



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE NANOCRISTALES DE ALMIDÓN DE TRIGO A PARTIR DE
MATRICES CON DIFERENTE COMPLEJIDAD**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARA PATRICIA CARRANZA VILLANUEVA



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Alberto Tecante Coronel

VOCAL: Bertha Julieta Sandoval Guillén

SECRETARIO: Verónica Hernández Briones

1er. SUPLENTE: Hiram Fernando Ramírez Cahero

2° SUPLENTE: José Luis Godínez Rodríguez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA.
LABORATORIO 313**

ASESOR DEL TEMA:

Alberto Tecante Coronel

SUSTENTANTE:

Mara Patricia Carranza Villanueva

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la formación tan integral, reconocida y eficiente que me ha proporcionado durante 9 años de mi vida, desde la preparatoria hasta el término de la carrera y que, con seguridad, me acompañará por el resto de ella.

A la Facultad de Química que me enseñó responsabilidad, perseverancia, empeño y que abrió un mundo de conocimientos en mi mente, además de brindarme una gran satisfacción a la que, lamentablemente, no todos tienen acceso: terminar una carrera en Química de Alimentos.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel por el aporte de sus conocimientos para facilitar la investigación y por el apoyo en el paso más importante de mi carrera universitaria. Gracias por la ayuda constante a mis cuestionamientos y problemas de tiempo, por darme la libertad de trabajar a mi ritmo y generar en mi un alto grado de responsabilidad.

A la I.A. Mariana Ramírez Gilly por su apoyo con las pruebas de micro-calorimetría de barrido diferencial.

A la Dra. Anne Matignon por proporcionar datos de micro-calorimetría de barrido diferencial y difracción de rayos X de algunas muestras de pan de muerto.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
GLOSARIO	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 ALMIDÓN	14
2.2. EL GRANÚLO DE ALMIDÓN	16
2.3. NANOCRISTALES DE ALMIDÓN (NCA)	20
2.4. PREPARACIÓN DE NANOCRISTALES DE ALMIDÓN	22
3. METODOLOGÍA	25
3.1. Obtención de nanocristales de almidón de almidón de trigo crudo (ATC)	25
3.2. Extracción de lípidos de la harina de trigo cruda (HTC)	26
3.3. Extracción de nanocristales de almidón de harina de trigo desengrasada (HTD)	26
3.4. Obtención, secado y desengrasado de miga de pan de muerto (MPM)	27
3.5. Obtención de nanocristales de almidón de miga de pan de muerto desengrasada (MPSD)	28
3.6. Caracterización de los nanocristales de almidón de ATC, HTD y MPSD	28
3.6.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	28
3.6.2. Difracción de rayos X (DRX)	28
3.6.3. Microcalorimetría de barrido diferencial (mDSC)	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Almidón de trigo crudo (ATC)	30
4.1.1. mDSC	30
4.1.2. Difracción de rayos X	32
4.1.3. TEM	32
4.2. Nanocristales de ATC	33
4.2.1. TEM	33
4.2.2 mDSC	34

4.3. Harina de trigo desengrasada (HTD)	34
4.3.1. mDSC	34
4.3.2. Difracción de rayos X y TEM de HTD	34
4.4. Nanocristales de almidón de la harina de trigo desengrasada (HTD)	35
4.4.1. mDSC	35
4.4.2. Difracción de rayos X	37
4.4.3. TEM	38
4.5. Nanocristales de almidón de la HTD obtenidos a 40 °C	39
4.5.1. TEM	39
4.5.2. Difracción de rayos X	40
4.5.3. mDSC	40
4.6 Miga de pan de muerto (MPM)	41
4.6.1. mDSC	41
4.7. Miga de pan de muerto desengradada (MPSD)	42
4.7.1. mDSC	42
4.7.2. Difracción de rayos X	44
4.8. Nanocristales de almidón de la MPSD a 30 °C	45
4.9. Nanocristales de almidón de la MPSD a 40 °C	46
4.9.1. TEM	46
4.9.2. mDSC	46
5. CONCLUSIONES	50
6. RECOMENDACIONES	51
7. REFERENCIAS	52

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla/ Figura	Título
Tabla 1	Propiedades obtenidas del termograma de ATC.
Tabla 2	Temperaturas de transición de ATC reportadas por otros autores.
Tabla 3	Propiedades del termograma de los NCA obtenidos de la HTD a 30 °C.
Tabla 4.	Termograma de fusión de NCA obtenidos de MPSD.
Figura 1	Estructura del grano de trigo (CANIMOLT, 2005)
Figura 2	(a) Estructura de la amilosa, (b) estructura de la amilopectina (Martínez, 2014).
Figura 3	Modelo de clúster de la amilopectina (Gallant <i>et al.</i> , 1997).
Figura 4	Estructura de escalas múltiples del gránulo de almidón (Le Corre <i>et al.</i> , 2010).
Figura 5	Configuración del empaquetamiento de dobles hélices para los tipos cristalinos A y B del almidón (Le Corre <i>et al.</i> , 2010).
Figura 6	Primeras observaciones en TEM de nanocristales de almidón de maíz: vista longitudinal y planar (Le Corre <i>et al.</i> , 2010).
Figura 7	Gránulos de almidón de trigo y sus nanocristales obtenidos por hidrólisis ácida.
Figura 8	Reacción de neutralización del residuo de la primera centrifugación en la obtención de NCA.
Figura 9	Termogramas de gelatinización y fusión de complejos amilosa-lípidos del ATC.
Figura 10	Difractograma del ATC.
Figura 11	Imagen 40X de TEM de ATC. La barra de referencia es de 30 μm .

Figura 12	Imágenes 10X de TEM de NCA del ATC. La barra de referencia es de 100 μm .
Figura 13	Termograma de harina de trigo.
Figura 14	Termogramas de fusión de NCA obtenidos de la HTD a 30 $^{\circ}\text{C}$.
Figura 15	Difractograma de los NCA obtenidos de la HTD a 30 $^{\circ}\text{C}$.
Figura 16	Imagen 10X de TEM de los NCA de HTD a 30 $^{\circ}\text{C}$. La barra de referencia es de 100 μm .
Figura 17	Imágenes de TEM de NCA obtenidos de HTD a 40 $^{\circ}\text{C}$ con diferentes ampliaciones. Objetivo 4X con barra de escala de 20 μm , objetivo 10X con barra de escala de 100 μm y objetivo 40X con barra de escala de 100 μm .
Figura 18	Difractograma de los NCA obtenidos de la HTD a 40 $^{\circ}\text{C}$.
Figura 19	Termograma de pan de muerto fresco con transiciones en calentamiento y enfriamiento.
Figura 20	Termograma de pan de muerto desengrasado con transiciones en calentamiento y enfriamiento.
Figura 21	Termograma de pan de muerto desengrasado con ocho días de almacenamiento; transiciones en calentamiento y enfriamiento.
Figura 22	Difractograma de miga de pan de muerto desengrasado con cero y ocho días de almacenamiento.
Figura 23	Imágenes de TEM de NCA obtenidos de MPSD con diferentes ampliaciones. Objetivo 100X con barra de escala de 50 nm y objetivo 40X con barra de escala de 50 μm .
Figura 24	Termograma de fusión de NCA obtenidos de MPSD.

ABREVIATURAS

ATC	Almidón de trigo crudo
DRX	Difracción de rayos X
HT	Harina de trigo
HTC	Harina de trigo cruda
HTD	Harina de trigo desengrasada
mDSC	Microcalorimetría de barrido diferencial
MPM	Miga de pan de muerto
MPS	Miga de pan de muerto seca
MPSD	Miga de pan de muerto y desengrasada
NCA	Nanocristales de almidón
TEM	Microscopía de transmisión de electrones

RESUMEN

Los nanocompuestos han mostrado propiedades únicas ya que debido al efecto de su tamaño contribuyen a mejorar la resistencia mecánica de películas plásticas. También se ha probado su impacto positivo como barrera a gases en este tipo de materiales. A diferencia de los nanocristales de celulosa que han sido estudiados con más frecuencia, aquellos de almidón han merecido menos atención. Las nanopartículas de almidón son biomateriales prometedores para uso en alimentos, cosméticos, medicinas, entre otros.

Los pocos estudios reportados sobre obtención de nanocristales de almidón usan diferentes fuentes botánicas, e.g., maíz, papa, chícharo, arroz, como materia prima. Sin embargo, el almidón de maíz como fuente de nanocristales ha sido con mucho el más estudiado. En este aspecto, el almidón de trigo ha merecido poca atención y existe al menos un trabajo en el cual se reporta la obtención de nanocristales en comparación con otras fuentes.

La principal premisa de este trabajo fue analizar la factibilidad de obtener nanocristales de almidón (NCA) a partir de matrices con diferente grado de complejidad, e.g., almidón de trigo, harina de trigo y miga de pan de muerto, con el propósito de usar los métodos que aquí se describen para comparar los materiales obtenidos, examinar la factibilidad de aplicarlos no solo en almidón, y estudiar la retrogradación del almidón en una matriz más compleja mediante la separación de los NCA. No obstante, el trabajo solo se enfocó en la obtención de estos nanomateriales.

Los resultados muestran que fue posible obtener NCA a partir de almidón y harina de trigo mediante una hidrólisis ácida modificada con respecto a la reportada en la literatura. Sin embargo, en la miga de pan, considerada la matriz más compleja debido a su composición, no fue posible obtener NCA debido a la posible interferencia de las proteínas del gluten. Una posible solución sería la hidrólisis enzimática de las proteínas y su separación de la matriz previa a la obtención de los NCA. Esto permitiría aplicar los resultados aquí reportados en el estudio de la retrogradación del almidón en matrices complejas y no solo en almidón.

ABSTRACT

Nanocomposites have shown unique properties since, because of their size, they contribute to improving the mechanical strength of plastic films. Their positive impact as a barrier to gases in this type of materials has been proven as well. Unlike cellulose nanocrystals that have been studied frequently, those of starch have deserved less attention. Starch nanoparticles are promising biomaterials for use in foods, cosmetics, drugs, among others.

The few reported studies on the obtention of starch nanocrystals use different botanical sources, i.e., corn, potato, peas, rice, as raw material. However, corn starch as a source of nanocrystals has been the most studied. In this regard, wheat starch has deserved less attention, and there is at least one work in which the obtention of nanocrystals is reported in comparison with other sources.

The central premise of this work was to analyze the feasibility of obtaining starch nanocrystals (SNC) from matrices of different degrees of complexity, i.e., wheat starch, wheat flour, and pan de muerto crumb, with the purpose of using the methods described here to compare the materials obtained, examine the feasibility of applying them not only to study starch retrogradation in a more complex matrix by means of the separation of SNC. Nevertheless, this work only focused on the obtention of these nanomaterials.

Results show that it was possible to obtain SNC from wheat and flour starch by the acid hydrolysis modified regarding that reported in the literature. However, in bread crumb, considered the most complex matrix because of its composition, it was not possible to obtain SNC presumably because of interference of gluten proteins. A possible solution would be the enzymatic hydrolysis of proteins as a previous step to SNC obtention. This procedure would allow applying the results obtained here to study starch retrogradation in complex matrices and not only in starch.

1. INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos son una buena fuente de materiales renovables. Algunos, como la celulosa y el almidón, poseen una estructura parcialmente cristalina que les confiere propiedades interesantes. El almidón es un polisacárido que tiene un amplio campo de aplicaciones que van desde la impartición de textura y consistencia en alimentos hasta la manufactura de papel, adhesivos y empaques biodegradables (Zhao y Whistler, 1994). Al ser una materia prima abundante, renovable, económica y biodegradable, el almidón es una opción altamente viable para dichos propósitos.

Dentro de la panificación, el almidón juega un papel de vital importancia ya que es el principal responsable del envejecimiento del producto. El pan tiene como fuente de almidón la harina con la que es elaborado, que puede tener diversos orígenes como maíz, cebada, trigo, entre otros. Los principales ingredientes de la miga de pan analizada en este estudio fueron leche, huevo, mantequilla, azúcar y harina de trigo.

El trigo es una planta gramínea de la familia del césped (CANIMOLT, 2005). Está compuesto por tres partes principales: endospermo, salvado y germen (Figura 1). Durante la molienda del grano de trigo para la obtención de harina, el salvado y el germen son removidos en su mayoría, quedando el endospermo, como el mayor componente de la harina de trigo.

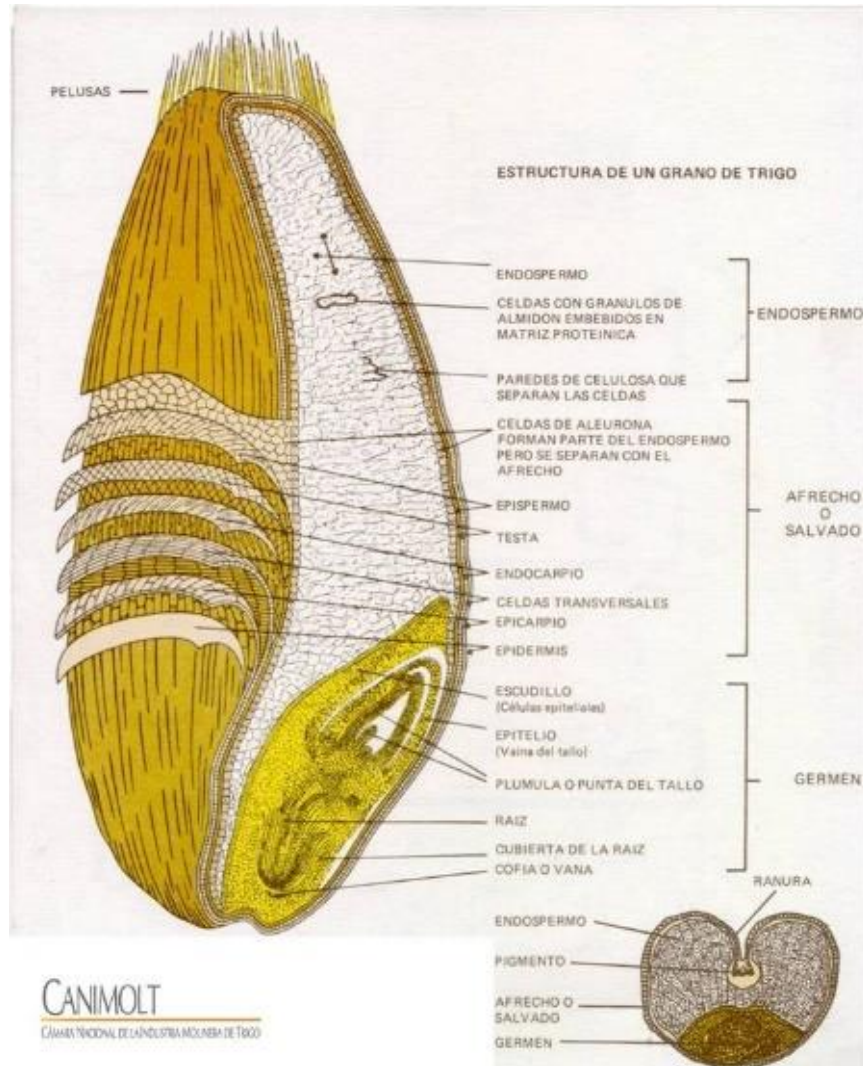


Figura 1. Estructura del grano de trigo (CANIMOLT, 2005)

El endospermo está constituido por almidón, proteínas, algunas vitaminas y celulosas. Su composición depende del tipo y origen del grano de trigo y sus condiciones de cultivo y año de cosecha (Juárez, Bárcenas y Hernández, 2014). Los hidratos de carbono constituyen 77 a 87 % de la materia seca total y son los componentes más importantes de los cuales aproximadamente 64 % es almidón (Kent, 1987).

De la molienda de trigo se obtiene harina, uno de los principales ingredientes que se utiliza para preparar el pan de muerto, objeto de estudio en esta tesis. Al provenir directamente del endospermo, la cantidad de almidón que contiene la harina es aproximadamente 60-72 %. Este contenido depende del grado de extracción en la

molienda. La harina blanca comercial corresponde a 70-74 % de extracción de la molienda del grano de trigo (Hernández y Sastre, 1999). En la harina de trigo, como en algunas otras, cuando se tiene un menor grado de extracción disminuye la cantidad de proteínas y grasa, y aumenta la proporción de hidratos de carbono digeribles, es decir, la harina refinada contiene una mayor cantidad de almidón que la harina integral por la proporción de sus demás ingredientes.

Aunque en la molienda de trigo, el principal cambio es la modificación nutrimental del grano a la harina, también se modifica el almidón, ya que la estructura de los gránulos es afectada por la trituración dejándolos expuestos para ser funcionales en la panificación. El almidón triturado influye en la capacidad de hidratación de la harina y esta a su vez es un importante indicador de las cualidades panificadoras. Además, junto con el gluten, otorga elasticidad a la masa para una correcta elaboración de pan.

En diversos artículos se ha reportado la obtención de nanocristales de almidón (NCA) a partir de almidón de maíz ceroso, principalmente. Sin embargo, no existen datos sobre la obtención de dichas nanopartículas a partir de una matriz compleja que contenga una importante fuente de almidón.

Es posible que las condiciones a las que se ha sometido la fuente de almidón utilizada aquí, miga de pan de muerto, afecten significativamente el funcionamiento de las técnicas reportadas para la obtención de NCA y aumenten o disminuyan el rendimiento de la reacción. Esto se comprobará toda vez que el producto de la reacción, e.g., los NCA, sea caracterizado por medio de diversas técnicas instrumentales y ópticas.

HIPÓTESIS

Será posible obtener NCA a partir de matrices de diferente complejidad, principalmente harina de trigo y miga de pan de muerto, mediante el procedimiento usado para tal efecto a partir de almidones de diferentes fuentes botánicas, reportado en la literatura.

OBJETIVOS

Mediante una metodología reportada en la literatura, obtener NCA a partir de almidón de trigo, harina de trigo y miga de pan de muerto, para disponer de un procedimiento que permita retirar el almidón de matrices con diferente complejidad.

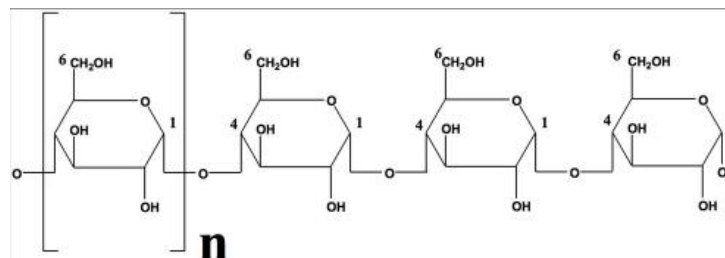
Caracterizar los NCA obtenidos a partir de las tres matrices mediante distintas técnicas para conocer sus propiedades físicas y termodinámicas.

2. MARCO TEÓRICO

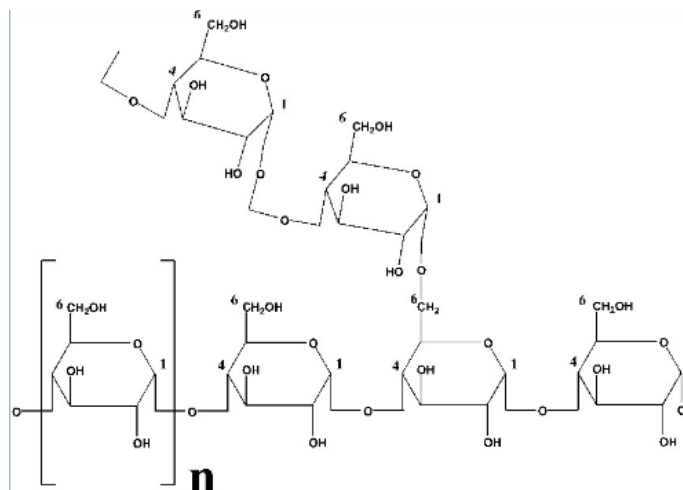
2.1 ALMIDÓN

Para comprender la funcionalidad y las principales características de los nanocristales de almidón, inicialmente, es necesario saber más acerca del material de proveniencia, así como su estructura y sus propiedades.

El almidón está formado por gránulos microscópicos cuyos diámetros van de 2 a 100 μm dependiendo del origen botánico (Gallant, Bouchet y Baldwin, 1997). A su vez, los gránulos están formados por amilosa y amilopectina; dos polímeros de glucosa (Figura 2). Los tipos comunes de almidón contienen 72 a 82 % de amilopectina y 18 a 28% de amilosa. Sin embargo, algunos tipos de almidón como el amilo-maíz tienen hasta 70 % o más de amilosa mientras que el maíz ceroso tiene menos aproximadamente 1 % de amilosa.



(a)



(b)

Figura 2. (a) Estructura de la amilosa, (b) estructura de la amilopectina (Martínez, 2014).

La amilosa (Figura 2a) es una molécula lineal en la cual las unidades de glucosa están unidas por enlaces glucosídicos α -(1-4), con ligeras ramificaciones con enlaces α -(1-6). La amilosa no es soluble en agua fría, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal (Knutzon y Grove, 1994). La amilopectina (Figura 2b) es un polímero altamente ramificado con ramas cortas de glucopiranosas unidas en α -(1-4) e interconectadas por enlaces glicosídicos α -(1-6) aproximadamente cada veintidós unidades de glucosa. La hiper-ramificación conduce a describir la organización básica de las cadenas como A, B y C. La única cadena C por molécula, con un grado medio de polimerización (GMP) superior a sesenta, porta otras cadenas como ramificaciones y contiene el extremo reductor terminal de la amilopectina. Las cadenas A están unidas por enlaces glicosídicos al resto de la molécula por su grupo reductor a través del C6 de un residuo de glucosa. Las cadenas B son portadoras de otras cadenas como ramas y están unidas al resto de la molécula por su grupo reductor en un lado y por un enlace α -(1-6) del otro. De esta forma constituyen la columna vertebral de la amilopectina formando racimos similares a los de la vida. Se han propuesto varios modelos, pero todos hacen referencia al modelo de clúster presentado en la Figura. 3.

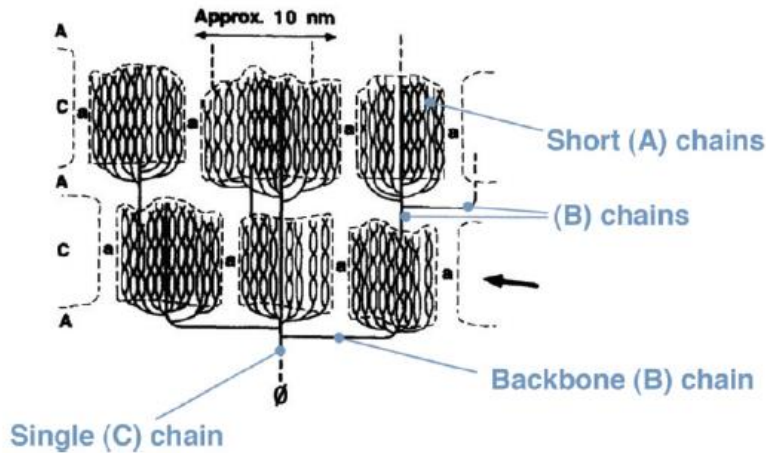


Figura 3. Modelo de clúster de la amilopectina (Gallant *et al.*, 1997) (cadenas cortas (A), Cadenas (B), cadena central (B), cadena sencilla (C)).

La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo produce un color rojizo violeta (Guan y Hanna, 2004). Durante la gelatinización, el orden molecular dentro de los gránulos es destruido gradual e irreversiblemente, y por esto la temperatura de gelatinización es característica para cada tipo de almidón y depende fundamentalmente de la transición vítrea de la fracción amorfa del almidón (Eerlingen y Delcour, 1995). En la retrogradación el desarrollo de la cristalización del almidón al cabo de un tiempo prolongado se atribuye a la fracción de amilopectina y puede ser reversible calentando a 100 °C (Eliasson y Gudmundusson, 1996).

La formación de geles y la retrogradación de amilosa y amilopectina en dispersiones acuosas o disoluciones son de gran relevancia para la industria alimentaria ya que son las principales razones del deterioro de los productos ricos en almidón (Mestres, Colonna y Buléon, 1988).

2.2. EL GRANÚLO DE ALMIDÓN

La estructura del gránulo de almidón es muy compleja. A pesar de haber sido investigada por años no existe aún un modelo de aceptación generalizada. Sin embargo, en la última década ha predominado el modelo mostrado en la figura 4 (Le Corre, Bras y Dufresne, 2010).

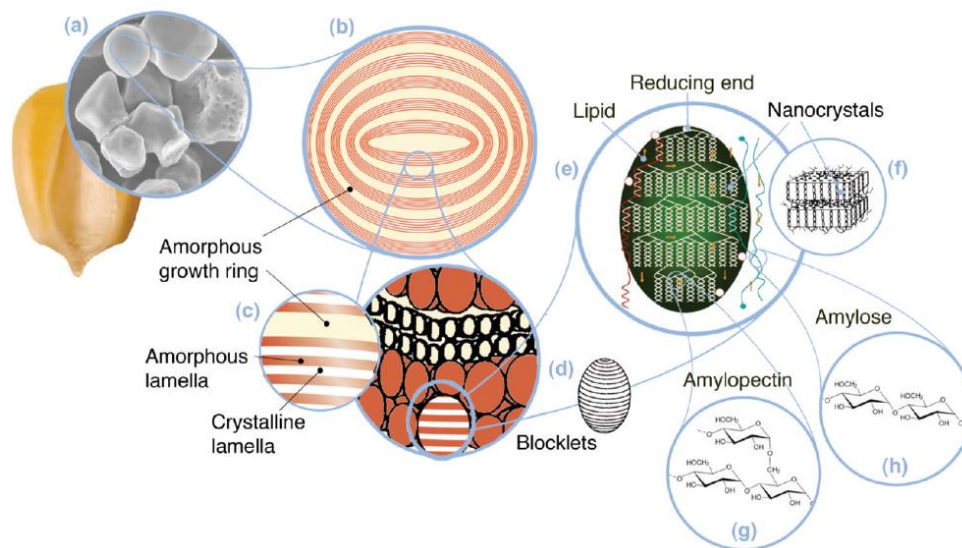


Figura 4. Estructura de escalas múltiples del gránulo de almidón (Le Corre *et al.*, 2010). En orden de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: anillos de crecimiento amorfo, lamela amorfa, lamela cristalina, lípido, terminal reductora, nanocristales, amilosa, amilopectina y *blocklets*.

De acuerdo con esta concepción, el gránulo (a), cuyo tamaño es de 2-100 μm , está formado por anillos de crecimiento amorfo y semi-cristalino (b), 120-500 nm, compuestos por lamelas amorfas y cristalinas (c), 9 nm, que constituyen *blocklets* (d), 20-50 nm, con dobles hélices de amilopectina (e) que forman las laminillas cristalinas de los *blocklets* y los nanocristales (f) que se separan por hidrólisis ácida. La amilopectina (g) y las cadenas de amilosa (h), 0.1-1 nm, son la escala más pequeña de la estructura del gránulo (Gallant *et al.*, 1997).

La forma y el tamaño de los gránulos dependen de su origen botánico. El gránulo muestra birrefringencia cuando es observado bajo el microscopio y luz polarizada. La orientación radial de las macromoléculas en la región cristalina es la responsable de la "cruz de Malta" refractada. La difracción de rayos X muestra que el almidón es un polímero semi-cristalino porque hay zonas amorfas y semi-cristalinas alternadas que crecen por afluencia desde el hilio del gránulo. El número y espesor de estas capas depende del origen botánico del almidón. Se cree que su espesor es de 120-400 nm. Vale la pena señalar que los detalles de la estructura del anillo de crecimiento amorfo no se encuentran en la literatura (Le Corre *et al.*, 2010).

En los anillos concéntricos se alternan regiones semi-cristalinas y cristalinas entre 120 y 400 nm, las cuales se suceden desde la superficie hasta el centro del gránulo. En el maíz y el trigo estas estructuras tienen un tamaño de 80-120 nm (Gallant *et al.*, 1997). Cada *blocklet* contiene varias laminillas de amilopectina llamadas *clusters* que a su vez están divididos por material amorfo, amilosa y lípidos.

El concepto de *blocklet* fue desarrollado en la década de 1930s, pero a pesar de ello no se menciona comúnmente en la literatura. Hace veinte años fue nuevamente discutido y apoyado con vehemencia (Gallant *et al.*, 1997) para explicar el crecimiento de los anillos semi-cristalinos y amorfos que forman los *blocklets* grandes, e.g., diámetro 20-500 nm para almidón de trigo, y pequeños, e.g., 25 nm. En promedio, dos *blocklets* de extremo a extremo constituirían un solo anillo de crecimiento semi-cristalino. Estos *blocklets* tienen un tamaño promedio de 100 nm de diámetro y se propone que contienen 280 agrupaciones de cadenas laterales de amilopectina. Esquemáticamente, los anillos de crecimiento semi-cristalino consisten en una pila de laminillas repetidas cristalinas y amorfas (Figura 4). El espesor de las capas combinadas es de 9 nm independientemente del origen botánico. Se postula que la región cristalina se crea mediante el entrelazado de cadenas con una longitud lineal superior a diez unidades de glucosa para formar dobles hélices que se empaquetan y forman los cristalitos. La región amorfa corresponde a los puntos de ramificación. La cristalización o formación de dobles hélices puede ocurrir en el mismo grupo de ramificaciones de amilopectina o entre grupos adyacentes en tres dimensiones y se denomina estructura super-helicoidal. Gallant *et al.* (1997) también observaron alrededor de diez laminillas de amilopectina dentro de los *blocklets*. Calcularon que suponiendo que un grupo de la cadena lateral de la amilopectina es de 10 nm, un *blocklet* pequeño, e.g., 20-50 nm, está compuesto por aproximadamente 2-5 grupos de cadenas laterales. Según este modelo (Figura 4d), la amilopectina es la columna vertebral de la estructura del *blocklet*. Se cree que la amilosa en el gránulo se produce como moléculas individuales, intercaladas al azar entre las moléculas de amilopectina y en estrecha proximidad entre sí, en las regiones cristalinas y en las amorfas (Figura 4h). Dependiendo del origen botánico del almidón, la amilosa se encuentra

preferiblemente en la región amorfa como en el almidón de trigo. En el almidón de maíz normal está intercalada entre los grupos de amilopectina, en la zona amorfa y en las regiones cristalinas. En el almidón de papa se encuentra en haces entre los cúmulos de amilopectina, o co-cristalizado con ella. Los almidones nativos contienen entre 15 y 45 % de material cristalino.

Dependiendo de su patrón de difracción de rayos X, los almidones se clasifican en tres tipos cristalinos llamados A, B y C. Se ha postulado que la longitud de la cadena de amilopectina es un factor determinante para el polimorfismo cristalino. Existe un modelo de configuración del empaquetamiento de doble hélice para explicar la diferencia entre los tipos A y B de almidón (Figura 5). El tipo C sería un intermedio entre A y B (Le Corre *et al.*, 2010).

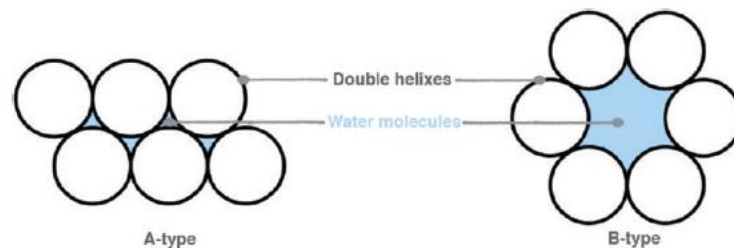


Figura 5. Configuración del empaquetamiento de dobles hélices para los tipos cristalinos A y B del almidón (Le Corre *et al.*, 2010).

Las estructuras de tipo A están estrechamente empaquetadas con moléculas de agua entre cada estructura de doble hélice, mientras que los tipos B son más abiertos y las moléculas de agua están ubicadas en la cavidad central formada por seis dobles hélices, Figura 5. Otro tipo, llamado V, es el resultado de la formación de complejos entre la amilosa con otras sustancias como yodo, ácidos grasos, emulsionantes o butanol. Esta forma cristalina se caracteriza por una simple hélice izquierda con seis unidades de glucosa por vuelta. Los tipos de almidón se comportan de manera diferente frente a la hidrólisis ácida. La parte central del almidón tipo C se hidroliza de modo preferente y el almidón hidrolizado muestra un patrón de difracción de tipo A. Esto sugiere que los polimorfos de tipo B constituyen principalmente las regiones amorfas y se hidrolizan más fácilmente que los tipos A que constituyen principalmente la región cristalina. Los almidones tipo B son más

resistentes a los ácidos que los tipos A. Estas conclusiones son importantes para la producción de nanocristales de almidón.

Los gránulos de almidón están asociados con constituyentes menores como fragmentos de pared celular, componentes de la superficie y componentes internos. Los componentes de la superficie son principalmente proteínas, enzimas, aminoácidos y ácidos nucleicos, y los componentes internos están compuestos principalmente de lípidos. La proporción de estos componentes depende del origen botánico (Le Corre *et al.*, 2010).

2.3. NANOCRISTALES DE ALMIDÓN (NCA)

Los términos, comúnmente usados, cristalito de almidón, nanocristal de almidón, almidón microcristalino y almidón hidrolizado se refieren a la parte cristalina del almidón obtenido por diferentes grados de hidrólisis, e.g., de mayor a menor. Un componente distinto lo forman las nanopartículas de almidón las cuales pueden ser amorfas. Dufresne, Cavailé y Helbert, (1996) fueron los primeros en reportar un método para producir lo que ellos llamaron “almidón microcristalino”. Se trata de partículas aglomeradas con un diámetro de unas cuantas decenas de nanómetros. El procedimiento usado por estos investigadores consistió en hidrolizar almidón (50 mg/g) en una suspensión 2.2 mol/L de HCl durante quince días. Años más tarde Putaux, Molina-Boisseau, Momauro y Druifense (2003) revelaron la morfología de “nanocristales resultantes de la alteración de los gránulos de almidón de maíz ceroso por hidrólisis ácida”. Después de seis semanas de hidrólisis, las observaciones en microscopia de transmisión de electrones (TEM por sus siglas en inglés) mostraron una vista longitudinal de fragmentos lamelares que consisten en una pila de elementos alargados con un ancho de 5-7 nm y una vista plana de una plaqueta individualizada después de la hidrólisis (Figura 6).

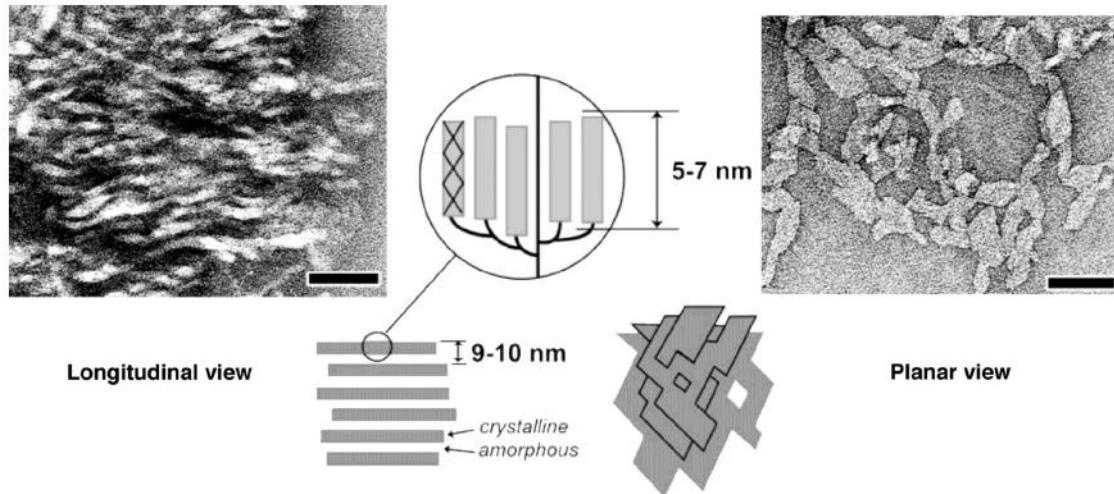


Figura 6. Primeras observaciones en TEM de nanocristales de almidón de maíz (de izquierda a derecha): vista longitudinal y planar (Le Corre *et al.*, 2010).

El tamaño de los nanocristales de almidón depende de su origen botánico. Los nanocristales de almidón de papa son de 40-70 nm, los de chícharo 30-80 y 60-150 nm, y de 50 y 70-100 nm para maíz ceroso con bordes redondos y formando agregados similares a la vid de 1-5 μm . La heterogeneidad de tamaños podría explicarse por las diferencias en los tipos de almidón y también por la dificultad para obtener imágenes bien definidas de los nanocristales no agregados. La cristalinidad de los gránulos de almidón varía de 15 a 45 % y es atribuida a las cadenas cortas lineales de amilopectina que forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Zobel, 1988).

2.4. PREPARACIÓN DE NANOCRISTALES DE ALMIDÓN

La formación de nanocristales de almidón resulta de la ruptura de los dominios amorfos de los gránulos semi-cristalinos por hidrólisis ácida (Le Corre, Vahanian, Dufresne y Bras, 2012a). La hidrólisis ácida es larga porque ocurre en dos etapas. Inicialmente tiene lugar una hidrólisis rápida, presumiblemente debida a la hidrólisis de las regiones amorfas de los gránulos de almidón, y luego un segundo paso más lento, presumiblemente debido a la hidrólisis de las regiones cristalinas. La hidrólisis podría ocurrir también en tres pasos: uno rápido, uno lento y uno muy lento, presumiblemente correspondientes a la hidrólisis de capas amorfas, capas semi-cristalinas y cristalinas, respectivamente. Hay dos hipótesis comunes para explicar la velocidad de hidrólisis más lenta del dominio cristalino. La primera es que el denso empaque del gránulo de almidón en las regiones cristalinas no permite fácilmente la penetración de H_3O^+ . La segunda es que la hidrólisis de los enlaces glucosídicos requiere un cambio en la conformación de silla a media silla. Los factores que influyen en la cinética de la hidrólisis son el tiempo, el tipo de ácido, la concentración de ácido y la temperatura (Le Corre *et al.*, 2010).

La influencia del tipo de ácido y de almidón ha sido estudiada extensamente. Para la misma concentración y cantidad de ácido, el rendimiento de hidrólisis en orden decreciente es: $HCl > HNO_3 > H_2SO_4 > H_3PO_4$. Esta tendencia parece mantenerse en la producción de nanocristales ya que el HCl produce un mayor rendimiento que el H_2SO_4 . Sin embargo, las suspensiones finales son más estables con H_2SO_4 debido a la presencia de grupos sulfato en la superficie (Angellier, Choisnard, Molina-Boisseau, Ozil y Dufresne, 2004). El comportamiento de los almidones de cereales es también diferente. Aproximadamente, el grado de hidrólisis es más pronunciado en el maíz ceroso que en la avena, el arroz, el maíz normal, el amilo-maíz V (50-60 % de amilosa), y el amilo-maíz VII (70 % de amilosa). Se sabe que la primera etapa de hidrólisis, en regiones amorfas, está influenciada por el tamaño del gránulo, los poros en la superficie, el contenido de amilosa y la cantidad de cadenas de amilosa formadas por lípidos. El segundo paso de la hidrólisis, en la región cristalina, está influenciado por el contenido de amilopectina, el modo de

distribución de las ramas α -(1-6) entre las zonas amorfas y cristalinas, y el grado de empaquetamiento de las dobles hélices dentro de los cristalitos, e.g., los parámetros que también influyen en la cristalinidad. La velocidad de hidrólisis aumenta con el proporcionalmente a la concentración de ácido para una temperatura constante de 50 °C. En la producción de nanocristales de almidón, la técnica de superficie de respuesta ha mostrado que la concentración de ácido y la temperatura no deben ser demasiado altas; la concentración de ácido no mayor de 3.16 mol/L y la temperatura 40 °C (Angellier, *et al.*, 2004).

Las condiciones de hidrólisis no cambian mucho entre los investigadores. Sin embargo, las técnicas para seguir el grado de hidrólisis son numerosas y muy variadas. La más común consiste en seguir el contenido de carbohidratos solubles totales. Sin embargo, se han usado técnicas como porcentaje del almidón inicial, análisis de fracciones de masa molar, y grado de hidrólisis por viscosidad de la suspensión medida en el Viscograph-E de Brabender. En la producción de nanocristales de almidón, se ha usado la masa seca de partículas insolubles como porcentaje de almidón inicial (Angellier *et al.*, 2004) e incluso la viscosidad intrínseca y el grado de hidrólisis.

Durante la primera década del siglo XXI solo se publicó un número limitado de artículos sobre la producción de nanocristales de almidón. La mayoría de ellos reporta el uso de la hidrólisis ácida y aunque se ha utilizado una variedad de fuentes de almidón, todos se refieren a los mismos dos procesos.

1. El proceso de Dufresne *et al.* (1996) con HCl.
2. El proceso de Angellier *et al.* (2004) quienes optimizaron el de Dufresne y colaboradores utilizando H₂SO₄.

En este proceso una cantidad de gránulos de almidón (146.9 mg/g de ácido) se mezcló con un volumen dado de H₂SO₄ 3.16 mol/L en un matraz Erlenmeyer y se agitó constantemente a 100 rpm mientras se mantuvo a 40 °C. Después de cinco días, la suspensión se lavó mediante centrifugaciones sucesivas con agua destilada hasta neutralidad durante 10 min a 10000 rpm. La suspensión se sometió luego a un tratamiento mecánico con homogeneizador Ultra Turrax durante 2 min a 13 000 rpm para dispersar los agregados y obtener una suspensión "estable". Para evitar

el desarrollo bacteriano durante el almacenamiento, se agregaron unas gotas de cloroformo a la suspensión que se mantuvo en una celda a 4 °C.

Angellier *et al.* (2004) han reportado las características morfológicas presuntivas de los NCAs en almidón de maíz ceroso, trigo, papa, yuca, y otros obtenidos por hidrólisis ácida. Los NCAs se consideran materiales semi-cristalinos con cristalinidad aproximada de 45 % (Le Corre *et al.*, 2010). A pesar de eso son completamente insolubles en agua y resistentes a la hidrólisis ácida (Kim, Park y Lim, 2015). El tamaño de los NCAs típicamente se encuentra entre 30 y 100 nm, pero depende de la técnica usada para obtenerlos y de la composición del almidón (Kim *et al.*, 2015).

No existen muchos reportes sobre la obtención de NCA de almidón de trigo. La Figura 7 muestra imágenes de gránulos de almidón de trigo y sus nanocristales obtenidos por hidrólisis ácida (Le Corre, Bras y Dufresne, 2011).

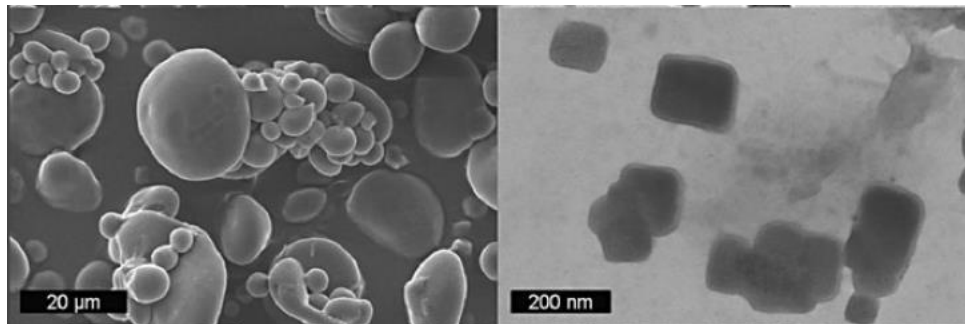


Figura 7. Gránulos de almidón de trigo (izquierda) y sus nanocristales obtenidos por hidrólisis ácida (derecha) (Le Corre *et al.*, 2011).

La investigación previa realizada en nuestro grupo de trabajo (Garzaro Aparicio, 2015), mostró que el procedimiento reportado en la literatura (Angellier *et al.*, 2004) es efectivo para la extracción de NCAs a partir de almidón de trigo. En esta tesis se comprobó este procedimiento en diferentes matrices. Además, se realizaron modificaciones a la técnica basados en estudios previos (Le Corre *et al.*, 2010; Kim, Lee, Kim, Lim y Lim, 2012).

3. METODOLOGÍA

Para la obtención de nanocristales de almidón, se realizó el mismo procedimiento en diferentes muestras para su reproducción o comparación con técnicas previamente reportadas (Angellier *et al.*, 2004; Le Corre *et al.*, 2012a; Kim *et al.*, 2012). Los nanocristales de almidón se caracterizaron con las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés), microcalorimetría de barrido diferencial (mDSC por sus siglas en inglés) y difracción de rayos X de polvos (DRX). Estas técnicas fueron utilizadas ya que han sido reportadas para el mismo propósito (Angellier *et al.*, 2004; Le Corre *et al.*, 2012a; Kim *et al.*, 2012) y se consideran una fuente confiable de información acerca de la presencia y estructura de los nanocristales de almidón.

3.1. Obtención de nanocristales de almidón de almidón de trigo crudo

Se mezclaron 21 g de almidón de trigo crudo (ATC) (74 % de amilopectina) en un matraz de 250 mL con 136 mL de una disolución 3.15 mol/L de H₂SO₄ y una barra de agitación magnética y se dejó hidrolizar durante 120 h a 40 °C y agitación continua a 500 rpm. La temperatura se controló con un baño de circulación (Polystat®, Cole-Parmer, EE. UU.), se agitó con una parrilla sumergible (Multistitter, Scinics, Japón) y el matraz se fijó con un anillo de plomo (Scienceware®, EE. UU.). Transcurridas las 120 h, la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm durante 30 min en una centrífuga de mesa (Hermle Z200A, Labnet, Alemania). El sobrenadante se neutralizó y se desechó. El residuo de la centrifugación se recuperó en un vaso de precipitados de 400 mL y se añadieron 2-3 mL de agua desionizada. La suspensión resultante fue neutralizada con disoluciones 3 y 1 mol/L de NaOH añadidas con bureta. El pH se midió con un potenciómetro (420A, ORION, EE. UU.). La suspensión neutralizada se centrifugó a 6000 rpm por 8 min. El sobrenadante se desechó y el residuo se recuperó con 5-10 mL de agua desionizada y se colocó en un vaso de precipitados de 250 mL con una barra de agitación magnética. Se agitó 30 min a 500 rpm en una parrilla (CIMAREC Thermolyne®, EE. UU.). Para remover el sulfato de sodio producido en la neutralización (Figura 8), se realizaron lavados

por centrifugaciones sucesivas con agua desionizada. Se centrifugó a 6000 rpm 10 min, se desechó el sobrenadante y se añadieron 14 mL de agua desionizada. Este proceso se repitió cuatro veces, para un total de cinco lavados. En el último lavado se añadieron 4-6 mL de agua desionizada y se recuperó el precipitado. Luego se homogeneizó a 13000 rpm por 5 min con un homogeneizador (modelo T25 Digital ULTRATURRAX®, IKA®, EE. UU.). La suspensión se colocó en frascos de plástico y se ultracongeló (REVCO ULT390, Legaci, EE. UU.) por 10-15 h. Se colocó en una liofilizadora (modelo 117, Labconco, EE. UU.) a 0.050-0.079 mbar y -50 °C. El secado duró 36-48 h. El polvo obtenido se molió en un mortero, se pesó y se almacenó a temperatura ambiente en un frasco de plástico cerrado.

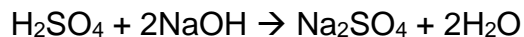


Figura 8. Reacción de neutralización del residuo de la primera centrifugación en la obtención de NCA.

3.2. Extracción de lípidos de la harina de trigo cruda (HTC)

Se pesaron 28 g de harina de trigo cruda y se colocaron en un vaso de precipitados de 600 mL con una barra magnética de agitación. Para la extracción de lípidos se añadieron 160 mL de éter etílico y se colocó en una parrilla para agitación durante 20 min. Después de este tiempo se dejó sedimentar durante 30 min y se removió el sobrenadante. Posteriormente se repitió la extracción hasta que el sobrenadante fue un líquido transparente, aproximadamente tres veces, cuando la muestra se consideró desengrasada. La harina desengrasada que dejó secar durante 24 h.

3.3. Extracción de nanocristales de almidón de harina de trigo desengrasada (HTD)

Se colocaron 28.96 g de HTD en un matraz de bola de fondo plano de 250 mL y se agregaron 193 mL de ácido sulfúrico 3.15 mol/L. Estas cantidades se obtuvieron a partir de la metodología reportada en la literatura (Angellier *et al.*, 2004) y las

relaciones de porcentaje de amilopectina que contiene cada compuesto. Los cálculos se muestran a continuación.

En 15 g de amilopectina (AP) proveniente de almidón de maíz ceroso (> 99 % de amilopectina) se usan 100 mL de H₂SO₄ 3.15 mol/L (Le Corre *et al.*, 2010), mientras que la harina contiene aproximadamente 70 % de almidón de trigo y este a su vez contiene aproximadamente 74 % de AP. De acuerdo con esta relación

$$15 \text{ g AP} \times \frac{100 \text{ g de ATC}}{74 \text{ g de AP}} \times \frac{100 \text{ g de HT}}{70 \text{ g de ATC}} = 28.96 \text{ g de harina de trigo}$$

$$\frac{15 \text{ g de AP}}{28.96 \text{ g de HT}} \times 100 = 51.80 \%$$

$$\frac{100 \text{ mL de H}_2\text{SO}_4}{51.80 \%} \times 100\% = 193.05 \text{ mL de H}_2\text{SO}_4$$

El resto del procedimiento es el mismo que para la extracción de los NCA a partir de ATC.

3.4. Obtención, secado y desengrasado de miga de pan de muerto (MPM)

Diversas piezas de pan de muerto se dejaron envejecer a temperatura ambiente durante siete días. Posteriormente se llevaron a -40 °C en un ultracongelador (REVCO ULT390, Legaci, EE. UU.) durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se cortó con un cuchillo la corteza del pan dejando expuesta la miga. La MPM se liofilizó durante 36-48 h en una liofilizadora (modelo 117, Labconco, EE. UU.) a -50 °C. La MPM seca (MPS) obtenida después de este tiempo, se trituró en un mortero y se almacenó para su posterior desengrasado. La MPS se desengrasó con el mismo procedimiento que para la HTC para finalmente obtener miga de pan seca y desengrasada (MPSD).

3.5. Obtención de nanocristales de almidón de miga de pan de muerto desengrasada (MPSD)

Se pesaron 26 g de MPSD y se colocaron en un reactor de vidrio de doble chaqueta conectado a un baño de temperatura constante. Se agregaron 173.3 mL de H₂SO₄. Estas cantidades se obtuvieron con los siguientes cálculos

$$\frac{15 \text{ g}}{26.00 \text{ g}} \times 100 \% = 57.69 \%$$

$$\frac{100 \text{ mL H}_2\text{SO}_4}{57.69\%} \times 100 \% = 173.3 \text{ mL H}_2\text{SO}_4$$

El resto del procedimiento fue el mismo que se utilizó para el ATC y la HTD.

3.6. Caracterización de los nanocristales de almidón de ATC, HTD y MPSD

3.6.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Se observaron los NCA en un microscopio electrónico de transmisión (modelo JEM-2010, marca JEOL, Reino Unido), con un voltaje de 200 kV; con la finalidad de identificar visualmente la presencia de NCA.

3.6.2. Difracción de rayos X (DRX)

Se usó un difractómetro de rayos X (modelo D8 ADVANCE DAVINVI, marca Bruker, Alemania) con radiación de CuK y filtro de Ni. El barrido fue de 2-40° durante 30 min. Se utilizaron los softwares Calisto Processing y Diffrac Measurement Center para analizar los datos, con la finalidad de comprobar la presencia de NCA al presentar señales de difracción en los picos característicos para este tipo de cristales.

3.6.3. Microcalorimetría de barrido diferencial (mDSC)

Se usó un micro-calorímetro (μ DSC7evo, Setaram, Francia) para examinar las transiciones térmicas. La muestra, 200 mg, hidratada en agua desionizada, 400 mg, se colocó en una celda de Hastelloy y se usó agua desionizada, 600 mg, como referencia. El barrido fue de 25 a 120 °C a una tasa de 1.2 °C/min. Se utilizó el software Calisto Processing para analizar los datos. Este proceso se realizó con la finalidad de visualizar las transiciones térmicas de los NCA y compararlas con las de las diferentes matrices analizadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Almidón de trigo crudo (ATC)

4.1.1. mDSC

La Figura 9 muestra los termogramas y la Tabla 1 las temperaturas y entalpías de transición del ATC. En calentamiento se observan dos transiciones endotérmicas. Una muy grande entre 54.7 y 62.94 °C que se atribuye a la gelatinización y una segunda, más pequeña, entre 94.96 y 105.71 °C que se atribuye a la fusión de cristalitos del complejo amilosa-lípidos (Pei, Xingxun, Xiao, Parveen, y Long, 2015).

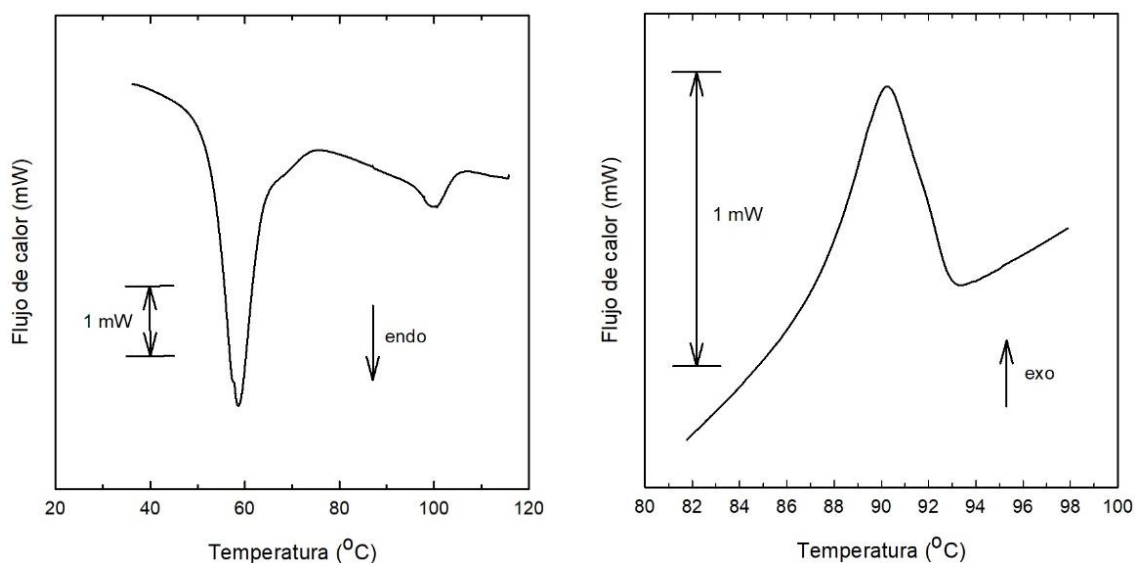


Figura 9. Termogramas de gelatinización (izquierda) y fusión de complejos amilosa-lípidos (derecha) del ATC.

Tabla 1. Propiedades obtenidas del termograma de ATC.

Transición	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	Entalpía, ΔH (J/g)
Gelatinización	54.70	58.61	62.94	1.15
Fusión complejo A-L	94.96	99.90	105.71	0.309
Recristalización	92.89	90.22	87.24	0.216

La primera transición endotérmica ocurre por la fusión de las laminillas cristalinas de amilopectina, mientras que la segunda puede ocurrir por la fusión de cristalitos no completamente hidratados o la disociación del complejo amilosa-lípidos (Pei, *et al.*, 2015). El intervalo de transición de la gelatinización es de 8.24 °C con una temperatura pico de 58.61 °C. Esta transición no es simétrica; la diferencia $T_p - T_0 = 3.91$ °C y la diferencia $T_f - T_p = 4.33$ °C. Esto muestra que el inicio de la gelatinización ocurre sobre un intervalo más corto que su conclusión. Por otro lado, la entalpía es relativamente baja, aunque conviene aclarar que está reportada por gramo de muestra y no por gramo de almidón.

En enfriamiento, aparece una transición exotérmica de 92.89 a 87.24 °C atribuida a la recristalización de los complejos amilosa-lípidos. Esta transición ocurre sobre un intervalo de temperatura más corto, 5.65 °C, que la gelatinización. Al igual que esta última no es simétrica dado que $T_p - T_0 = 2.67$ °C y $T_f - T_p = 2.98$ °C. Esto muestra que la formación de los cristales ocurre sobre un intervalo de temperatura ligeramente más corto que su conclusión. Por razones que se desconocen, en los estudios de transición térmica de almidones comúnmente no se reportan las transiciones exotérmicas que ocurren en el enfriamiento como la mostrada en la Figura 9. Esta transición muestra que la interacción de la amilosa presumiblemente con los lípidos es reversible.

La Tabla 2 muestra las temperaturas de transición de ATC reportadas en la literatura.

Tabla 2. Temperaturas de transición de ATC reportadas por otros autores.

Transición	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	Referencia
Gelatinización	58.00 ± 0.4	68.47 ± 0.3	83.49 ± 0.8	Pei <i>et al.</i> , 2015
Gelatinización*	53.3	59.1	76.4	Le Corre <i>et al.</i> (2012b)
Fusión complejo A-L	98.48 ± 0.6	105.54 ± 0.7	112.14 ± 0.3	Pei <i>et al.</i> , 2015

*almidón con una humedad de 70 %, e.g., 30:70 almidón: agua.

Los valores de Le Corre, Bras y Dufrense, (2012b) son más cercanos a los valores que fueron obtenidos con un contenido de agua de 67 %. Sin embargo, ellos no reportan la segunda transición. Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los mostrados en la Tabla 2.

4.1.2. Difracción de rayos X

La presencia y la relación entre las estructuras amorfas y cristalinas en el almidón producen un patrón de difracción de rayos X que puede ser usado para diferenciar almidones. El almidón de cereales muestra un patrón tipo A (figura 5) característico de una celda monoclinica en la cual las dobles hélices están empacadas densamente en la celda unitaria. La Figura 10 muestra el difractograma de rayos X del ATC. Es posible identificar los picos típicos del almidón para diferentes ángulos 2θ ; 15, 17, 18 y 23° que corresponden al patrón tipo A. Es importante señalar que, para este tipo de conformación, un difractograma más fino muestra picos característicos para $9.9, 11.2, 15, 17, 18.1, 20$ y 23.3° (Buléon, 1997). Estos picos se observan en la Figura 10.

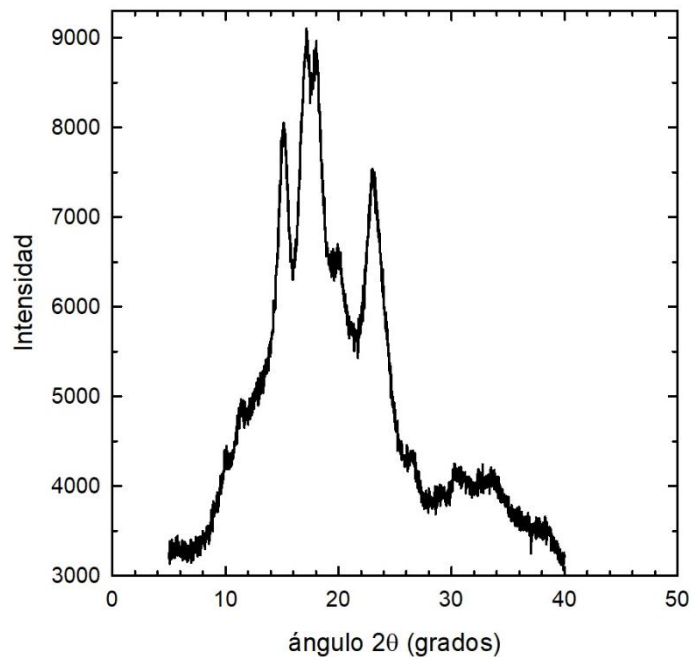


Figura 10. Difractograma del ATC.

4.1.3. TEM

La Figura 11 muestra una imagen de TEM del ATC. Los gránulos tienen una morfología prácticamente esférica con un diámetro aproximado de $30\ \mu\text{m}$.

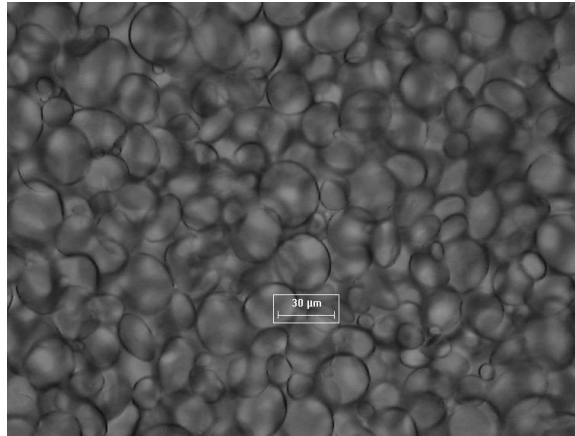


Figura 11. Imagen 40X de TEM de ATC. La barra de referencia es de 30 μm .

4.2. Nanocristales de ATC

4.2.1. TEM

La extracción de NCA del ATC a 40 °C durante cinco días no produjo los resultados esperados. Por ello se trabajó a 30 °C por cinco días. Bajo estas condiciones se obtuvieron NCA en cantidad suficiente para las observaciones en TEM (Figura 12), pero no para la caracterización con las otras técnicas. Por lo tanto, no fue posible confirmar la presencia de NCA en este caso.

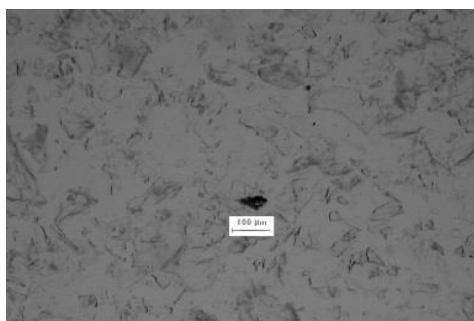


Figura 12. Imágenes 10X de TEM de NCA del ATC. La barra de referencia es de 100 μm .

4.2.2 mDSC

Existen pocos datos reportados sobre NCA de ATC. La mayoría de los datos son para almidón de maíz de diferentes tipos, e.g., normal, ceroso, alto en amilosa. Le Corre *et al.* (2012b) reportan dos transiciones endotérmicas para NCA de ATC. La primera ocurre para $T_0 = 59.0 \pm 9.1$ °C, $T_p = 77.7 \pm 11.8$ °C, $T_f = 100.7 \pm 1.7$ °C y la segunda transición para $T_0 = 101.7 \pm 1.1$ °C, $T_p = 105.5 \pm 0.3$ °C, $T_f = 111.3 \pm 2.2$ °C. La presencia de estas dos transiciones es consistente con aquellas observadas en el ATC, pero la primera está desplazada hacia temperaturas mayores. La segunda transición para NCA no puede compararse porque Le Corre *et al.* (2012b) no reportan la segunda transición para ATC.

4.3. Harina de trigo desengrasada (HTD)

4.3.1. mDSC

La Figura 13 muestra el termograma de la harina de trigo (HT). La harina de trigo desengrasada mostró esencialmente la misma señal. Los parámetros térmicos son; $T_0 = 55.18$ °C, $T_p = 62.39$ °C, $T_f = 74.64$ °C, $\Delta H = 2.136$ J/g. Se observa un hombro en la señal por arriba de 65 °C el cual puede atribuirse a la desnaturalización de proteínas que contiene la harina. Esta transición endotérmica se empalma con la atribuida a la gelatinización del almidón presente en la harina. Vale la pena señalar que a diferencia del ATC (Figura 9), la harina de trigo no mostró la transición atribuida al complejo amilosa-lípidos. Tampoco mostró la transición exotérmica de recristalización de este complejo.

4.3.2. Difracción de rayos X y TEM de HTD

Estas señales son similares a las del almidón de trigo crudo. Los patrones de difracción de rayos X en la harina corresponden al almidón, dado que las proteínas no producen difracción y los lípidos tampoco porque no están en forma de cristales.

La TEM de la harina de trigo muestra básicamente las estructuras identificadas como gránulos de almidón.

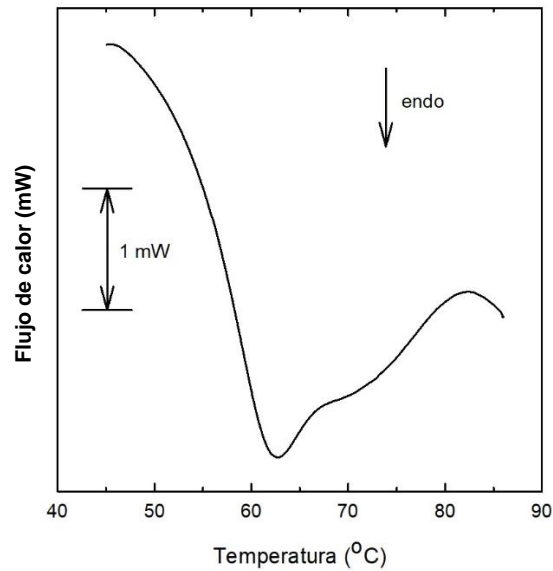


Figura 13. Termograma de harina de trigo.

4.4. Nanocristales de almidón de la harina de trigo desengrasada (HTD)

4.4.1. mDSC

Con base en la evidencia proporcionada por la TEM, se extrajeron los NCA de la HTD a 30 °C. La Figura 14 muestra los resultados de mDSC.

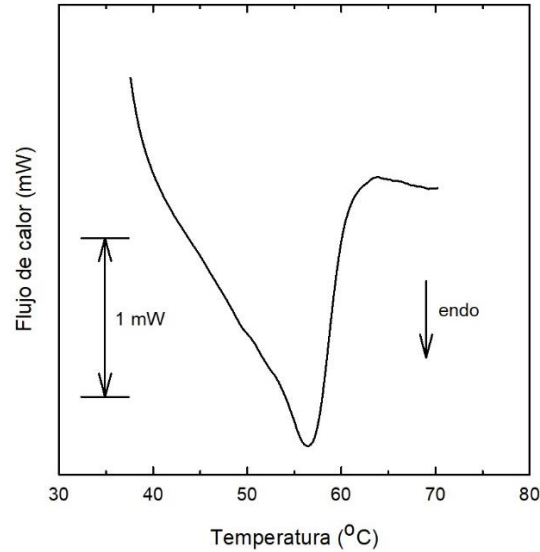


Figura 14. Termogramas de fusión de NCA obtenidos de la HTD a 30 °C.

Esta es una transición muy amplia que inicia en $T_0 = 38.87$ °C sin una clara línea base antes de esta temperatura. Este comportamiento podría atribuirse a una extracción incompleta de la grasa dado que no es lógico que la transición debida al almidón inicie a una temperatura tan baja. Una observación más detallada de la señal muestra dos pequeños “hombros” en 50.16 y 52.70 °C que son temperaturas más coherentes con lo esperado. La Tabla 3 muestra las temperaturas de la transición térmica correspondiente.

Tabla 3. Propiedades del termograma de los NCA obtenidos de la HTD a 30 °C.

T_0 (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	Entalpía, ΔH (J/g)
50.16 -52.70	56.45	61.17	0.316

Las temperaturas de los dos hombros de la transición endotérmica son cercanas a la mostrada en la Figura 13 ($T_0 = 50.87$ °C) y la reportada por Montoya, Giraldo y Lucas (2012) para harina de trigo ($T_0 = 53.27$ °C). Sin embargo, hasta donde se sabe, no existen datos publicados de parámetros de transición de NCA obtenidos a partir de harina de trigo.

Las transiciones de estado de los NCA de almidón de maíz normal y ceroso tienen su pico alrededor de 90 °C y son más amplias que las transiciones del almidón crudo, es decir, T_0 disminuye y T_f aumenta en los NCA (Kim *et al.*, 2012). Por lo tanto, los datos sugieren que, aunque pudiese haber presencia de NCA, el tratamiento térmico probablemente no fue suficiente tal que pudiera eliminar señales atribuibles a la HTC. A pesar de ello, el hecho de que aparezca una transición endotérmica en el material hidrolizado permite, razonablemente, atribuirla a la fusión de los NCA y por lo tanto muestran evidencia de su presencia y confirman que las condiciones usadas permiten obtenerlos.

4.4.2. Difracción de rayos X

La Figura 15 muestra el difractograma de los NCA obtenidos de la HTD.

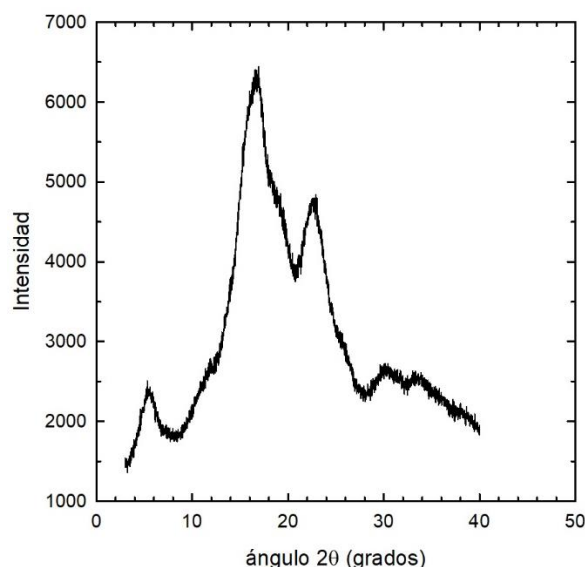


Figura 15. Difractograma de los NCA obtenidos de la HTD a 30 °C.

El difractograma muestra algunos picos con valores cercanos a los cristales de tipo A que serían los esperados para la HTD. Sin embargo, faltan señales típicas de este tipo de cristal a 9.9 y 15 °. El principal problema es que no fue posible disponer de cantidad suficiente de muestra para hacer repeticiones, dados los bajos rendimientos de hidrólisis. No obstante, se nota la presencia de picos para ángulos

20 5.34, 11.46, 16.47, 19.18 y 22.7 °. El pico a 5 ° es apenas incipiente en el ATC (Figura 9), pero aparece con mayor intensidad en el difractograma de la Figura 15. El pico a 11 ° es incipiente en el ATC y en el material proveniente del tratamiento de la HTD. El pico a 15 ° presente en el ATC (Figura 10) no aparece en la Figura 15. El pico a 17 ° en el ATC está desplazado ligeramente hacia 16.47 ° en el extracto de la HTD y es además el de mayor intensidad. En la HTD se aprecia un hombro alrededor de 19 ° que posiblemente es un remanente del pico a 18 ° que se observa en el ATC. Por último, el pico a 23 ° está presente en ambos casos con notable intensidad. El difractograma muestra la ausencia de estructuras asociadas con la interacción de amilosa y lípidos que no se esperan en el HTD. Los picos a 5 y 17° son característicos del tipo B. Sobre todo, este último es de mayor intensidad que en el tipo A. Tampoco hay presencia de pico a 18° característico del tipo A. Sin embargo, el pico a 23° que se observa en la Figura 15, no está presente en el tipo B. En resumen, el difractograma muestra picos atribuibles a los tipos A y B, pero con ausencia de picos típicos de ambos. Por ello, podría tratarse de cristales tipo C.

4.4.3. TEM

La Figura 16 muestra una imagen de TEM del hidrolizado de la HTD. Se observan estructuras que podrían atribuirse a la presencia de NCA. Las diferentes técnicas apuntan hacia este resultado, pero no es posible afirmarlo de manera contundente.

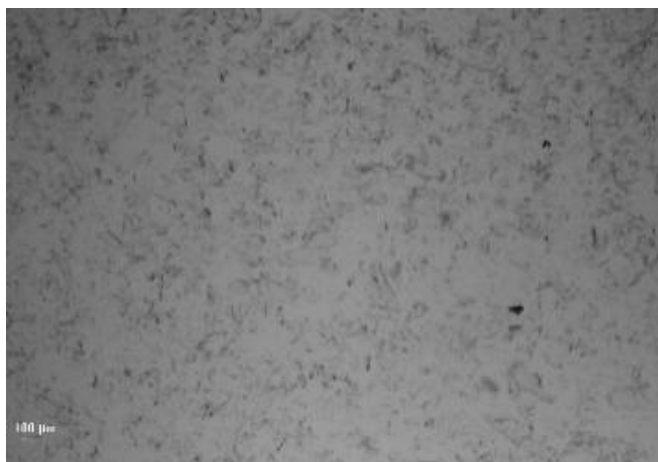


Figura 16. Imagen 10X de TEM de los NCA de HTD a 30 °C. La barra de referencia es de 100 μm.

4.5. Nanocristales de almidón de la HTD obtenidos a 40 °C

4.5.1. TEM

Al realizar la técnica de hidrólisis ácida a 30 °C para la obtención de NCA de MPSD, no se obtuvo un residuo para análisis de cualquier tipo por lo que el tratamiento térmico se hizo nuevamente a la temperatura reportada en la literatura (Angellier *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012; Le Corre *et al.*, 2012a). El principal problema que se encontró fue que el tratamiento térmico a 40 °C combinado con el tiempo prolongado y la elevada concentración de ácido, provocó la caramelización de los hidratos de carbono presentes en la HTD. Como consecuencia no se obtuvo el residuo esperado durante la centrifugación del medio inicial de reacción. El control de temperatura y la agitación son de extrema importancia. El control de estas dos condiciones de operación y la cantidad inicial de HTD, produjeron un residuo que fue posible observar en TEM (Figura 17).

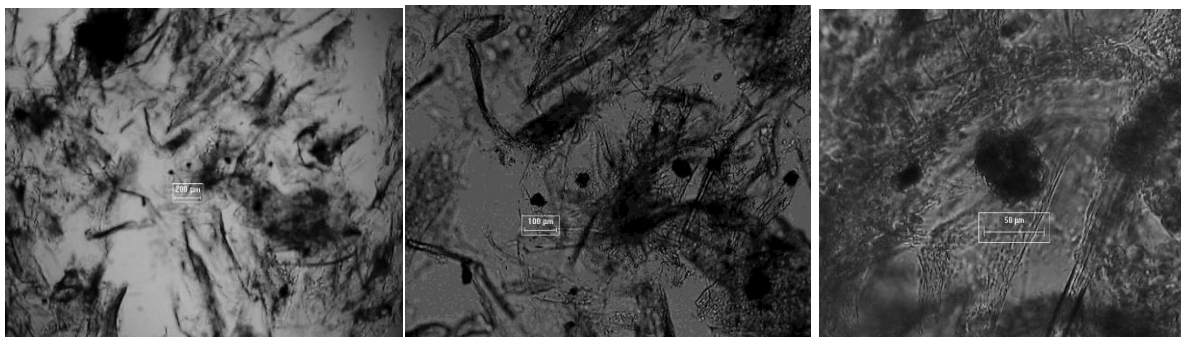


Figura 17. Imágenes de TEM de NCA obtenidos de HTD a 40 °C con diferentes ampliaciones. Objetivo 4X con barra de escala de 20 μm (izquierda), objetivo 10X con barra de escala de 100 μm (centro) y objetivo 40X con barra de escala de 100 μm (derecha).

Es posible observar que la cantidad de NCA es significativamente mayor que la obtenida en la reacción efectuada a 30 °C durante cinco días. Sin embargo, la cantidad de muestra final es de aproximadamente 70 mg por lo que aún no es suficiente para realizar todas las pruebas de caracterización con una sola extracción. Esto aumenta el error en las mediciones pues el polvo obtenido después

de la liofilización presenta características diferentes de coloración y tamaño en cada extracción realizada.

4.5.2. Difracción de rayos X

En la Figura 18 se muestra el difractograma para los NCA de la HTD. El difractograma no muestra los picos característicos de los cristales Tipo A, que son los esperados en este caso. Se observan dos picos de señales a 7.42, 12.32, 19.41, 21.51 y 23.70° que pueden representar el desplazamiento de las señales emitidas por cristales tipo B. Estos cristales, caracterizados por su arreglo hexagonal se atribuyen principalmente a la presencia del complejo amilosa-lípido. De acuerdo con Kim *et al.* (2012) el decrecimiento de las señales de difracción emitidas por los cristales tipo B se presenta debido a su hidrólisis ácida.

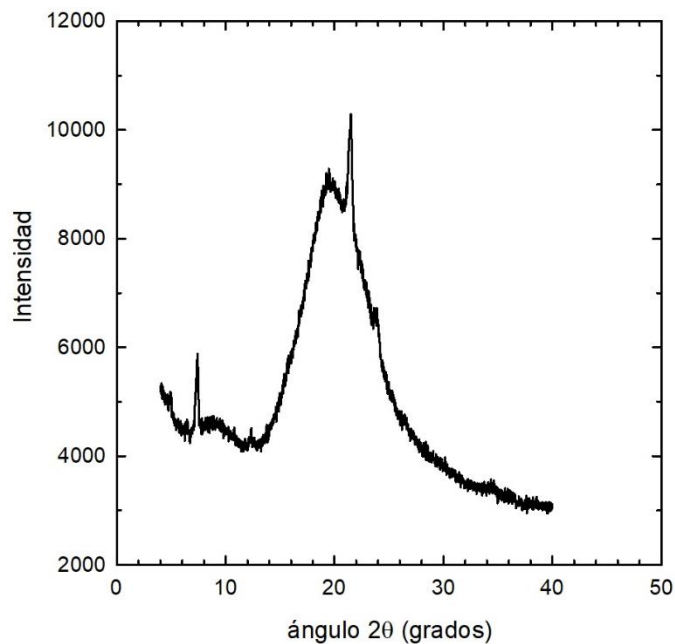


Figura 18. Difractograma de los NCA obtenidos de la HTD a 40 °C.

4.5.3. mDSC

El termograma para los NCA de la HTD a 40 °C no mostró transición alguna atribuible a la presencia de algún compuesto detectable en el intervalo de

temperatura utilizado, es decir, podría asumirse que no existe presencia de NCA en la muestra analizada. De acuerdo con los datos mostrados, se deduce que la obtención de NCA de la HTD es más eficiente a 30 que a 40 °C.

4.6 Miga de pan de muerto (MPM)

4.6.1. mDSC

La miga de pan de muerto es la matriz más compleja de las trabajadas en este estudio. Su formulación incluye 35 % de materia grasa en relación con la masa total de ingredientes. Hay también una cantidad considerable de proteínas proveniente de la harina de trigo, el huevo entero y la leche. Además, hay también hidratos de carbono que incluyen el almidón presente en la harina, los azúcares de la leche, y la sacarosa proveniente del azúcar que se agrega. Otros ingredientes menores incluyen vitaminas, minerales y todos los compuestos generados por la levadura durante la fermentación que contribuyen al sabor y al olor del pan. Como se verá más adelante esta composición compleja, complicó la obtención de los nanocristales del almidón contenidos en la miga.

La Figura 19 muestra el termograma de miga de pan de muerto fresco, es decir, preparado el mismo día en que se hizo la prueba de mDSC.

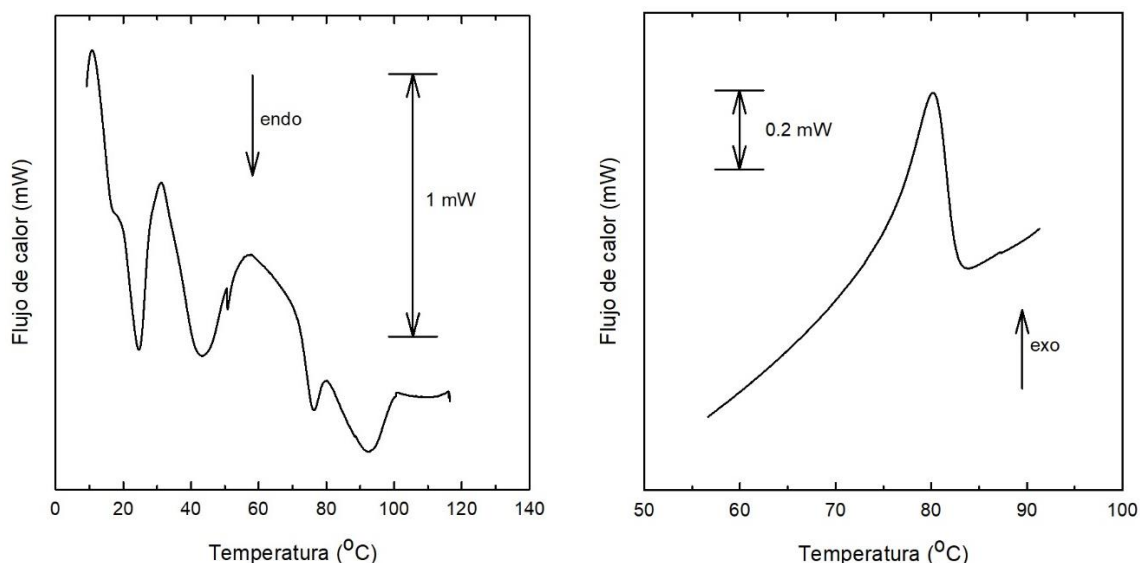


Figura 19. Termograma de pan de muerto fresco con transiciones en calentamiento (izquierda) y enfriamiento (derecha).

Las transiciones endotérmicas principales en calentamiento pueden atribuirse a la materia grasa, la amilopectina y el complejo amilosa-lípido. Las temperaturas de inicio, pico y conclusión, respectivas son: 16.5, 24.6, 31.4; 31.4, 43.7, 57.6; 80.08, 92.5, 101.28 °C. Las transiciones son amplias y están tan juntas que es difícil distinguir la línea base, sobre todo en aquellas que ocurren a menor temperatura. En el enfriamiento de la miga, se pudo observar una transición exotérmica que inició en 83.5 °C, con un pico en 80.14 °C y una conclusión en 73.08 °C. Sin embargo, la transición es amplia y concluye aproximadamente en 67.09 °C. Esta transición podría atribuirse a la retrogradación de la amilosa o a la recristalización del complejo amilosa-lípido. El pequeño pico antes de la transición atribuida a la amilosa-lípido podría deberse a la gelatinización del almidón que pudiese haber quedado sin gelatinizar durante el horneado del pan.

4.7. Miga de pan de muerto desengrasada (MPSD)

4.7.1. mDSC

La Figura 20 muestra el termograma de miga de pan de muerto fresco sin grasa, es decir, material al que se le extrajo la materia grasa mediante el método Soxhlet con éter etílico el mismo día de la preparación. Es notable la desaparición de las transiciones endotérmicas inferiores a 70 °C que se observan en la Figura 19 para la miga con materia grasa.

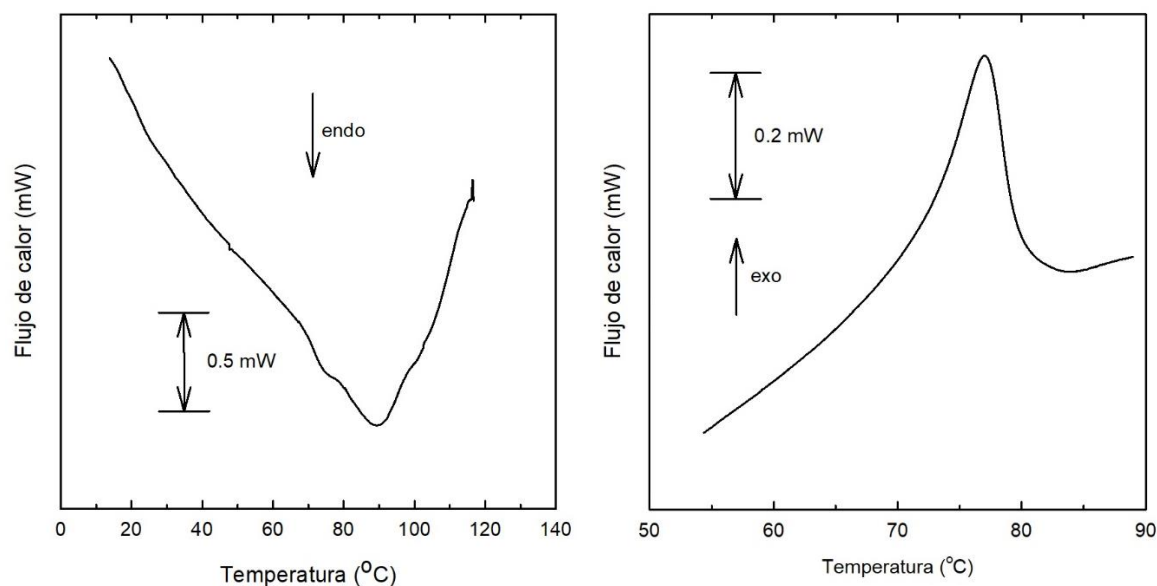


Figura 20. Termograma de pan de muerto desengrasado con transiciones en calentamiento (izquierda) y enfriamiento (derecha).

La única transición que se conserva es la atribuida al complejo amilosa-lípido que inicia en 78.6 °C, tiene su pico en 89.3 °C y concluye en 99.14 °C. Estas temperaturas son muy cercanas a las de la transición observada en la Figura 18; 80.08, 92.5, 101.28 °C. De hecho, el flujo de calor de ambas señales es aproximadamente 0.2 mW. Esto muestra, que el complejo amilosa-lípido fue suficientemente estable y pudo resistir el tratamiento de extracción con disolvente. La presencia de una transición exotérmica ocurrida en el enfriamiento, Figura 20, corrobora esta afirmación. Como en el caso de la miga sin desengrasar, esta transición ocurrió en 80.7, 77.03, 70.93 °C, que son temperaturas muy cercanas a 83.5, 80.14 y 73.08 °C mostradas en la Figura 19 para la miga con grasa. La mDSC mostró también ser una técnica muy útil en el análisis de la miga. La Figura 21 muestra las transiciones de la miga de pan de muerto desengrasado con ocho días de almacenamiento a temperatura ambiente.

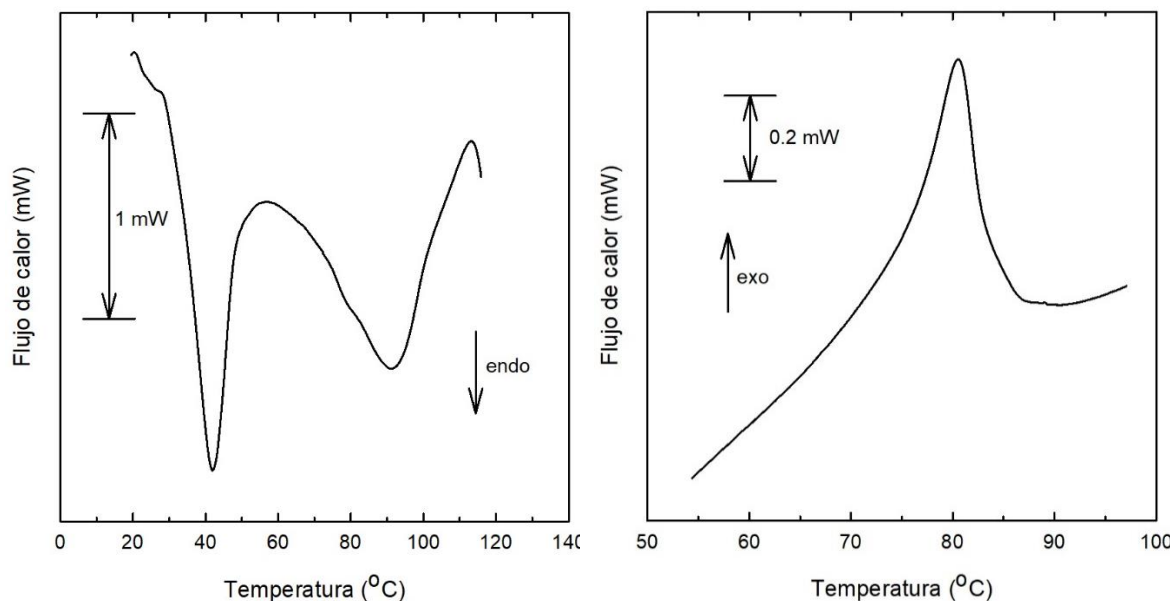


Figura 21. Termograma de pan de muerto desengrasado con ocho días de almacenamiento; transiciones en calentamiento (izquierda) y enfriamiento (derecha).

Las transiciones endotérmicas se atribuyen a la fusión de cristales de amilopectina y al complejo amilosa-lípido. La primera ocurrió en 27.85, 41.87, 49.78 °C y la segunda en 81.19, 91.26, 100.93 °C. Esta segunda transición apareció consistentemente en la miga de pan de muerto sometida o no a la extracción Soxhlet. Es claro que la transición endotérmica que ocurrió a bajas temperaturas, y que no se observa en la miga de pan fresco desengrasada (Figura 19), pero sí en la de pan fresco con materia grasa, Figura 18, reapareció con el envejecimiento de la miga. Por ello, es que se la atribuye a la fusión de cristalitas de amilopectina.

Por otro lado, la Figura 20 también muestra la transición exotérmica atribuida a la recristalización de la amilosa en complejo con los lípidos que no fueron extraídos por el tratamiento Soxhlet debido a su asociación con la macromolécula. La transición ocurrió en 84.63, 80.55, 71.70 °C. Estas señales muestran claramente el efecto del envejecimiento producto de la retrogradación del almidón presente en la miga y muestran la presencia de cristales o cristalitas.

4.7.2. Difracción de rayos X

La Figura 22 muestra el difractograma de la miga de pan de muerto desengrasada en el día en que se preparó la cual se consideró el día cero (D0) y después de ocho días de almacenamiento a temperatura ambiente (D8).

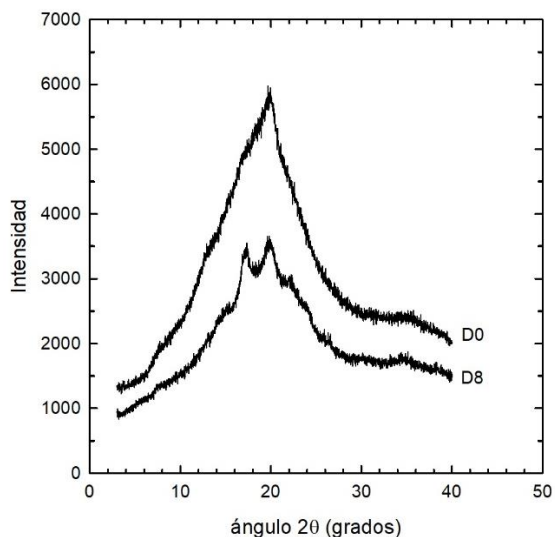


Figura 22. Diffractograma de miga de pan de muerto desengrasado con cero y ocho días de almacenamiento.

En D0 no se observa presencia de cristalinidad, aunque el máximo de intensidad ocurre aproximadamente a 20°. Este máximo podría estar asociado con la formación del complejo amilosa-lípido y quizá no fue posible detectar su presencia el mismo día de elaboración del pan. En D8 se observan los picos a 17.3 y 19.9°. El primer pico puede atribuirse a la presencia de cristalitos de amilopectina característicos del almidón tipo A de los cereales que contienen amilosa en concentraciones aproximadas de 27 % como es el caso del almidón de trigo. El segundo pico es característico del almidón tipo B y es característico de complejos helicoidales de amilosa (Zobel, 1988). Estos resultados son consistentes con los de mDSC mostrados en la Figura 20 y muestran cómo la evolución del pan conduce a la aparición de cristalinidad en la miga.

4.8. Nanocristales de almidón de la MPSD a 30 °C

A partir de los datos obtenidos para el ATC y la HTD se realizó el experimento para obtener NCA de la MPSD a 30 °C. Sin embargo, en ninguna de las repeticiones

realizadas se obtuvo un residuo al término de la hidrólisis ácida por lo que se aumentó la temperatura a 40 °C (Angellier *et al.*, 2004).

4.9. Nanocristales de almidón de la MPSD a 40 °C

Al aumentar la temperatura de la hidrólisis ácida de la MPSD se obtuvo un residuo negro con el cual se siguió el procedimiento mencionado en la metodología para la obtención de NCA. Sin embargo, al liofilizar la preparación para obtener el polvo final se obtuvo un sólido con características diferentes a los obtenidos a partir de ATC y HTD. Este sólido presentó una apariencia y textura fibrosa en lugar de granulada por lo que no fue posible realizar un estudio de rayos X.

4.9.1. TEM

La Figura 23 muestra la TEM del sólido obtenido.

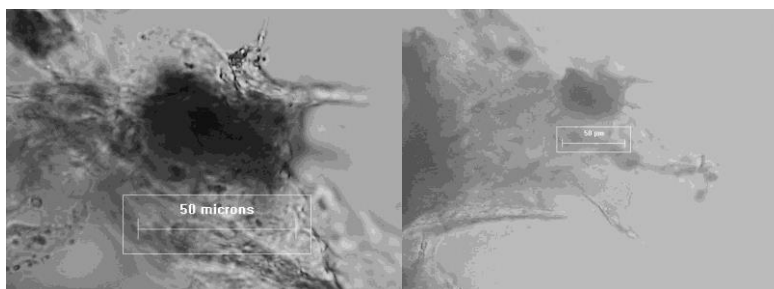


Figura 23. Imágenes de TEM de NCA obtenidos de MPSD con diferentes ampliaciones. Objetivo 100X con barra de escala de 50 nm (izquierda) y objetivo 40X con barra de escala de 50| μm (derecha).

4.9.2. mDSC

Los resultados de mDSC para los NCA de la MPSD se muestran en la Figura 24 y los intervalos de temperatura de esta transición se encuentran en la Tabla 4.

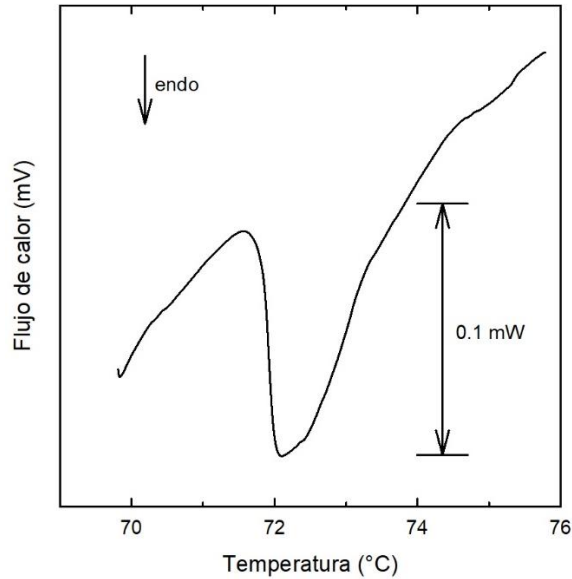


Figura 24. Termograma de fusión de NCA obtenidos de MPD.

La fusión mostrada es un proceso endotérmico que ocurre a una temperatura mayor que la obtenida para los NCA de HTD y ATC. De acuerdo con Kim *et al.*, (2012) este comportamiento se atribuye al método utilizado, ya que con la hidrólisis ácida de almidón la transición se desplaza hacia una mayor temperatura que con otros métodos. Se puede observar que la entalpía es considerablemente menor que las reportadas en las secciones anteriores para los NCA de HTD y ATC. Esto posiblemente se debe a la textura fibrosa del sólido analizado debido a que los NCA se pueden encontrar embebidos en dicha estructura impidiendo su completa fusión. También es necesario señalar que existe la posibilidad de que la presencia de NCA no sea suficiente para cuantificarlos por este método a causa de la sensibilidad del instrumento utilizado.

Tabla 4. Termograma de fusión de NCA obtenidos de MPSD.

T_0 (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	Entalpía, ΔH (J/g)
71.83	72.10	73.43	0.02

Una posible hipótesis acerca de la no obtención de NCA a partir de MPSD es que la red de proteínas provenientes del pan, gluten, que es la principal diferencia en la composición del ATC, la HTD y la MPSD, interfiere con la hidrólisis ácida de la estructura sensible del almidón y forma la apariencia fibrosa misma que impide la penetración necesaria del ácido en la estructura del almidón para obtener finalmente los NCA.

Las proteínas del gluten al estar en contacto con H_2SO_4 3.15 mol/L a 40 °C durante cinco días pueden perder su estructura de red y reaccionar con los hidratos de carbono presentes en la miga de pan, principalmente glucosa, para dar lugar a reacciones de oscurecimiento no enzimático (ONE) como Maillard, las cuales si bien ya están presentes debido al proceso de cocción del pan y que además no son principalmente favorables en medio ácido, pueden ocurrir a lo largo del proceso de hidrólisis ácida. Estos compuestos son los principales causantes del color negro de la reacción al término de esta y también son un factor que puede impedir la disposición de los NCA para su posterior análisis. Además de las reacciones de ONE puede existir el rompimiento de las estructuras de las proteínas a su polímero más simple y las reacciones de entrecruzamiento entre ellos. Las principales proteínas presentes en la miga de pan son gluteína, glutenina, además de aminoácidos como lisina proveniente de la leche y el huevo. Estas proteínas forman polímeros que posiblemente son parte de la estructura fibrosa del sólido obtenido. Por las causas anteriormente mencionadas, la estructura del sólido obtenido donde se presume la existencia de NCA no se pudo analizar por la técnica de DRX. Esta prueba resulta especialmente precisa para confirmar la presencia de NCA ya que se tienen plenamente identificados los picos de los cristales tipo A que se espera encontrar cuando estos están presentes, a diferencia de la mDSC en la cual las variaciones de entalpías e intervalos de transición de estado se puede asociar con diferentes factores como la preparación y naturaleza de la muestra, y la sensibilidad

de la técnica. Por otro lado, la técnica TEM no puede asegurar la presencia de NCA ya que depende en gran medida de la experiencia que se tenga para identificar los NCA. Además, en el caso de los NCA, se obtienen cantidades muy pequeñas (< 70 mg) y de toda esa masa no todo son NCA. No resulta entonces factible examinar suficientes campos para encontrar asertivamente los NCA de almidón. Debido a ello, no se puede asegurar que a 40 °C la reacción de extracción de NCA provenientes de MPSD sea efectiva o más adecuada que la de 30 °C. Sin embargo, presuntamente las técnicas TEM y mDSC permiten observar la presencia de NCA de MPSD.

5. CONCLUSIONES

Es necesario considerar la composición de una matriz, con una importante fuente de almidón, para obtener NCA a partir de su hidrólisis ácida. Los componentes de esta matriz influyen en la eficiencia de separación del proceso y la obtención del producto deseado.

Cuando se utiliza una matriz compleja como fuente de NCA los componentes adicionales (en el caso de este estudio, las proteínas), pueden impedir la penetración del ácido en la estructura del almidón y la extracción de NCA.

A través de la técnica de hidrólisis ácida, reportada en la literatura, para la obtención de NCA no fue posible obtenerlos a partir de la matriz de mayor complejidad analizada en este trabajo. Este no fue el caso con matrices menos complejas como almidón y harina de trigo.

6. RECOMENDACIONES

Se debe buscar un método que permita extraer las proteínas de la miga de pan de muerto, antes de proceder a la obtención de NCA sin afectar directamente la estructura del almidón para que después se someta al tratamiento ácido y se obtengan NCA. Es posible que un método enzimático pudiese permitir obtener los NCA. Una posibilidad para promover la formación de NCA, es sembrar el medio con NCA previamente obtenidos y purificados. Sin embargo, al tenerse en una cantidad limitada en la disolución del tratamiento ácido de la MPM, y contener redes de proteínas que interfieren con la extracción de NCA, primero se debe encontrar un método eficaz de lavado y purificación de la mezcla.

Otra posibilidad es eliminar las proteínas del gluten en la miga, mediante su hidrólisis enzimática, separación y posterior hidrólisis ácida de la matriz resultante para obtener los NCA.

7. REFERENCIAS

- Angellier, H., Choisnard, L., Molina-Boisseau, S., Ozil, P., y Dufresne, A. (2004). Optimization of the Preparation of Aqueous Suspensions of Waxy Maize Starch Nanocrystals Using a Response Surface Methodology. *Biomacromolecules*, 5(4), 1545-1551.
- Buléon, A. G. (1997). Starches from A to C1. *Plant Physiology*, 115, 949-957.
- CANIMOLT. (31 de Enero de 2005). *Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo*. Obtenido de <http://www.canimolt.org/trigo/estructura-del-grano>
- Dufresne, A., Cavailé, J.Y., y Helbert, W. (1996). New nanocomposite materials: Microcrystalline starch reinforced thermoplastic. *Macromolecules* 29, 7624-7626.
- Eerlingen, R., y Delcour, J. (1995). Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*, v. 22, n. 2, p. 129-138.
- Eliasson, A. C., y Gudmundsson, M. (1996). Starch: physicochemical and functional aspects. En *Carbohydrates in food* (págs. 431-503). .
- Gallant, D., Bouchet, B., y Baldwin, P. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32, 177-191.
- Garzaro Aparicio, M. (2015). *Síntesis de nanocristales*. México.
- Guan, J., y Hanna , A. (2004). Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch. *Biomacromolecules*, v. 5, 2329-2339.
- Hernández Rodríguez, M., y Sastre Gallego , A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid: Díaz de Santos.
- Juárez, Z., Bárcenas Pozos, M., y Hernández, L. (2014). El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 79-93.
- Kent, N. (1987). *Tecnología de cereales*. Zaragoza: Acribia.
- Kim, H., Lee, J., Lim, W., y Lim, S. (2012). Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch/Stärke*, 64, 367-373.
- Kim, H., Park, S., y Lim, S. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.
- Knutzon, C., y Grove , M. (1994). Rapid method for estimation of amilose in maize starches. *Cereal chemistry*, v. 71, n. 5, p. 469.
- Le Corre, D., Bras, J., y Dufrense, A. (2010). Starch nanoparticles: a review. *Biomacromolecules*(11), 1139-1153.
- Le Corre, D., Bras, J., y Dufrense, A. (2011). Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. *Journal of Nanoparticles Research* 13, 7193-7208.

- Le Corre, D., Vahanian, E., Dufresne, A., y Bras, J. (2012). Enzymatic pretreatment. *Biomacromolecules*, 13, 132-137.
- Le Corre, D., Bras, J., y Dufresne, A. (2012b). Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. *Carbohydrate Polymers* 87, 658-666.
- Martínez Guerra, J. J. (2014). *Libro electrónico de bioquímica*. Aguascalientes: Universidad de Aguascalientes.
- Mestres, C., Colonna, P., y Buleon, A. (1988). Gelation and crystallisation of maize starch after pasting, drum-dyeing and extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 7, 123-134.
- Montoya López, J., Giraldo Giraldo, G., y Lucas Aguirre, J. (2012). Caracterización física de la harina de trigo y pan mediante determinación de calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. *Vitae*, 19(1), S417-S419.
- Pei, C., Xingxun, L., Xiao, Z., Parveen, S., y Long, Y. (2015). Phase transition of waxy and normal wheat starch granules during gelatinization. *International Journal of Polymer Science* Volume 2015, Article ID 397128, pág. 7. Configuración del empaquetamiento de dobles hélices para los tipos cristalinos A y B del almidón (Le Corre et al., 2010).
- Putaux, J.L., Molina-Boisseau, S., Momaur, T., y Dufresne, A. (2003). Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. *Biomacromolecules* 4, 1198-1202.
- Zhao, J., y Wistler, R. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. *Food Technology*, v. 48 n. 7, p. 104-105.
- Zobel, H.F. (1986). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Stärke* 40(2), 1-7.
- Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, v. 40, n. 2, p. 41-50.