que puede llegar a influir en el contenido nutricional de las semillas.

Tabla 6: Composición del análisis proximal de las semillas de soja, primer lote.

Muestra	%Humedad	%Cenizas	%Proteína	%Grasas	%H.C
SOJA	2,12	4,7	7,1	65,1	20,98

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2)

Tabla 7: Composición del análisis proximal de las semillas de soja, segundo lote

Muestra	%Humedad	%Cenizas	%Proteína	%Grasas	%H.C
SOJA	8,46	5,26	36,89	19,63	29,76

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2)

Según lo reportado por Chavarría, (2010), el porcentaje de proteína obtenido es de 40%, grasa 21%, carbohidratos 34% y cenizas 4,9%, estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el segundo lote (Tabla 7), en comparación con los resultados obtenidos en el primer lote, donde se puede observar que el porcentaje de grasa es mayor que lo reportado en bibliografía. López, (2013) reporto datos de 36,5% de proteínas, 19,94% de grasas, y 30,16% de carbohidratos, estos datos concuerdan con lo obtenido en el segundo lote de semillas. Al analizar los resultados, se observa que el segundo lote de semillas contiene mejores características nutricionales para ser utilizadas.

El perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica del aceite de soja, se presenta en la Tabla 8. Puede observarse que el contenido en ácido linoleico es el más alto, seguido del oleico y palmítico. Estos resultados concuerdan con lo establecido por la norma CODEX, y con datos de bibliografía para aceites de soja (O'Brien, 2004, Ribeiro *et al.*, 2009).

Tabla 8: Composición de ácidos grasos obtenidos en el aceite de soja

Ácido Graso	Aceite B&D		Norma CODEX
	mg/mg	%	%
16:0 PALMITICO	0,053	10,21	8-13,5
18:0 ESTEARICO	0,021	4,05	2-5,4
20:0 ARAQUIDICO	0,001	0,19	0,1-0,6

22:0 BEHENICO	0,001	0,19	ND-0,7
saturados	0,076	14,64	0
18:1n9 OLEICO	0,11	21,19	17-30
22:1n9 ERUCICO	0	0,00	ND-0,3
Mono saturados	0,11	21,19	0
18:2n6 LINOLEICO	0,288	55,49	48,0 -59,0
18:3n3 LINOLENICO	0,045	8,67	4,5-11
EPA	0	0,00	
DHA	0	0,00	
poliinsaturados	0,333	64,16	
Total:	0,519	100	

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2).

En la tabla se observa que el contenido de EPA y DHA, es 0, por lo tanto, es factible el enriquecimiento de las bebidas con estos ácidos grasos.

4.2.2. Caracterización fisicoquímica de las bebidas vegetales de soja

En las Tablas 9 y 10 se resumen los datos obtenidos de los análisis fisicoquímicos realizados, donde los valores de humedad se corresponden con las formulaciones establecidas. De esta manera el mayor contenido porcentual de cada bebida corresponde a la humedad, que está asociado al contenido de agua incorporado durante la elaboración. Otros autores como O'Toole, (2016) y Palacios-Perilla y Acero, (2017) informaron valores ligeramente inferiores para las bebidas del mismo tipo siendo 93 y 90% respectivamente. Jiang, (2013) informo valores de humedad similares a los del presente trabajo, en bebidas de soja elaboradas a partir de la semilla y de la semilla germinada.

Todos los valores de densidad se encontraron en el rango de 0,96-1,03 g/ml. Estos datos son concordantes con otros estudios realizados sobre bebidas de soja por Palacios-Perilla y Acero, (2017) quien reportó datos similares de densidad, con 1,03 g/ml para la bebida de soja.

Tabla 9: Composición físico química del primer lote de las bebidas vegetales de soja, proporción 1:4 de 18hs

Código	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	pH	Acidez (%)	Proteínas (%)
L2S1a	95,7	1,02	3,40	0,24	1,344

L2S1b	92,7	1,02	3,18	0,3	1,344
L2S1c	96,2	1,03	3,38	0,1	1,568
L2S1d	97,8	1,01	2,88	0,17	1,120
BLANCO	96,7	1,02	2,89	0,3	1,456

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2).

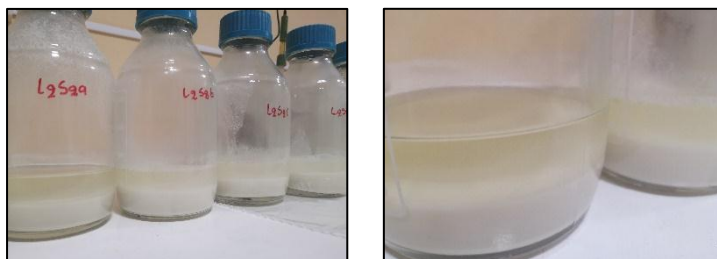
Tabla 10: Composición fisicoquímica del segundo lote de las bebidas a base de soja.

Código	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	pH	Acidez (%)	Proteínas (%)
1:9, 18h					
L2S2a	97,2	0,98	8	0,05	6,095
L2S2b	97,02	0,99	8,13	0,045	4,77
L2S2c	97,31	0,97	7,2	0,03	5,83
L2S2d	97,55	0,98	8,6	0,05	4,24
BLANCO	97,3	0,96	8,18	0,02	3,71
1:6, 18h					
Código	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	pH	Acidez (%)	Proteínas (%)
L2S2a	95,7	0,98	7,13	0,06	4,77
L2S2b	92,7	0,97	6,86	0,045	4,77
L2S2c	96,2	0,95	6,63	0,045	4,77
L2S2d	97,8	0,97	7,63	0,045	4,77
BLANCO	96,7	0,97	7,006	0,045	5,03

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2).

En cuanto al pH, los valores obtenidos en el primer lote se encuentran en un rango de 2,88-3,40. Estos datos difieren drásticamente con lo reportado en bibliografía, probablemente debido a la variedad y el periodo estacional de la soja utilizada como materia prima ya que se observaba que aún no estaban maduras, además en la caracterización de la metria prima (Tabla 7), los valores obtenidos estaban por debajo de lo reportado, por lo que se puede concluir que las semillas no eran buenas para la elaboración del producto. El pH también pudo haber sido afectado por la adición del

Ácido Cítrico, debido a que en el primer lote bebidas de soja el líquido se separaban en dos fases (agua y soja), y este efecto se debe a la acidez provocada en a las bebidas, que luego fue eliminada en la formulación del segundo lote, donde se observó un pH dentro del rango de 6,6 – 8,6 datos que si concuerdan con lo reportado en bibliografía. En la figura 24 se observa la separación de las fases de la bebida de soja.



El bajo nivel del pH pudo deberse, además, a que el saborizante utilizado era de sabor a Naranja, que también pudo haber afectado a la acidez del producto, en los frascos donde no se adicionaba este compuesto, no se observaba esta separación. López (2013), reportó datos cercanos a la neutralidad mientras que Palacios-Perilla y Acero (2017), reportó un pH de 5,26. En cuanto al porcentaje de acidez, los valores obtenidos están dentro del rango de 0,1-0,3 g% de ácido oleico. Estos datos son concordantes con valores reportados por Palacios-Perilla y Acero (2017).

El porcentaje de proteínas arrojó valores mayores a 1% en el primer lote, en todas las formulaciones hechas, siendo ligeramente superiores a lo reportado por Palacios-Perilla y Acero (2017). Oyedeji *et al.* (2018), también encontraron valores similares que oscilaron entre 1,24 a 2,26 % de proteína, en bebidas de soja y soja germinada. Jiang, (2013) reportaron valores ligeramente superiores al 2% y en comparación con los resultados reportados por García-Saavedra, (2017) y Mäkinen *et al.*, (2016) que obtuvieron valores mayores al 3%, los datos obtenidos en el primer lote fueron estadísticamente inferiores, pero si concuerdan con los porcentajes obtenidos en el segundo lote, que arrojaron valores mayores a 4% y 6%. En la figura 21 se observa el proceso de análisis de pH y acidez realizado por la técnica de Sorensen-Walker.



Fig. 21: Proceso de análisis de pH y acidez de las bebidas de soja

4.2.2.1. Caracterización Microbiológica de las semillas y bebidas vegetales de soja

Semillas de soja: Para el análisis microbiológico se siguió el proceso de Sepulveda, (2005), que menciona el uso del medio un de cultivo especial para hongos Agar Malta Sal (AMS), con un contenido de NaCl de 50 g/l. La sal es agregada con varios fines: evitar la germinación de los granos, aumentar la presión osmótica, al bajar la actividad de agua en el cultivo y facilitar el crecimiento de hongos, en especial las especies de *Aspergillus*. Este medio, debido a sus nutrientes solubles, estimula el desarrollo de muchos hongos, en especial los de crecimiento rápido.

También se utilizaron otros medios de cultivos generales para la detección de hongos como Potato Dextrosa Agar y Yeast and Mould Agar, en los cuales las semillas de soja germinaron, demostrando así que el medio de cultivo más apto para este tipo de análisis es el AMS.

Este análisis fue realizado con el fin de detectar presencia o ausencia de hongos y en los granos de soja. En los resultados observados en la figura 22 se puede observar un crecimiento de hongos en algunos granos de soja. En cada placa de Petri se colocaron 5 semillas de soja distribuidas en los costados y una semilla en el centro, y luego de 5-7 días de incubación, se observó el crecimiento de hongos en la superficie de 2 a 3 granos por placa de Petri.

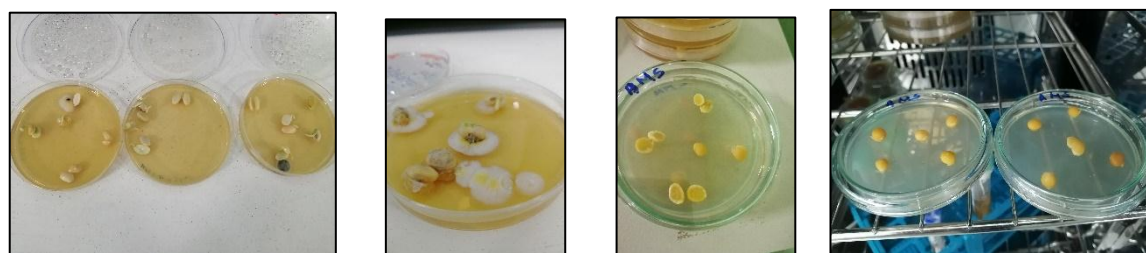


Fig. 22: Resultados microbiológicos obtenidos en semillas de soja, luego de la desinfección

Para la caracterización de los hongos encontrados se procedió a realizar una tinción con Verde de Malaquita observados en la figura 23.

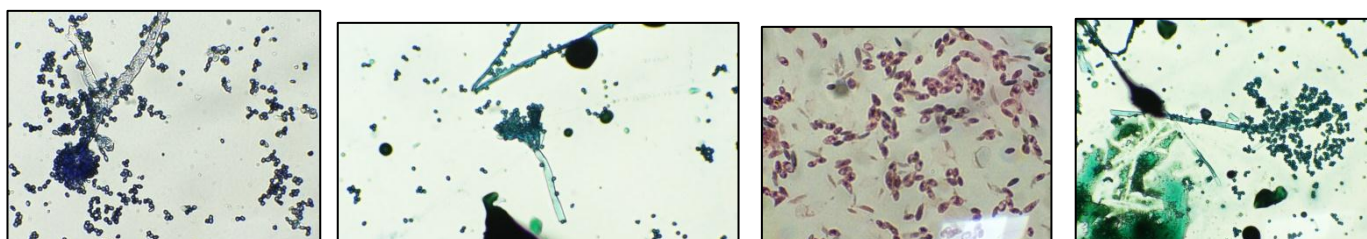


Fig. 23: Observación en microscopio de los microorganismos encontrados en semillas de soja a 100x

De acuerdo a las imágenes de la figura 23, podemos observar la presencia de *Pecicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y algunas esporas que podrían a llegar a ser de *Fusarium sp.* Se recomienda realizar más estudios para poder caracterizar las especies de micro hongos hallados.

Bebidas vegetales: Para los análisis microbiológicos se siguió el proceso de Codina, (2017). Para detección de Aerobios Mesófilos (AM), Entero bacterias (EB), Coliformes Fecales (CF), Lactobacilos (LB). Se utilizaron los medios cada uno de 500ml, Plate Count Agar (PCA), Yeast and Mould Agar (YM), Chrom Agar (CH), Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA), y placas petrifilm para detección de mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y E-coli. Para los medios en placas de Petri se utilizaron 100µl de las muestras y se realizó una extensión con aza de drygalsky, en cambio, para placas petrifilm se utilizaron 1000µl de las muestras. Las mismas fueron analizadas en el día 1, 4 y 15 como se observa en la tabla 13, se muestran crecimientos de e-coli en los lotes de códigos L2S2a, L2S2b en el día 4 en placas petrifilm (figura 24), no se encontraron crecimientos de microorganismos en muestras analizadas en placas de Petri en los distintos medios mencionados, y los crecimientos encontrados pertenecen a la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, corroborado por tinción Gram (figura 25), bacteria que fue inoculada en forma de capsulas en las bebidas, resultado esperado, debido a que se demuestra que las bacterias siguen vivas en los productos hasta el día 15 .

Tabla 11: Resultados de los tratamientos microbiológicos realizados en bebidas de soja

Microorganismo	Cultivos en placas de Petri		
	Día 1		
	YM	PCA	CH
AM	-	0	0
EB	-	0	0
CF	-	0	0
<i>Escherichia coli</i>	-	3 UFC	3 UFC
LB	-	-	>300 UFC

Mohos	y	0	-	-
Levaduras				

El termino UFC se refiere a unidades formadoras de colonias

Microorganismo	Cultivos en placas de Petri		
	Día 4		
	YM	PCA	CH
AM	-	3 UFC	4 UFC
EB	-	-	-
CF	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	7 UFC	7 UFC
LB	-	-	>300 UFC
Mohos y Levaduras	1 UFC	-	-

Microorganismo	Cultivos en placas petrifilm L2S2a 1:8					
	Día 1			Día 4		
	LAB	MyL*	CC	LAB	MyL	CC
<i>Escherichia coli</i>	-	-	3 UFC*	-	-	6 UFC
LB	>100	-	-	>300 UFC	-	-
Mohos y Levaduras	-	0	-	-	1 UFC	-

UFC, unidades formadoras de colonias, MyL, mohos y levaduras, CC código de la placa de petrifilm utilizada para detección de e-coli

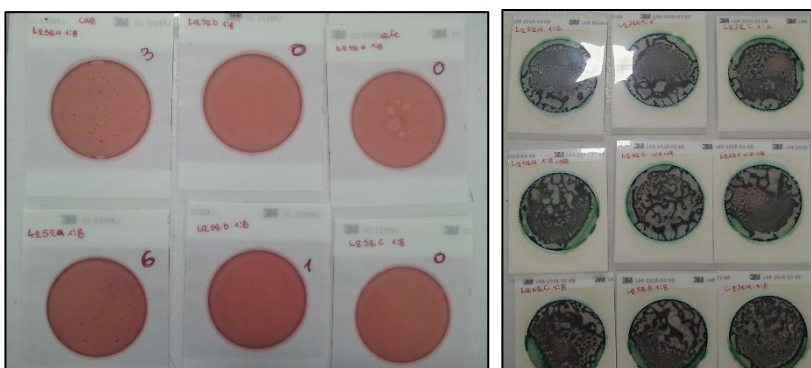


Fig. 24: Crecimiento de e-coli y BAL en placas petrifilm en el día 1 y 4

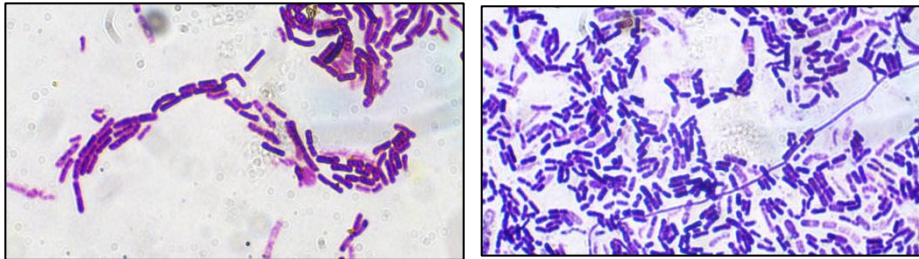


Fig. 25: Observación en microscopio de las cepas crecidas en placas Petri. A 100x, tinción Gram, Lactobacilos

4.2.3. Caracterización fisicoquímica de las galletitas de soja

Okara: Las primeras formulaciones incluyeron ingredientes y modificaciones de procesamiento para producir el sabor y la textura adecuados. Cuando la masa estaba constituida por una proporción de okara superior al 50%, los productos se dividieron en migajas. Cuando el okara y la harina de arroz se agregaron en la misma proporción, los productos formulados resultaron con menos problemas de ligadura. El mayor contenido de arroz produjo un aperitivo sin aireado correcto.

Por lo tanto, los refrigerios formulados con la misma tasa de arroz y okara se enviaron para análisis fisicoquímicos y calóricos. Los datos sobre la composición química de las galletas se presentan en la Tabla 10. Las características fisicoquímicas de los refrigerios no mostraron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones. Los valores obtenidos están dentro de los rangos esperados para este tipo de productos. La humedad y las cenizas están de acuerdo con el contenido de agua agregado en cada caso, de acuerdo con la composición porcentual. Además, los valores de humedad están de acuerdo con los datos reportados por Navam, (2014) en bocadillos formulados con cereales fortificados con diferentes porcentajes de soja. El contenido de proteína mostró un promedio de 17% en las 3 preparaciones, siendo más alto que el 11% reportado en okara y bocadillos de trigo por Katama y Wilson, (2008) y el 12% reportado por Ostermann-Porcel, (2017) en galletas libre de gluten desarrolladas con okara y harina de mandioca comercial. Por otro lado, este valor estaba en el rango de preparaciones fortificadas de tortilla de maíz con un 20-25% de okara reportado por Waliszewski *et*

al., (2002) que también muestra los resultados obtenidos para el valor calórico en cada muestra.

La fibra dietética juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos y en la prevención de enfermedades de diferente origen. Por lo tanto, la ingesta diaria de alimentos ricos en fibra dietética es importante para reducir o regular los niveles de colesterol y triacilglicerol en plasma y para promover la salud. Un amplio rango de variación para los niveles de energía para las barras de cereal (de 72.8 a 321.70 kcal.100 g-1) ha sido reportado en la literatura Gutkoski, (2007); Dutcosky, (2006). Además, Costa García, (2012) ha reportado un nivel de energía de 385.95 kcal.100 g-1 de barras con alto contenido de salvado de arroz. El nivel de energía de la merienda del presente trabajo está de acuerdo con los niveles reportados en la literatura. Por otro lado, los ingredientes utilizados en la formulación permitieron obtener productos con bajo valor calórico, ya que se calculó una porción de 20 g.

Con respecto al perfil de ácidos grasos, todos los productos obtenidos mostraron valores de EPA y DHA de acuerdo con el contenido de aceite de pescado utilizado como aditivo para el enriquecimiento, el cual no se perdió por más que las galletitas hayan sido sometidas a temperaturas mayores a 100°C. El EPA es el precursor de las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, y el DHA es un componente de la membrana de fosfolípidos del cerebro y las células de la retina, por lo tanto, ambos ácidos grasos son esenciales para la salud humana, mostrando acciones sobresalientes en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Fournier et al., 2007; Zhong et al., 2007). Sus beneficios para la salud humana han motivado, en las últimas décadas, el desarrollo de productos con su incorporación en forma de aditivos, emulsiones o cápsulas, como se presenta en el presente trabajo.

Los prototipos de galletitas se diseñaron de manera tal que sus ingredientes y propiedades sensoriales estuvieran dentro de la categoría comercial existente de las mismas. Los atributos sensoriales de las galletitas se presentan en la Tabla 12. Todos los snacks arrojaron valuaciones de sabor, aroma, y color aceptable. Además, todos fueron aceptados por los panelistas. Las galletitas con añadidos de capsulas resultaron evaluados con el mejor sabor, sin embargo, el aroma fue el menos aceptado, aunque los datos estuvieron dentro de los valores aceptados en la escala hedónica. En cuanto al color, no se mostraron diferencias significativas entre los 3 snacks evaluados. En el

estudio de aceptación final, las puntuaciones más altas las tuvieron los snacks enriquecidos en Omega 3.

Tabla 12: Análisis proximal de las galletitas de okara.

Muestra	G3	G5	G6
% Humedad	15,25	13,49	12,91
% Cenizas	2,58	2,42	2,50
% Proteínas	17,34	17,64	17,31
% Grasas	21,83	22,03	21,93
%HdC	19,92	20,06	19,81
%Fibra	23,08	24,36	25,54
% Kcal	345,51	349,07	345,85
Kcal (20g)	69,10	69,81	69,17

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2).

Las características fisicoquímicas de las galletitas no muestran diferencias significativas, entre las diferentes formulaciones. Los valores obtenidos están dentro parámetros dentro de los rangos esperados para este tipo de productos. La humedad y las cenizas están de acuerdo con el contenido de agua agregado en cada caso, según la composición porcentual.

4.2.4. Análisis sensorial de los productos obtenidos

Bebidas de soja: Uno de los principales objetivos de la industria alimentaria es fabricar productos con buena aceptación sensorial. Para alcanzar este objetivo y superar una fuerte competencia dentro de cada sector, los productos deben cumplir con las expectativas del consumidor. En este trabajo, el análisis sensorial se llevó a cabo con 8 panelistas voluntarios instruidos en los atributos que se desea evaluar para una aceptación o no incipiente de este tipo de productos.

Las muestras se presentaron a $5 \pm 1^\circ \text{C}$, servidas en vasos de poliestireno codificadas con letras, Las mismas fueron presentadas en sectores individuales, con buena luz preferentemente natural y temperatura de 23°C . El análisis se realizó

sirviendo muestras de 30 ml a cada una al consumidor. Los participantes fueron instruidos para ingerir una galleta y beber agua entre las muestras a fin de neutralizar el paladar si era necesario. Los panelistas evaluaron la aceptación de las muestras utilizando una escala hedónica híbrida de 9 puntos (Drake, 2007), donde 1 = me disgustó mucho, y 9 = me gustó extremadamente. Había un espacio para observaciones y comentarios. En paralelo se realizó a esos mismos panelistas si normalmente consumirían el producto, respondiendo con sí o no.

La prueba se llevó a cabo después de que las muestras se hubieran sometido a refrigeración durante 7 días, correspondiente a menos de la mitad de lo normal estimado como vida útil comercial de este tipo de productos (15 días). La Tabla 13 muestra los valores obtenidos para las bebidas de soja.

Tabla 13. Evaluación sensorial de las bebidas de soja del primer lote

MUESTRA	Sabor	Aroma	Color	Aceptación
L2S1a	3	5	6,4	3,8
L2S1b	4	5,3	6,6	4
L2S1c	4	5,2	6	4
L2S1d	4,5	6,0	6,8	4,5
BLANCO	4	6,5	6,2	4,3

Escala hedónica de 9 puntos (1 = ME DISGUSTA EXTREMADAMENTE, 9 = ME GUSTA EXTREMADAMENTE).

Las bebidas de soja resultaron ácidas, probablemente debido a la variedad y época de cosecha de la semilla. Este aspecto fue señalado por casi todos los panelistas, las bebidas con emulsión de Omega-3 no arrojaron, en general apreciaciones negativas en cuanto al sabor ni al aspecto. Sólo un panelista mencionó la presencia de emulsión visual y el aroma era característico a la materia prima, ligeramente suave. El color, blanco amarronado resultó el atributo de mayor aceptación. No se mostraron diferencias significativas entre los valores de aceptación del producto. Cabe resaltar que la evaluación sensorial realizada dio lugar al cambio en la formulación de las bebidas para el segundo lote, donde los resultados en la estabilidad de las bebidas fueron positivos, el sabor ácido fue eliminado, la coloración de las bebidas resultó diferentes al primer lote debido a la rama de canela, que proporciona un color amarronado suave a las bebidas.

Galletitas de okara de soja: Los prototipos de galletitas se diseñaron de manera tal que sus ingredientes y propiedades sensoriales estuvieran dentro de la categoría comercial existente de las mismas.

Los atributos sensoriales de las galletitas se presentan en la Tabla 14. Todas arrojaron evaluaciones de sabor, aroma, y color aceptable. Además, todos fueron aceptados por los panelistas. Las formulaciones con añadidos de capsulas resultaron evaluados con el mejor sabor, sin embargo, el aroma fue el menos aceptado, aunque los datos estuvieron dentro de los valores aceptados en la escala hedónica. En cuanto al color, no se mostraron diferencias significativas entre las 3 formulaciones evaluadas. En el estudio de aceptación final, las puntuaciones más altas las tuvieron las galletitas enriquecidas en Omega 3.

Tabla 14. Evaluación sensorial de los snacks de okara.

MUESTRA	Sabor	Aroma	Color	Aceptación
G3	5,7	6,2	6,4	6,6
G5	5,7	6	6,8	7
G6	6	5,5	6,2	6,8

Escala hedónica de 9 puntos (1 = ME DISGUSTA EXTREMADAMENTE, 9 = ME GUSTA EXTREMADAMENTE).

Cuando se les pidió que seleccionaran qué galletita preferían el 60% los enriquecidos con cápsulas de Omega-3 y el 40% los elaborados con emulsión. No hubo ninguna preferencia por el snack sin agregado de aceite de pescado. Todos los snacks con aceite de pescado presentaron mayor aceptación respecto a los parámetros de textura, como la dureza, la crujencia y la masticabilidad. El 90% de los encuestados aceptaría el consumo de estas galletitas y los restantes no lo consumirían. Cabe resaltar que la región geográfica donde fueron realizados estos productos puede afectar en el resultado con respecto al sabor, por ser una zona costera el sabor a pescado que puede dar el agregado de Omega-3, no sea tan perceptible ya que los pobladores de la zona se encuentran acostumbrados a este sabor, sin embargo, estos sabores pueden llegar a ser más perceptibles en otras zonas, que no sean costeras. Estas formulaciones si fueron aceptadas debido a los buenos resultados obtenidos.

4.3. RESULTADOS OBTENIDOS DE PRODUCTOS A BASE DE NUEZ DE MACADAMIA

4.3.1. Características fisicoquímicas de los frutos de Nuez de Macadamia

Con la finalidad de caracterizar la materia prima, se realizaron determinaciones físicas y químicas. Ambos lotes de nueces de macadamia fueron evaluados respecto del tamaño de fruto, obteniéndose valores que variaron en el rango de 2,17- 2,22 g/nuez de peso promedio mientras que el diámetro fue de 1,56 cm para el lote 1, y 1,58 cm para el lote 2. Estos datos son ligeramente inferiores a los valores reportados por Monaghan, 2008 para el mismo cultivar.

El análisis proximal de los frutos del presente trabajo se describe en la Tabla 13. De acuerdo con la USDA (2009) los contenidos de humedad, cenizas, proteínas, lípidos y azúcar en las nueces de macadamia varían entre 1,4 – 2,1; 1,1 – 1,2; 7,9 – 8,4; 66,2 – 75,8 y 1,4 – 4,6%, respectivamente.

La humedad, es coincidente con el rango de 1,7-2,6% establecido por Monaghan (2008) para nueces de macadamia, y los datos reportados por USDA (2009). Por otro lado, es ligeramente inferior al 2,10% reportado por Freitas, (2010) y a los valores reportados por Mora *et al.*, (2012) para el estudio de distintos cultivares. Las cenizas establecidas entre aproximadamente el 1 a 1,5% son coincidentes con datos reportados por otros autores (Monaghan, 2008; Freitas, 2010; Maro *et al.*, 2012).

Tabla 15: Composición del análisis proximal de los frutos de Nuez de Macadamia, primer lote

Muestra	%HUMEDAD	%CENIZAS	%PROTEINAS	%GRASAS	%H.C
NUEZ	2,03	1,02	7,1	65,6	24,34

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2)

Tabla 16: Composición del análisis proximal de los frutos de Nuez de Macadamia, segundo lote

Muestra	%HUMEDAD	%CENIZAS	%PROTEINAS	%GRASAS	%H.C
Lote 2	1,21	1,47	8,82	73,52	12,06

Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones (n=2)

Respecto del contenido proteico, los valores obtenidos para ambos lotes se encontraron en el rango de 7 al 9% aproximadamente. Estos datos están de acuerdo con algunos reportes de trabajos previos (Venkatachalam y Sathe 2006; Schlörmann *et al.*, 2015). Sin embargo, Moodley *et al.*, (2007) y Joshi *et al.*, (2015) informaron valores superiores de aproximadamente el 13%. Por otra parte, Maro *et al.*, (2012) informaron contenidos de proteínas de 8 a 20%, aduciendo que dichas diferencias se deben a los distintos cultivares. En general, se puede inferir que la nuez de macadamia es una buena fuente de proteínas, y reportes previos establecen que contiene cantidades adecuadas de todos los aminoácidos esenciales para las necesidades nutricionales de niños y adultos (Freitas, 2010).

Las muestras analizadas en el presente estudio mostraron diferencias significativas en el contenido de lípidos entre lotes. El porcentaje obtenido en el lote 1 está dentro del rango informado por Wall, (2010) y Monaghan, (2008) mientras que el segundo lote arrojó mayor contenido. Este dato es similar al rango de 69-78% observado por Kaijser *et al.*, (2000) para cuatro cultivares de macadamia. Por otro lado, solo un contenido del 59% del aceite fue informado por Maguire *et al.*, (2004).

Las diferencias podrían deberse a la ubicación de origen ya que factores ambientales y hortícolas, como la temperatura, el estrés hídrico y la fertilidad del nitrógeno afectan la acumulación de aceite durante la maduración de la nuez (Stephenson 1986, Stephenson *et al.*, 2003, Stephenson *et al.*, 2000). Rodríguez *et al.*, (2013), reportaron valores de carbohidratos de 19,1 g/100g, ligeramente superiores en comparación con este trabajo (7.95-11.89 g/100g) pero en su determinación incluyeron la fibra dietética. Por otro lado, Wall y Gentry, (2007) informaron que en las nueces de macadamia de la isla de Hawai, el contenido total de carbohidratos analizados por HPLC no excedía 5.6 g/100g, y no contenían cantidades significativas de almidón. Mereles *et al.*, (2017) arrojaron datos de carbohidratos en el rango de 7 a 11%. En el presente estudio, el contenido de carbohidratos difiere considerablemente entre ambos lotes.

4.3.2. Elaboración y formulaciones de las leches.

Las bebidas de nuez fueron obtenidas a través de la molienda de los frutos, tras su maceración. Después del licuado y filtración, se evaluó la homogeneidad de la bebida

realizando un análisis cualitativo y visual de separación de fases en 10 ml de bebida obtenida. Se ha encontrado que las leches de nueces de otras variedades se separan en tres fracciones (flotante, sobrenadante y precipitado) dentro de un breve período de tiempo de aproximadamente 30 minutos. Se considera que este comportamiento se correlaciona con el gran tamaño de los cuerpos de aceite presentes en la nuez (Gallier *et al.*, 2013) y la pobre solubilidad acuosa de la proteína (especialmente la glutelina).

Comúnmente, la homogeneización en presencia de diversos estabilizantes como xantano, carboximetil celulosa sódica, mono glicéridos, éster de sacarosa, caseinato de sodio y goma arábica es una estrategia bien utilizada para producir bebidas estables de leche de nuez. En el presente trabajo, las bebidas mostraban comportamiento homogéneo, visualizándose trazas de residuos en las formulaciones 1:2.

Generalmente, la preparación a pequeña escala incluye cinco pasos: remojo, molienda, cocción, filtrado y pasteurización. Sin embargo, las industrias modernas para la producción a gran escala requieren de métodos más sofisticados y etapas alternativas como el blanqueo y la homogenización (Barco López y Paredes Ocampo, 2004).

En el presente trabajo, se diseñó un protocolo de elaboración artesanal con pasos alternativos para poder escalar a nivel industrial. Bettit y Vargas (2017) reportaron un proceso en bebidas de almendras obteniendo gran rendimiento y aceptación. En el presente estudio, las bebidas formuladas en relación sustrato: agua 1:2 y 1:4, no presentaron diferencias significativas respecto del proceso para la obtención del producto. Sin embargo, el rendimiento obtenido con la relación 1:4 fue mayor con respecto al rendimiento en 1:2, siendo 566ml y 400ml respectivamente, por cada 100 g de materia prima.

4.3.3. Perfil lipídico de las Nueces de Macadamia

El perfil de FA de la fracción lipídica nuez, se presenta en la Tabla 17 donde puede observar que el contenido de ácido oleico es el más alto. Estos resultados son ligeramente superiores con respecto a lo obtenido por Mereles *et al.*; (2017), que reportaron datos de 3 cultivares de nueces de *Macadamia integrifolia* cultivadas en Paraguay. Dentro de los ácidos grasos, se destaca el contenido de ácido palmítico seguido del esteárico. Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) fueron los preponderantes logrando valores cercanos al 70%, destacándose el contenido de oleico y palmitoleico. Si bien estos resultados cuantitativos son superiores a los reportados por

Mereles *et al.*, (2017), tanto las fracciones como el perfil coinciden en su distribución. De este modo, Mereles *et al.*, (2017) reportaron preponderancia de MUFA (49.4-58.7 mg / 100 g), principalmente oleico (34.5-47.0 mg / 100 g) y palmitoleico (7.1-12.8 mg / 100 g)

Tabla 17: Perfil Lipídico del aceite de Nuez de Macadamia

Ácido Graso	Lote 1		Lote 2	
	Media	SD	Media	SD
14:0 MIRISTICO	0,43	0,01	0,3	0,21
15:0 PENTADECANOICO	0	0		0
16:0 PALMITICO	7,91	0,12	8,34	0,37
17:0 HEPTADECANOICO	0,1	0,05	0,12	0,05
18:0 ESTEARICO	4,81	0,23	4,2	0,25
20:0 ARAQUIDICO	3,29	0,11	3,12	0,47
22:0 BEHENICO	1,01	0,06	0,91	0,06
Σ	17,55	0,58	16,99	1,41
16:1 PALMITOLEICO	17,53	0,97	17,82	0,37
17:1 10-HEPTADECENOICO	0	0	0	0,02
18:1n9c+t OLEICO	49,94	1,13	50,08	1,3
20:1 11-EICOSENOICO	1,58	0,21	1,54	0,24
22:1n9 ERUCICO	0	0	0	0
Σ	69,05	2,31	69,44	1,93
18:2n6c LINOLEICO	5,93	0,35	6,64	0,2
18:3n6 g-LINOLENICO	0,23	0	0,28	0,04
18:3n3 LINOLENICO	2,68	0	2,39	0,17
20:2 11,14-EICOSADIENOICO	0	0	0	0
20:3n6 EICOSATRIENOICO	0,75	0,02	0,51	0,01
20:4n6 ARAQUIDONICO	3,81	0,03	3,75	0,13
20:5n3 EPA	0	0	0	0
22:6n3 DHA	0	0	0	0

Σ	13,4	0,4	13,57	0,55
Total	100		100	

4.3.4. Caracterización fisicoquímica de las Bebidas de Nuez de Macadamia

Las Tablas 18 y 19 resumen los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en las distintas formulaciones desarrolladas. El mayor contenido porcentual de cada bebida corresponde a la humedad, acorde al contenido de agua incorporada durante la elaboración. Los reportes realizados con bebidas de nuez de macadamia, son escasos, sin embargo, existen algunas investigaciones realizadas sobre bebidas de diferentes variedades de nuez y de almendras. Dentro de las nueces más estudiadas, se encuentra la nuez de tigre (*Kunun aya*) y las almendras. Estudios llevados a cabo por Ukwuru y Ogbodo, (2011) utilizando diferentes tratamientos térmicos en la elaboración informaron valores de humedad en el rango comprendido entre 77,0 y 80,7%. Por otro lado, Okyere y Odamtten, (2014) reportaron valores de humedad con mayor dispersión, probablemente debido a las diferentes variedades de nueces estudiadas. Udeozor, (2011) informó un 65% de humedad para bebidas de nuez de tigre a partir de un protocolo de elaboración similar. Por otro lado, Bernat *et al.*, (2015) informaron alrededor del 93% de humedad en bebidas de almendras y 94% para bebidas de avellanas, en el trabajo se obtuvieron rangos de humedad del 75 – 95% que concuerda con lo reportado en bibliografía.

Los valores de densidad se encontraron en el rango de 0,98-1,04 g/ml. Estos datos son concordantes con valores de densidad de aproximadamente 1,03 g/ml encontrados en estudios realizados sobre bebidas a base de almendras, (Rivas *et al.*, 2016).

El pH afecta tanto el sabor, el color y la vida útil de las bebidas alimentarias (Delgado, 2017). Los datos obtenidos se encuentran en el rango de 5,60-6,06 concordante con el rango reportado por Ukwuru y Ogbodo (2011) para bebidas de nuez de tigre. Udeozor (2011), informó un valor de pH de 6,7 y Okyere y Odamtten, (2014) reportaron un rango de 6,21 a 7,16 para las bebidas obtenidas de 4 variedades diferentes de nueces. Las leches de almendras estudiadas también mostraron pH disímiles mientras que Vargas, (2017) reporto un pH de 6,37, Rivas *et al.*, (2016) informaron valores entre 6,40-7,24.

Por otro lado, valores de pH más ácidos (entre 4,25-5,95) han sido encontrados e informados por informaron y Kayode *et al.*, (2017). Esto sugiere que tanto la materia prima de partida como las diferentes variedades afectan los valores de pH.

La acidez de todas las formulaciones analizadas mostró valores dentro del rango de 0,014-0,02% de ácido oleico. Estos datos difieren notablemente con los valores reportados por Kayode *et al.*, (2017) que obtuvieron datos de acidez entre 2,95-4,17 en bebidas de nuez de tigre. En el caso de bebidas de almendras Rivas *et al.*, (2016), obtuvieron valores de acidez entre 0,026-0,045%.

Revisiones sobre estas bebidas, han concluido que el aporte de proteína es inferior a la leche bovina (Chalupa & Bohrer, 2018). Por lo tanto, el contenido proteico, es importante para definir el aporte nutricional, de la bebida en desarrollo. El porcentaje de proteínas arrojó valores dentro del rango de 0,78- 3,5 g% para las distintas formulaciones. Los datos obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado por García-Saavedra, (2017) que informo valores entre 0,5-1,45, para la bebida de almendras. Además, Chalupa & Bohrer, (2018) revisaron varias bebidas alternativas, informando un promedio de 0,76 g% de proteínas en bebidas de almendras. Por otro lado, los datos difieren con los valores reportados para leches de almendras por otros autores siendo 0,4 g% y 0,005% los datos encontrados por Bettit *et al.*, (2017) y Rivas *et al.*, (2016), respectivamente. Se observa una mayor cantidad de proteínas en las bebidas obtenidas en el segundo lote de bebidas.

Tabla 18: Composición físico química de las bebidas de Nuez de Macadamia, Primer Lote

Código	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	pH	Acidez (%)	Proteínas (%)
1:2, 2h					
L1N1a	89,89	0,98	5,6	0,017	1,12
L1N1b	90,6	1,02	5,8	0,017	1,12
L1N1c	90	1,03	5,6	0,014	1,12

Blanco	89,9	1,01	5,6	0,017	1,12
1:2, 3h					
L2N1a	87,82	1,00	6,06	0,011	1,12
L2N1b	89,36	0,99	5,70	0,017	1,12
L2N1c	77,69	0,99	6,00	0,017	0,78
Blanco	87,66	0,99	6,00	0,011	0,90
1:4, 2h					
L1N1a	90,45	1,01	5,9	0,02	1,12
L1N1b	88,56	0,98	6,0	0,02	0,90
L1N1c	90,00	1,01	5,7	0,016	0,78
Blanco	94,16	1,00	5,5	0,015	1,12
1:4, 3h					
L2N1a	88,00	1,01	5,8	0,016	1,12
L2N1b	92,7	1,04	6,05	0,018	1,12
L2N1c	88,48	1,01	6,0	0,017	1,12
Blanco	89,8	1,01	5,9	0,015	0,78

Tabla 19: Composición físico química de las bebidas de Nuez de Macadamia, Segundo Lote

Código	Humedad (%)	Densidad (g/ml)	pH	Acidez (%)	Proteínas (%)
1:2, 2h					
L1N2a	93,34	0,98	6,21	0,08	2,38
L1N2b	94,32	0,97	6,46	0,03	2,38
L1N2c	92,24	0,97	6,51	0,07	2,15

Blanco	92	0,98	6,31	0,05	2,38
<hr/>					
1:2, 3h					
<hr/>					
L2N2a	92,22	0,99	6,21	0,07	1,85
L2N2b	91,68	0,97	6,5	0,06	3,18
L2N2c	91,79	0,98	6,6	0,05	2,38
Blanco	91,89	0,97	6,46	0,01	2,65
<hr/>					
1:4, 2h					
<hr/>					
L1N2a	92,26	0,96	6,2	0,07	1,85
L1N2b	97,89	0,97	5,45	0,06	0,90
L1N2c	89,45	0,97	6,21	0,09	5,3
Blanco	93,32	0,97	6,21	0,08	2,65
<hr/>					
1:4, 3h					
<hr/>					
L2N2a	87,91	0,96	6,24	0,065	2,12
L2N2b	98,43	0,97	6,25	0,09	3,18
L2N2c	88,11	0,95	6,41	0,1	2,65
Blanco	87,18	0,98	6,43	0,08	2,91
<hr/>					

Algunos autores han usado aditivos como carboximetilcelulosa, coagulantes (calcio citrato), leche en polvo y gelatina para mejorar la textura y reducir la sinéresis en el producto final (Cheng *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de ingredientes animales en este producto excluye el segmento de consumidores vegetarianos / veganos en el mercado occidental (Mäkinena *et al.*, 2015). En el presente trabajo se ha utilizado la carboximetilcelulosa que excluye de ingredientes de origen animal a las formulaciones sin Omega-3.

4.3.5. Formulación y elaboración de las galletitas. Valor fisicoquímico y calórico

Las formulaciones de este estudio muestran variaciones en los contenidos de los ingredientes cuya finalidad fue evaluar si dichas proporciones influyen en el procesamiento, la composición fisicoquímica y el sabor. Respecto del procesamiento, cuando la masa estaba constituida por una relación de subproductos de nuez de más del 50%, la elaboración de las galletitas fue más difícil por problemas de ligadura, y

quebraduras post cocción. Sin embargo, cuando el contenido de nuez y avena estaba en la misma proporción, los productos fueron fácilmente moldeables. El mayor contenido de avena producía una galletita desgranada, que se molía fácilmente.

Por lo tanto, todos los formulas respetaron iguales proporciones de avena y nuez y se modificaron sometiendo a enriquecimiento en Omega-3 en algunos casos y adicionando saborizantes en otros. Finalmente se analizaron en términos de sus propiedades químicas, calóricas y sensoriales.

Los datos sobre la composición química se presentan en la Tabla 17. Los valores obtenidos están dentro de los rangos esperados para este tipo de productos. El contenido de humedad está de acuerdo con el contenido de agua agregado en cada formulación. El contenido de cenizas está acorde con las formulaciones realizadas respecto de las proporciones de materia prima.

El contenido de proteínas se encuentra en el rango de 7,73 a 9,02g%. Estos valores son ligeramente superiores a datos reportados en galletas de harina de trigo con sustitución parcial de harina de algarroba y avena para proporciones similares a la formulación G5 por Macías *et al.*, (2013). Además, investigaciones realizadas sobre galletas con linaza, y proporciones de avena superiores a las utilizadas en el presente trabajo, mostraron similares datos de proteínas (Ortega *et al.*, 2016). Del mismo modo, Gutkoski *et al.*, (2007) reportaron valores de proteína cercanos al 10% en barras de cereales elaboradas con proporciones de avena: arroz 5:1, en forma de copos, harina y salvado. Si bien la avena presenta buen contenido proteico, la nuez de macadamia de partida mostró valores mayores al 8% en ambos lotes, logrando un alimento con contenido semejante. La avena fue seleccionada para la elaboración de snacks precisamente por presentar un contenido destacado de proteínas, lípidos (ácidos grasos insaturados), vitaminas, antioxidantes y compuestos fenólicos (Peterson 2001; Lambo *et al.*, 2005).

El contenido de grasa en las galletas desarrolladas fue ligeramente alto, y es consecuencia de los ingredientes utilizados. Sin embargo, la grasa proveniente de la nuez de macadamia es rica en ácidos grasos esenciales indispensables como fue anteriormente discutido para el mantenimiento de una buena la salud. Por otro lado, cabe destacar que la cantidad de aceite de pescado adicionada no modifica el contenido porcentual lipídico mientras se adiciona cantidades considerables de EPA y DHA. El

ácido graso predominante fue DHA (C22: 6), seguido de ácido oleico (C18: 1), ácido palmítico (C16: 0) y EPA (C20: 5). Las recomendaciones sobre la ingesta diaria de ácidos grasos Omega-3 fluctúan alrededor de 500 mg de EPA + DHA en forma de alimentos o suplementos (Simopoulos, 2002; Kris-Etherton, Grieger & Etherton, 2009).

El EPA es el precursor de las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, y el DHA es un componente de la membrana de fosfolípidos del cerebro y las células de la retina, por lo tanto, ambos ácidos grasos son esenciales para la salud humana, mostrando acciones sobresalientes en la prevención de enfermedades cardiovasculares. y el desarrollo de la cognición respectivamente (Fournier *et al.*, 2007; Zhong, Madhujith, Mahfouz y Shahidi, 2007). Sus beneficios para la salud humana han motivado, en las últimas décadas, el desarrollo de productos con su incorporación como aditivos, emulsiones o cápsulas (Kolanowski y Laufenberg, 2006; Ye, Cui, Taneja, Zhu y Singh, 2009; Bermúdez-Aguirre y Barbosa -Canovas, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede esperar que las galletas con emulsión y encapsulados puedan proporcionar 126 y 51 mg de EPA y DHA, que es aproximadamente el 25% y el 10% respectivamente de la ingesta diaria mínima recomendada de omega-3 (Simopoulos, 2002; Kris-Etherton, *et al.*, 2009).

Los productos a base de granos son tradicionalmente más altos en carbohidratos, por lo que no se consumen o se consumen en cantidades más pequeñas en sectores de la población que siguen dietas bajas en estos macronutrientes. Por lo tanto, se crea una demanda para la producción de snacks bajas en carbohidratos para este sector de consumidores (Singh & Mohamed, 2019). En este trabajo puede observarse que el contenido de carbohidratos arroja valor del 30% en todas las formulaciones, correspondientes a la materia prima de partida, ya que no se han adicionado azúcares. Además, estos datos son notablemente inferiores a datos reportados por Gutkoski *et al.*, (2007) y Ortega *et al.*, (2016) en formulaciones de barras de cereales con altos contenidos de avena.

Diferentes estudios sugieren que el consumo de avena tiene efectos que promueven la salud, ya que es un cereal que contiene fibra soluble e insoluble, específicamente beta-glucanos, arabinoxilanos y celulosa. Mientras que la fibra soluble (inulina, pectina; gomas y fructooligosacáridos) capta agua y permite la formación de geles lo acelerando el tránsito intestinal (Lambo *et al.*, 2005) la fibra insoluble aumenta el volumen del bolo fecal y disminuye el tiempo de tránsito intestinal, contribuyendo a

prevenir el estreñimiento (Brown & Rosner, 1999). En el presente trabajo, el contenido de fibra osciló el 10% en todas las formulaciones.

Los resultados obtenidos para el valor calórico en cada muestra también se observan en la Tabla 20. Se ha informado en la literatura un amplio rango de variación para los niveles de energía en barras de cereales (de 72.8 a 321.70 kcal.100 g⁻¹) (Gutkoski *et al.*, 2007; Dutcosky *et al.*, 2006). Además, Costa-García, Lobato, ha informado un nivel de energía de 385.95 kcal.100 g⁻¹ de barras con alto contenido de arroz blanco; Benassi y Soares Junior (2012). El nivel de energía de la merienda desarrollada en el presente trabajo está de acuerdo con los niveles reportados en la literatura. Por otro lado, los ingredientes utilizados en la formulación permitieron obtener productos con bajo valor calórico entre 77 y 82 kcalorías, para 20 g de porción

Tabla 20: Valor nutricional de las galletas de macadamia

MUESTRA	G1	G2	G3	G4	G5
HUMEDAD %	21,92	25,33	23,48	25,06	20,19
CENIZAS %	1,69	1,81	1,46	1,53	1,42
PROTEINAS %	7,73	9,02	8,36	8,14	8,37
GRASA %	29,03	28,97	30,3	29,41	31,23
HdC%	29,77	22,13	26,75	23,99	30,73
FIBRAS %	9,86	12,74	9,65	11,86	8,06
KCAL %	266,13	240,47	261,63	246,19	281,32
KCAL 20g	82,25	77,06	82,63	78,65	82,25

4.3.6. Análisis sensorial de las bebidas de Nuez de Macadamia

La aceptación de los consumidores de las bebidas y galletitas de nuez de macadamia, fueron evaluadas por un grupo de 22 catadores que completaron un cuestionario de 4 parámetros basado en un cuestionario de 9 niveles escala hedónica para cada pregunta y la predisposición de compra, la calidad sensorial se evaluó calificando su calidad general y predisposición de compra.

De acuerdo con los puntajes sensoriales totales, todas las muestras exhibieron características sensoriales aceptables. En cuanto al sabor y color, no hubo diferencias

estadísticas entre las formulaciones de bebidas. Solo algunos panelistas percibieron el olor a chocolates en la formula adicionada. No se percibió olor a pescado.

Los enriquecidos con emulsión fueron los más difíciles de calificar en términos de sabor, algunos panelistas indicaron que este bocadillo era dulce, otros como salado y también se mencionó un sabor indefinido. La merienda enriquecida con cápsulas fue la única que arrojó un sabor a pescado, y en algunos casos sin definir. El olor era igualmente calificado. En este caso, el refrigerio sin enriquecer se describió en algunos casos como con olor a avena. La merienda enriquecida con cápsulas fue la única calificada con olor a pescado, y en algunos casos se agregó la calificación con olor a frito.

Al analizar el efecto de los refrigerios de enriquecimiento con Omega-3 no se detectaron diferencias de olor, color ni textura durante el procesamiento. Los resultados descritos se reflejan en las respuestas obtenidas en la pregunta sobre la posible compra de los productos probados. En este criterio, se registraron los mejores puntajes para “no compraría” 2 "probablemente compraría" 7 y respuestas "ciertamente compraría” 14 para las bebidas y 0, 7 16 para las galletas respectivamente.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSION

En el presente estudio se desarrollaron alimentos a base de soja y nuez de macadamia enriquecidos con Omega-3 y probióticos. Se logró desarrollar formulaciones para los productos elaborados, tanto para las bebidas vegetales como para las galletitas.

Las bebidas a base de soja, mostraron un contenido de proteína aceptable, que corresponde a los valores deseados para proponer este alimento como nutricionalmente

recomendado. Sin embargo, en el primer lote de soja, el bajo pH logrado, probablemente debido a la variedad, época de cosecha y el uso de antioxidante, no permitió desarrollar una formulación aceptable para los consumidores. En cuanto a los protocolos de elaboración, la bebida desarrollada en relación 1:2 tuvo que ser descartada debido a que no se obtuvo una bebida uniforme. La bebida de relación 1:4 arrojó mejores resultados sugiriendo que la cantidad de agua de remojo influye en el correcto desarrollo de los protocolos. En cuanto a las galletitas de okara, tuvieron una aceptación considerable destacándose los de agregado de Omega-3 en forma de cápsula. La manipulación durante la elaboración fue simple cuando el okara se mezcló en partes iguales con otra materia prima. La composición nutricional lograda muestra que aporta cantidades de proteína aceptables para este tipo de productos. En el segundo lote de bebidas de soja se logró una mejor formulación, con resultados más favorables, debido a que el pH y la acidez de las bebidas se encontraron dentro del rango establecido por las bibliografías consultadas. Con respecto a los probióticos, encapsulados se logró detectar lactobacilos en las bebidas de soja en el análisis con Petri film para detección de bacterias ácido lácticas, en una cantidad adecuada, lo cual concluye que la viabilidad de las bacterias no se pierde en las bebidas de soja.

Las bebidas a base de Nuez de macadamia ha sido logrado. Su composición fisicoquímica muestra que el contenido de proteínas es similar al de bebidas equivalentes, como almendras, esto debido a que no existen trabajos anteriores que hayan desarrollado bebidas de nuez de macadamia que hayan sido reportados. Los datos informados por el panel sensorial, muestran un 98% de aceptación del producto. Con este estudio se ha logrado desarrollar una formulación de bebidas vegetales a base de nuez de macadamia enriquecida con omega-3, siendo la elegida aquella que tiene mayor cantidad de agua en previo remojo de 3h (1:4). Con el residuo logrado en el filtrado de la elaboración de bebidas, se desarrolló una harina de nuez (okara de nuez de macadamia), con la cual se elaboraron snacks que fueron aceptados por el panel de personas que realizó el análisis sensorial, estudios anteriores demostraron que también es un subproducto de interés proteico e industrial.

En general, la calidad nutricional y la palatabilidad de ambos productos validaron su uso como alimento para consumo humano. Teniendo los costos, el uso integral de la nuez y avena en las galletitas, puede contribuir a reducir el precio y llegar a un grupo más amplio de consumidores. En cuanto al enriquecimiento en Omega-3, a

pesar de que las conclusiones obtenidas podrían limitarse a la población estudiada y considerando que la sensibilidad sensorial está influenciada por el origen geográfico, fue posible innovar la receta de un producto tradicional a través de la incorporación de un subproducto subutilizado, al mismo tiempo se cumplió la circular moderna de requisitos ambientales y de economía (desperdicio cero) mientras se desarrolló un producto que se ajusta a los desafíos actuales de seguridad y nutrición alimentaria, además de presentar una buena calidad sensorial.

De esta manera, los resultados sugieren trabajar en la optimización de la producción de estos productos para un desarrollo viable y así lograr un producto nutricionalmente valorable y aceptable por el consumidor, utilizando productos regionales y subproductos de distintos sectores industriales.

5.2. RECOMENDACIONES

Para poder lograr concluir que los productos contribuyen en la salud de las personas, es necesario realizar un ensayo in vitro simulando una digestión. Con la cual se podrá definir si el producto puede liberar sus componentes nutricionales y no desnaturalizarse en el proceso de digestión.

También se recomienda realizar el perfil lipídico de ambos productos, tanto en las bebidas como en las galletitas para asegurar que el EPA y DHA no se han desnaturalizado, el cual ya no se pudo contemplar en el presente trabajo.

Se recomienda hacer los análisis sensoriales en ambos lotes de soja, que, al ser realizado, los datos serán utilizados para publicación científica.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC, Official Methods Of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. AOAC INTERNATIONAL 16th Ed.
- AOCS, American Oil Chemists' Society. 2009. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, AOCS Press, Champaign, US.
- Arai, S., Osawa, T., & Ohigashi, H. (2001). A mainstay of functional food science in

- Japan – history, present status, and future outlook. *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol. 65, 1–3.
- Armada, R. A. J. (2009). Caracterización de frutos de tres variedades de *Macadamia* (*Macadamia integrifolia*) en la zona de Caraguatay, departamento cordillera, Paraguay. *Investigación Agraria*, Vol. 11(1), 14–17.
- Arranz, S., Perez, J.J., & Saura, C.F. (2008). Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *Eur Food Res Technol*. Vol. 227, 425–431.
- Banel, D. K., & Hu, F. B. (2009). Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors : a meta-analysis and systematic review, 56–63.
- Barros, E. A., Cosa, V.E., Bressan, D. F., Dos Santos, C. R. B., Lopes, R. V. & Broetto, F. (2018). Evaluation of gamma irradiation effect on physico-chemical properties of a mixed beverage based in soy milk and grape juice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. Vol. 316, 29–36
- Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios Generales de los Alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Bernat, N., Chafer, M., Chiralt, A., & Gonzalez, M.C. (2014). Vegetable milks and their fermented derivative products. *International Journal of Food Studies*. Vol. 3, 93–124.
- Salvá, R.B., & Fetta, V. X. (2017). Desarrollo de una bebida a partir de almendras dulce (*Prunus dulcis*). *Rev. Investig. Univ. Le Cordon Bleu* 4(2), 05-20
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol*. Vol. 37, 911-917.
- Burdock, G. A. & Carabin, I. G. (2008). Breaking down the barriers to functional foods, nutraceuticals and claims. *Food Science and Technology*. Vol. 81, 83-108
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* Vol. 104, 467–493.
- Castillo, S.L., Alvarado, J.M., Baez, J.G., Macías, E., Ramírez-Baca, P., & Candelas-

- Cadillo M.G. (2017). Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 2, 531-536
- CODEX. 2017. Norma para aceites vegetales especificados. file:///C:/Users/usuario/Downloads/CXS_210s_2017.pdf CODEX STAN 210-1999
- Comarella, C. G., Sautter, C. K., Ebert, L.C. & Penna, N.G. (2012). Polifenóis totais e avaliação sensorial de suco de uvas Isabel tratadas com ultrassom. *J. Food Technol.* Vol. 4, 69-73.
- Chen, Y., Lu, Y., Yu, A., Kong, X., & Hua, Y. (2014). Stable Mixed Beverage is Produced from Walnut Milk and Raw Soymilk by Homogenization with Subsequent Heating. *Food Science and Technology Research.* Vol. 20 (3), 583-591.
- De, A. P., Oluchi, L., & Comarella, C. (2012). Tigernut-Soy Milk Drink : Preparation , Proximate Composition and Sensory Qualities, *I(November)*, 18–26.
- De Toledo, P. L. B., & Massaharu, L. M. (2014). Cultivo da macadâmia no brasil. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal.* Vol. 36 (1), 39–45.
- Estrada, J. D., Boeneke, C., Bechtel, P., & Sathivel, S. (2011). Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil 1. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5760–5769.
- FAO/WHO . 2011. Dietary protein quality evaluation in human nutrition Report of an FAO Expert Consultation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 92, pp 66.
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals : what is beyond fibre ?. *Nutrition Research Reviews.* Vol. 23, 65–134.
- Ferguson, L.R., Smith, B.G. & James, B.J. 2010. Combining nutrition, food science and engineering in developing solutions to inflammatory bowel diseases e omega-3 polyunsaturated fatty acids as an example. *Food & Function*, 1(1), 60-72.
- Figuroa, J. D., Cordero, K., Ilan, M. S., & De Leon, M. (2013). Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve the Neurolipidome and Restore the DHA Status while Promoting Functional Recovery after Experimental Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma.* Vol. 30 (10), 853-868.

- Guzmán-Tituaña, E.D. 2018. Obtención de una bebida proteica a base de Soya (*Glycine max*) y Naranjilla (*Solanum quitoense*), 94 pp
- Gallier, S., Tate, H., & Singh, H. (2013). In vitro gastric and intestinal digestion of a walnut oil body dispersion. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 61, 410-417.
- Harris, Linda J. (University of Nebraska-Lincoln, U. (2013). *Improving the safety and quality of nuts.* (Woodhead Publishing Limited, Ed.). Cambridge.
- Hoogenkamp, H. (2008). Proteínas de soja y fórmulas para productos cárnicos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
- Homayoonfal, M., Khodaiyan, F., & Mousavi, S. M. (2014). Modeling and optimizing of physicochemical features of walnut-oil beverage emulsions by implementation of response surface methodology: Effect of preparation conditions on emulsion stability. *FOOD CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.117>
- Ilbay Yupa, Georgina Claribel. (2014). *Efecto de diferentes grasas con Omega 3 en la elaboración de una bebida hidratante a partir del suero de leche.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Ecuador. Facultad de Ciencias Pecuarias. Carrera de Ingeniería Zootécnica. Pp. 168.
- Jiménez, M. (2001). Estudio de Pre factibilidad del Cultivo de Macadamia para Exportación; Tesis. Pp:164. 10-20
- Kruger, C. L., & Mann, S. W. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 41 (6), 793–805.
- Kurosu, M. (2011). Biologically Active Molecules from Soybeans. *Soybean and Health*. Soybean and Health, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-535-8,
- Liu, S., Liu, F., Xue, Y., & Gao, Y. (2016). Evaluation on oxidative stability of walnut beverage emulsions. *FOOD CHEMISTRY*, 203, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.037>
- Maguire, L., O’Sullivan, S., Galvin, K., O’Connor, T. y O’Brien. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnut, almonds, peanuts, hazelnuts and macadamia nut. *International Journal of Food Science and Nutrition*. Vol. 55(3), 171-178.

- Mereles, L., & Ferro, E. (2015). Características físicas, composición centesimal y contenido de minerales en frutos de *Macadamia integrifolia* Maiden & Betche, cosechados en el departamento de Cordillera, Paraguay. *ROJASIANA* Vol. 14(1), 55–68.
- Missão, M. R. (2006). SOYBEAN: ORIGIN, CLASSIFICATION, USE AND AN INCLUDING VISION OF MARKET. *Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais*. Vol. 3 (1), 7–15.
- Mundo, M. N., & Nogueira N. R. (2010). O MERCADO DA NOZ MACADÂMIA E A AGRICULTURA FAMILIAR. *ABEPRO* Vol. 30, 1-10.
- Normén, L.; Dutta, P.; Lia, A. & Andersson, H. (2007). Soy Sterol Esters and β -Sitostanol Ester as Inhibitors of Cholesterol Absorption in Human Small Bowel, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71 (4), 908-913, ISSN 0002-9165
- O'brien, R.D. 2004. *Fats and oils – formulating and processing for applications* CRC Press, New York
- O'Toole, D. K. (2016). Soybean, Soymilk, Tofu, and Okara. *Reference Module in Food Sciences*. Vol. 3, 185-195.
- Park, J., Choi, I., & Kim, Y. (2015). LWT - Food Science and Technology Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 660–666.
- Peña, M. M., Martín-belloso, O., & Welti-chanes, J. (2018). Ultrasonics - Sonochemistry High-power ultrasound as pre-treatment in different stages of soymilk manufacturing process to increase the isoflavone content. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 49(June), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.044>
- Pio, R., Rodrigues, F. A., Aparecida, L., Maro, C., & Costa, F. C. (2011). Análise de frutos e nozes de cultivares de noqueira-macadâmia Analysis of fruits and nuts of macadamia walnut cultivars, 2080–2083.
- Radočaj, O., & Dimić, E. (2013). Valorization of Wet Okara, a Value-Added Functional Ingredient, in a Coconut-Based Baked Snack. *CEREAL CHEMISTRY*, Vol. 90 (3), 256–262.

- Ribeiro, A.P.B., Grimaldia, R. Gioiellib, L.A. & Gonçalves, L.A.G. 2009. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. *Food Research International*. Volume 42, Issue 3, 401-410
- Rodríguez-roque, M. J., Rojas-graü, M. A., Elez-martínez, P., & Martín-belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds , isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.115>
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr*. Vol. 71,1682S-7S.
- Russ Stephenson world'The. (2005). Macadamia: Domestication and Commercialisation Russ. *HORTICULTURAL SCIENCE FOCUS Macadamia:*, 45(2), 11–15.
- Salas, J. M. J., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* Vol. 4 (35), 1-14.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2018). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Chocolate : Modern Science Investigates an Ancient Medicine* Vol. 1, 273–285.
- Schiffrin, E., Rochat, F., Link, A. H. (1995). Immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. Vol. 78, 491-7.
- Seok, T., Prasad, K. N., & Ismail, A. (2010). Antioxidant capacity , phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, 123(3), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.074>
- Silveira, R. M. B., Megías, S. M. & Baena, B. M. (2003). Alimentos Funcionales y Nutrición Óptima. ¿cerca o lejos?. *Rev Esp Salud Pública*. Vol. 77 (3), 317–331.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6 / omega-3 essential fatty acids, 56, 365–379.
- Stephenson, Russ. (2005). Macadamia: Domestication and Commercialisation. *Horticultural Science Focus*. Vol. 45 (2), 11-15.

- Stuckler, D. & Basu, S. (2011). Evaluating the health burden of chronic diseases. In Struckler and K. Siegel (Eds.) *Sick societies: Responding to the global challenge of chronic disease*. New York: Oxford University press.
- Tananuwong, K., & Jitngarmkusol, S. (2011). Macadamia Flours : Nutritious Ingredients for Baked Goods. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380886-8.10021-2>
- Tituaña, G. E. D. (2018). Obtención de una bebida proteica a base de Soya (*Glycine max*) y Naranjilla (*Solanum quitoense*), 94 pp.
- Phatanayindee, S., Borompichaichartkul, C., Srzednicki, G., Craske, J., & Wootton, M. (2012). Changes of Chemical and Physical Quality Attributes of Macadamia Nuts during Hybrid Drying and Processing. *Drying Technology*. Vol. 30, 1870–1880.
- Tovar, A.R., Murguía, F., Cruz, C., Hernandez, P. R., Aguilar, S. C. A.; Pedraza, C. J., Correa, R. R. & Torres, N.A. (2002) Soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome. *The Journal of Nutrition*. Vol. 132 (9), 2562–2569.
- Udeozor Oluchi, L. (2012). Tigernut-Soy Milk Drink : Preparation , Proximate Composition and Sensory Qualities, *International Journal of Food and Nutrition Science* Vol. 1 (4), 18–26.
- Vaca Uribe, Carolina. (2011). Comparación de la de la mezcla de leche de soya (*Glycine soja* sielbold) y vaca en la vida útil y evaluación sensorial. Tesis 121pp.
- Vanegas, P. L. S., Restrepo, M. D. A. & López, V. J. H. (2009). Características de las Bebidas con Proteína de Soya. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. Vol. 62 (2), 5165-5175

Paginas

<https://www.australianmacadamias.org/industry>

<http://www.fao.org/paraguay/es/>