



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE  
DESTRUCCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE PAN  
DE TRADICIÓN Y DEL PAPEL DE SUS  
INGREDIENTES SOBRE SU EVOLUCIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

**ALAINE JAEL AMADOR LÓPEZ**

DIRECTOR DE TESIS

**ALBERTO TECANTE CORONEL**



**Ciudad.Universitaria, Cd. Mx. 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Profesor: **Alberto Tecante Coronel**

**VOCAL:** Profesor: **Julieta Bertha Sandoval Guillén**

**SECRETARIO:** Profesor: **Tania Gómez Sierra**

**1er. SUPLENTE:** Profesor: **Roeb García Arrazola**

**2° SUPLENTE:** Profesor: **Mariana Ramírez Gilly**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 313, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA. CIUDAD UNIVERSITARIA. 04510, CDMX, MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

**DR. ALBERTO TECANTE CORONEL** \_\_\_\_\_

SUPERVISOR TÉCNICO:

**I.A. MARIANA RAMÍREZ GILLY** \_\_\_\_\_

SUSTENTANTE (S):

**ALAINÉ JAEL AMADOR LÓPEZ** \_\_\_\_\_

## ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1. ASPECTOS GENERALES.....	11
1.1. Pan tradicional.....	11
1.2. Componentes principales del sistema.....	12
1.2.1. Almidón.....	12
1.2.1.1. Propiedades.....	15
1.2.2. Gluten.....	19
1.2.3. Lípidos.....	21
1.3. Envejecimiento del pan.....	21
1.3.1. Transformación del almidón.....	22
1.3.2. Interacción almidón-gluten.....	23
1.3.3. Redistribución de humedad.....	23
1.4. Métodos y técnicas empleadas en el estudio de Pan de Muerto.....	25
1.4.1. Estudio de la retrogradación del almidón.....	25
1.4.1.1. Difracción de rayos-X de polvos.....	25
1.4.1.2. Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC).....	27
1.4.1.3. Determinación calorimétrica de complejación con yodo.....	27
1.4.1.4. Medición de la resistencia del almidón a la hidrólisis enzimática.....	28
1.4.2. Estudio del gluten.....	28
1.4.2.1. Cizalla oscilatoria de baja amplitud.....	28
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1. Hipótesis.....	30
2.2. Objetivos.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Desarrollo experimental.....	31
3.2. Materiales.....	31
3.3. Procedimientos.....	32
3.3.1. Separación de las fracciones de almidón y proteína.....	32
3.3.2. Entrecruzamiento de la miga sin almidón con glutaraldehído.....	32

3.3.2.1. Cizalla oscilatoria de baja amplitud .....	32
3.3.3. Disolución de almidón con KOH .....	33
3.3.4. Evaluación enzimática del grado de retrogradación del almidón .....	33
3.3.5. Microcalorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC).....	37
3.3.6. Difracción de Rayos X de polvos .....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
4.1. Separación de almidón y la proteína de la miga liofilizada de pan .....	38
4.1.1. Efecto de la adición de un agente entrecruzante en miga sin almidón	44
4.1.2. Efecto del tiempo de reacción con glutaraldehído .....	46
4.1.3. Efecto de la concentración de glutaraldehído.....	47
4.2. Estudio de los cambios en las moléculas de almidón .....	48
4.2.1. Por su disolución en KOH.....	48
4.2.1. Por su hidrólisis enzimática .....	50
4.2.1.1. Análisis térmico de la miga liofilizada .....	50
4.2.1.2. Difractogramas de la miga liofilizada, día 0 (Mq0) y día 8 (Mq8) ....	53
4.2.1.3. Grado de retrogradación (DG).....	55
CONCLUSIONES .....	57
REFERENCIAS .....	58
ANEXO .....	62
Análisis estadístico .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los niveles estructurales del gránulo de almidón (Buléon et al., 1998).	13
Figura 2. Estructura de los cristales tipo-A y tipo-B (Biliaderis, 1991).	14
Figura 3. Clasificación de las subunidades de gliadina y glutenina en la harina de trigo (Lindsay & Skerritt, 1999).	20
Figura 4. Modelo del envejecimiento del pan basado en los cambios de la fracción de almidón: A, miga de pan fresco, B, miga de pan envejecido (Hug-Iten et al., 2003).	25
Figura 5. Patrones de difracción de rayos-X de almidones tipo -A, -B-, y -V (Buléon et al., 1998).	26
Figura 6. Diagrama general del proceso experimental.	31
Figura 7. a) Prueba de yodo, se identifica la presencia de almidón en el extracto b) cristales del almidón extraído observados a 40X en microscopio óptico.	38
Figura 8. Termograma del almidón extraído con DMSO obtenido por $\mu$ DSC en función de la temperatura en el ciclo de enfriamiento.	40
Figura 9. Almidón después de la prueba en microcalorimetría.	40
Figura 10. Difractograma del almidón extraído de la miga. Los ángulos de difracción en los cuales aparecen los picos ( $7.5^\circ$ , $13^\circ$ y $20^\circ$ ) son característicos del complejo V-amilosa (Buléon et al., 1998).	42
Figura 11. a) Prueba de yodo en la que apenas es detectable la presencia de almidón en la miga sin almidón y b) Micrografía a 100X de la miga sin almidón donde se señala con flechas blancas lo que quizá sean restos de almidón.	43

Figura 12. Termograma de la miga sin almidón con un ciclo de calentamiento (arriba) y enfriamiento (abajo).	<b>44</b>
Figura 13. Termograma de la miga sin almidón. Los insertos amplían las señales de los ciclos de calentamiento (arriba) y enfriamiento (abajo).	<b>44</b>
Figura 14. Barrido de frecuencia de miga de pan sin almidón tratada con glutaraldehído (CG) y miga de pan sin almidón sin tratamiento (SG).	<b>46</b>
Figura 15. Barrido de frecuencia para miga de pan sin almidón tratada con glutaraldehído por 4 horas (4h) y 1 hora (1h) y miga de pan sin almidón sin tratamiento (control).	<b>47</b>
Figura 16. Barrido de frecuencia para miga de pan sin almidón tratada con 1000 ppm (estrellas) y 2000 ppm (triángulos invertidos) de glutaraldehído por dos horas y miga de pan sin almidón y sin tratamiento (control; diamantes). $G'$ (símbolos llenos), $G''$ (símbolos vacíos).	<b>48</b>
Figura 17. Espectros de absorción para la disolución de almidón soluble, amilosa, con KOH 0.2 mol/L en miga liofilizada almacenada 0, 1 y 3 días.	<b>49</b>
Figura 18. Espectros de absorción para la disolución de almidón insoluble con KOH 2.0 mol/L en miga liofilizada almacenada 0, 1 y 3 días.	<b>50</b>
Figura 19. Difractograma de la miga liofilizada Mq0.	<b>54</b>
Figura 20. Difractograma de la miga liofilizada Mq8.	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de las fracciones a, b y c para medir el grado de retrogradación del almidón .....	<b>36</b>
Tabla 2. Valores obtenidos para la curva de enfriamiento de dos ciclos en $\mu$ DSC para el almidón extraído. ....	<b>40</b>
Tabla 3. Temperaturas de transición de los termogramas de las Figuras 13 y 14. ....	<b>44</b>
Tabla 4. Resultados de $\mu$ DSC para el ciclo de calentamiento.....	<b>52</b>
Tabla 5. Resultados de $\mu$ DSC para el ciclo de enfriamiento. ....	<b>52</b>
Tabla 6. Porcentajes de cristalinidad de los picos obtenidos para cada miga. ....	<b>55</b>
Tabla A.1 Análisis estadístico para las absorbancias a 600 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento disueltas en KOH 0.2 mol/L.....	<b>62</b>
Tabla A.2. Análisis de diferencia mínima significativa para las absorbancias obtenidas a 600 nm de migas liofilizadas almacenadas a diferentes días (Día 0-D0-, Día 1 -D1- y D3 -D3-) disueltas en KOH 0.2 M. ....	<b>62</b>
Tabla A.3. Análisis estadístico para las absorbancias a 600 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento disueltas en KOH 2.0 mol/L.....	<b>62</b>
Tabla A.4. Análisis estadístico para las absorbancias a 550 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento en KOH 2.0 mol/L. ....	<b>63</b>
Tabla A.5. Análisis estadístico para el DG% de las migas a los días 0 y 8 de almacenamiento. ....	<b>63</b>

## NOMENCLATURA

Símbolo	Nombre	Unidades
DG	Grado de retrogradación	
G'	Módulo de almacenamiento	Pa
G''	Módulo de pérdida	Pa
T <sub>p</sub>	Temperatura pico	°C
T <sub>o</sub>	Temperatura inicio	°C
T <sub>c</sub>	Temperatura de conclusión	°C
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea	°C
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión	°C
ΔH	Entalpía de fusión	J/g
ω	Frecuencia angular	rad/s

## RESUMEN

Este estudio se realizó en miga de pan liofilizada y desgrasada proveniente de un tipo de pan de tradición mexicano conocido como Pan de Muerto. El objetivo consistió en evaluar metodologías de destrucción de la estructura de la miga que faciliten el estudio de la evolución de sus componentes por efecto del tiempo. Para ello se separó el almidón de la proteína de trigo y se estudió 1) el efecto de un agente entrecruzante, glutaraldehído, sobre las fibras desnaturalizadas en pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud y 2) el estado del almidón separado de la miga empleando microcalorimetría de barrido diferencial y rayos X. Para evaluar los cambios ocurridos en el almidón a diferentes días de almacenamiento se propuso un método colorimétrico y un método enzimático. Este último complementado con microcalorimetría de barrido diferencial y rayos X.

La adición de glutaraldehído contribuyó al carácter elástico de la miga sin almidón debido a la formación de una estructura de red tridimensional entre los grupos amino y el agente entrecruzante. La formación de la estructura requirió cierto tiempo de reacción que disminuyó al aumentar la concentración del glutaraldehído. El almidón separado de la miga presentó una estructura de gel de acuerdo con la señal reversible observada en la curva de enfriamiento de los termogramas obtenidos por microcalorimetría, el patrón de rayos X para este material indicó la presencia de complejos tipo-V. El estudio de los cambios en la molécula de almidón por el método colorimétrico requirió de la disolución de almidón en KOH 0.2 y 2.0 mol/L; el primero para el almidón soluble y el segundo para el almidón insoluble. Los espectros de absorción de las migas para diferentes días de almacenamiento no condujeron a resultados concluyentes con respecto a las modificaciones en las estructuras del almidón por efecto del tiempo. En cambio el método enzimático proporcionó un porcentaje de retrogradación que complementado con microcalorimetría de barrido diferencial y rayos X, permitió diferenciar entre las muestras almacenadas a diferentes días.

## ABSTRACT

This study was carried out in freeze-dried bread crumbs from a type of bread traditionally known as Pan de Muerto. The objective was to evaluate methodologies for destroying the structure of the crumb to facilitate the study of the evolution of its components by time effect. To this end, the starch was separated from the wheat protein, and we investigated 1) the effect of a crosslinking agent, glutaraldehyde, on denatured fibers in small amplitude oscillatory shear tests and 2) the state of the starch separated from the crumb using differential scanning microcalorimetry and X-ray diffraction. A colorimetric and an enzymatic method were proposed to evaluate the changes occurred in the starch during different days of storage. The enzymatic process was complemented with differential scanning microcalorimetry and X-rays.

The addition of glutaraldehyde contributed to the elastic character of the starch-free crumb due to the formation of a three-dimensional network structure between the amino groups and the crosslinking agent. Formation of the structure required some reaction time which decreased with increasing concentration of glutaraldehyde. The starch separated from the crumb forms a gel according to the exotherm peak observed during the differential scanning microcalorimetry cooling, the X-ray pattern of this material indicated the presence of V-type complexes. The study of the changes in the starch molecule by the colorimetric method required the dissolution of starch in 0.2 and 2.0 mol/L KOH; the first for soluble starch and the second for insoluble starch. The absorption spectra of the crumbs for different days of storage did not lead to conclusive results regarding the modifications in the structures of the starch by time effect. In contrast, the enzymatic method provided a percentage of retrogradation that complemented with differential scanning microcalorimetry and X-ray diffraction, allowed to differentiate between samples stored along different days.

## INTRODUCCIÓN

El pan de tradición es un alimento muy importante en la cultura mexicana. Con el tiempo el pan pierde su frescura y sus propiedades iniciales se deterioran, e.g, suavidad de la miga, firmeza de la corteza y sabores. La retrogradación del almidón se relaciona directamente con el envejecimiento del pan y aunque el mecanismo de retrogradación no está bien establecido, las causas más importantes para esta alteración son la transformación del almidón de un estado desordenado a uno más ordenado, las interacciones gluten-almidón y la redistribución de la humedad (Fadda et al., 2014). El pan se considera una matriz compleja debido a los cambios que ocurren desde la formación de la masa hasta su horneado y más adelante durante el almacenamiento debido al número, naturaleza e interacciones de los componentes que lo forman. La estructura resultante dificulta la separación de sus macromoléculas para efecto de su estudio, y dada la importancia de conocer el cambio en las moléculas se debe limitar la interferencia de otros componentes implementando metodologías de separación. El conocimiento que contribuya a la comprensión de su compleja matriz y el factor tiempo en las estructuras de las moléculas que la conforman resulta de vital importancia para diseñar mecanismos que le otorguen mayor vida útil conservando la mayor parte de las propiedades sensoriales que lo hacen atractivo para los consumidores.

# 1. ASPECTOS GENERALES

## 1.1. Pan tradicional

El pan es una espuma sólida, elástica e inestable. La parte sólida contiene una fase continua compuesta en parte de una red elástica de moléculas de gluten entrecruzadas y en parte de moléculas lixiviadas de almidón, esencialmente de amilosa, tanto como complejada como no complejada con moléculas polares de lípidos y una fase discontinua de gránulos de almidón atrapados, gelatinizados, hinchados y deformados (Gray & BeMiller, 2003).

El pan está compuesto de la corteza, la cáscara externa del pan, y la miga. Los alvéolos de la miga del pan están formados por geles inter-dispersos ricos en polímeros y redes interconectadas de películas, láminas, con compuestos de baja masa molar principalmente . La movilidad molecular afecta la velocidad de difusión de las sustancias a través de las estructuras semisólidas, gel, hacia la película líquida, lámina, y los espacios intersticiales o hacia las estructuras de gel colindantes (Rayas-Duarte, 2012).

Durante todos los pasos de la elaboración de pan, ocurren complejas transformaciones químicas, bioquímicas y físicas, las cuales afectan y son afectadas por los diversos constituyentes de la harina (Goesaert et al., 2005). Debido a su estado dinámico de no equilibrio, los cambios en las características físicas y organolépticas del pan comienzan inmediatamente después de salir del horno durante el período de enfriamiento y almacenamiento (Rayas-Duarte, 2012). Durante el almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura y envejece. El proceso de envejecimiento comprende varios aspectos: la corteza se endurece, la miga se torna más firme y menos elástica y la pérdida de humedad y sabor. Para entender el mecanismo de envejecimiento del pan, es importante comprender la naturaleza de los componentes principales que integran el sistema (Gray & BeMiller, 2003).

## 1.2. Componentes principales del sistema

En la elaboración de pan de trigo, la harina, el agua, la sal, la levadura y otros microorganismos, con frecuencia con la adición de ingredientes no indispensables tales como grasa y azúcar, se mezclan hasta formar una masa viscoelástica, la cual es fermentada y horneada. La harina de trigo es el ingrediente principal y consiste principalmente de almidón, 70-75 %, agua, 14 %, y proteínas, 10-12 %. Además, polisacáridos no amiláceos, 2-3 %, en particular arabinoxilanos, y lípidos, 2 %, son compuestos contenidos en menor cantidad relevantes para la producción y calidad del pan (Goesaert et al., 2005).

### 1.2.1. Almidón

El almidón está compuesto de dos polisacáridos, amilosa y amilopectina. La amilopectina es una macromolécula altamente ramificada compuesta de cadenas  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-6), del 5-6 % de enlaces (Buléon et al., 2007). Las cadenas poli- $\alpha$ -1,4 glucopiranososa de la molécula de amilopectina con frecuencia se clasifican dentro de tres diferentes cadenas: A, B y C. Por cada molécula de amilopectina, existe solo una cadena C, que hace de columna de la molécula y contiene el único extremo reductor. A la cadena C están conectadas las cadenas B por enlaces  $\alpha$ (1-6). Las cadenas B se clasifican en cortas y largas. Las cadenas B forman el enlace entre las cadenas A y C (Ottenhof & Farhat, 2004).

La amilosa es definida como una molécula principalmente lineal de unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4) con menos de 1% de ramificaciones (1-6) (Buléon et al., 2007).

En los tejidos vegetales el almidón está presente en forma de gránulos insolubles en agua. Los gránulos contienen regiones ordenadas, que son semicristalinas, y muestran birrefringencia (Keetels et al., 1996). Los gránulos pueden ser examinados en al menos cinco niveles de estructura, variando en escala de nanómetro a micrómetro, Figura 1. La escala más grande es el gránulo intacto, el cual varía de tamaño desde 1 a 100  $\mu$ m. A un nivel inferior de esta escala macroestructural se encuentran los anillos de crecimiento alternados: semicristalinos y amorfos. Se ha propuesto que los anillos de crecimiento

semicristalinos disminuyen su espesor de 450 a 550 nm, para aquellos cercanos al centro, de 80 a 160 nm para los anillos cerca de la periferia. Los anillos de crecimiento amorfo parecen ser de anchura uniforme y mucho más delgados, 60 a 80 nm, que los anillos de crecimiento semicristalinos (Wang et al., 2015). El siguiente nivel inferior son los elementos estructurales, “blocklets”, los cuales se ha planteado varían en tamaño de 20 a 500 nm. Se ha sugerido que los “blocklets” pequeños, 20 nm, están localizados principalmente en los anillos de crecimiento, y “blocklets” grandes, 50 a 500 nm, en anillos de crecimiento semicristalinos. A una escala más pequeña que los “blocklets” se encuentran las superhélices, con un espesor propuesto de 18 nm aproximadamente y un paso de 10 nm por vuelta de hélice basado en experimentos de tomografía óptica electrónica y difracción crio-electrónica. Los elementos estructurales por debajo de las superhélices son laminillas cristalinas y amorfas con una periodicidad de 9 nm. La unidad más pequeña de la organización estructural del almidón es la unidad de glucosa; 0.3 a 0.5 nm (Wang et al., 2015).

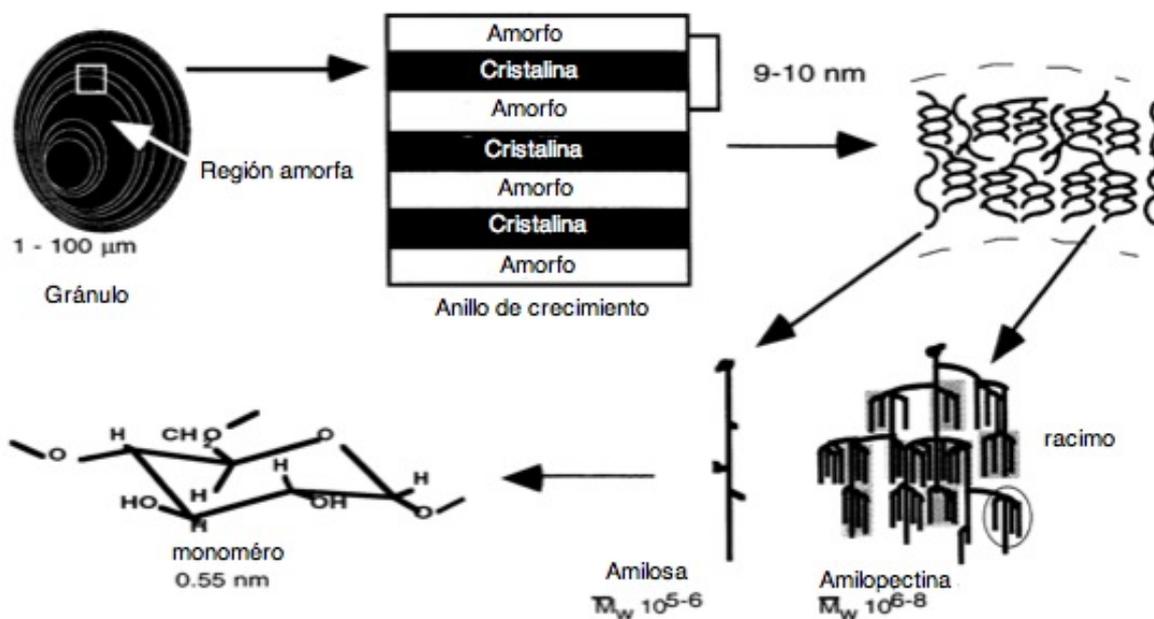


Figura 1. Representación esquemática de los niveles estructurales del gránulo de almidón (Buléon et al., 1998).

Existen dos tipos diferentes de cristales que pueden formarse cuando la amilosa y las dobles hélices de amilopectina se agregan juntas. Estos son conocidos como cristales polimorfos tipo A y B. Las diferencias clave entre estos dos son la forma

en que se arreglan juntas sus dobles hélices, y la cantidad de agua que contienen dentro de los cristales. El modelo reciente más aceptado propone que las dos celdillas unitarias contienen dobles hélices paralelas enrolladas hacia la izquierda compuestas de doce unidades de glucosa. Sin embargo, el cristal tipo-A está arreglado en una celdilla unitaria monoclinica que contiene cuatro moléculas de agua y el cristal tipo-B está arreglado en una celdilla unitaria hexagonal que contiene treinta y seis moléculas de agua, Figura 2 (Ottenhof & Farhat, 2004).

El gránulo de almidón nativo exhibe dos tipos principales de diagramas de difracción en rayos-X; el tipo A para almidones de cereales y el tipo B para tubérculos y almidones ricos en amilosa. Otro tipo de diagramas de difracción han mostrado ser una mezcla del tipo A y B, característicos de los almidones de legumbres, y también de cereales en crecimiento en condiciones específicas de temperatura e hidratación (Buléon et al., 1998). La forma cristalina tipo-V es formada por la complejación de la amilosa con moléculas pequeñas tales como lípidos, alcoholes, ó sabores presentes durante los tratamientos térmicos del almidón (Buléon et al., 2007).

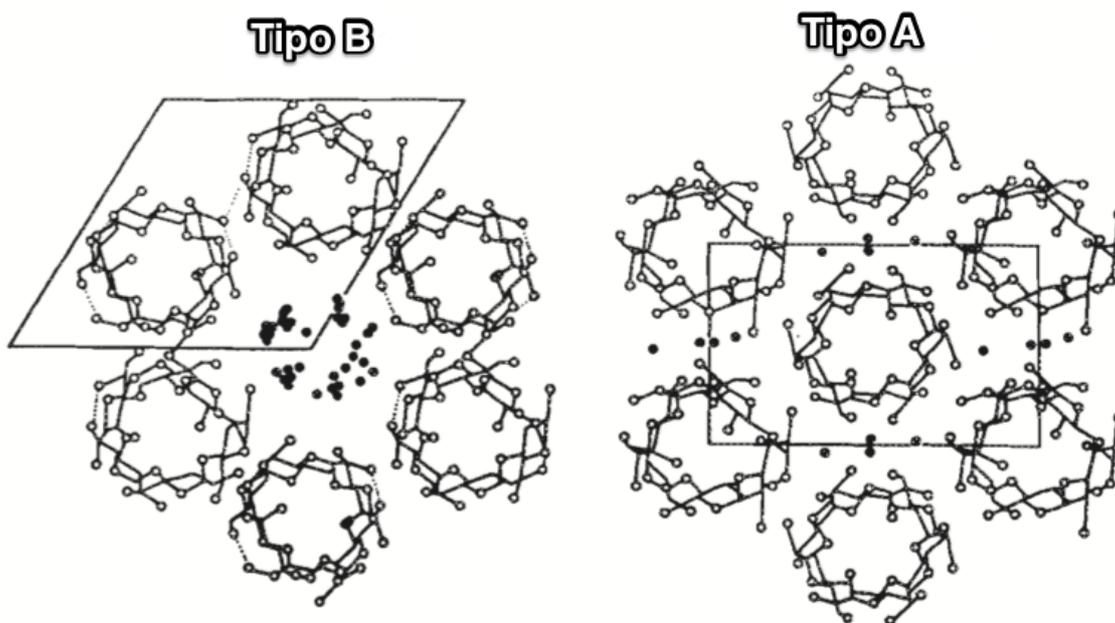


Figura 2. Estructura de los cristales tipo-A y tipo-B (Biliaderis, 1991).

### **1.2.1.1. Propiedades**

#### **Gelatinización**

Cuando los gránulos de almidón son calentados en agua a temperaturas progresivamente más altas, se alcanza un punto en el que el hinchamiento se vuelve irreversible y el orden estructural desaparece, como lo indica la pérdida de patrones de difracción de rayos-X y birrefringencia. Mientras la expansión de los gránulos continúa, la amilosa se lixivia a la fase acuosa intergranular. Estos procesos resultan en el incremento de la viscosidad. En conjunto, la ruptura de la estructura del gránulo, el hinchamiento e hidratación, y la disolución de las moléculas de almidón describen colectivamente el término gelatinización (Biliaderis, 1991). Otros cambios estructurales que toman lugar durante la gelatinización incluyen la fusión simultánea de cristales y desenrollamiento de dobles hélices, adsorción de agua por los anillos amorfos de crecimiento y dispersión de estructuras tipo blocklet (Vermeulen et al., 2006).

En el pan la gelatinización ocurre a diferentes velocidades, dependiendo de la ubicación, y es más lenta en el centro de la miga. Debido a la diferencia en el contenido de agua la gelatinización difiere entre la corteza y la miga y puede que la gelatinización en la corteza no sea completa debido a la deshidratación. Sin embargo, puede ocurrir la fusión de los cristales de almidón, resultando en propiedades de corteza muy diferentes dependiendo de las condiciones exactas como receta, contenido de agua, temperatura y velocidad del aire. También se han observado gránulos intactos en la corteza. Los rayos-X muestran cristalinidad en la corteza, correspondiente a patrones tipo A, mientras que la miga muestra patrones tipo-V. Termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) indican la gelatinización completa de la miga, pero incompleta de la corteza. Durante el calentamiento la amilosa lixivia de los gránulos, pero se concentra también en su centro. La distribución de la amilosa entre el interior y el exterior de los gránulos depende de las condiciones durante el calentamiento. Por ejemplo, el tiempo de calentamiento después de alcanzada la temperatura inicial de gelatinización. La velocidad de calentamiento parece influir en el grado de gelatinización al igual que en la disolución de la amilosa; una mayor velocidad de calentamiento resultará en mayor cantidad de amilosa soluble (Eliasson, 2012).

## **Pastas de almidón**

La pastificación está definida como una combinación de procesos que ocurren después del comienzo de la gelatinización bajo tratamientos de aporte de gran energía descritos principalmente para niveles altos e intermedios de disolvente. La pastificación incluye las modificaciones morfológicas del gránulo de almidón, desde el hinchamiento hasta la ruptura, y la lixiviación de los compuestos moleculares del gránulo, particularmente de la amilosa al medio continuo. Las combinaciones diferentes de estos eventos con el hinchamiento, la lixiviación y su progreso definen las características de las dispersiones resultantes, llamadas pastas

El estado físico de los gránulos de almidón posterior a la pastificación sirve para identificar las pastas. Se han distinguido cuatro sistemas modelo de pastas de almidón: (I) la dispersión de gránulos hinchados en una fase acuosa sin amilosa lixiviada y con amilosa lixiviada (II), (III) amilosa lixiviada, gránulos hinchados de almidón y restos de gránulos dispersos en una fase acuosa enriquecida con componentes macromoleculares de almidón y (IV) una dispersión acuosa de los componentes macromoleculares del almidón (Matignon & Tecante, 2016).

## **Gelificación**

El enfriamiento de una pasta de almidón caliente da lugar generalmente a la formación de un gel viscoelástico, firme y rígido (Damodaran et al., 2010). Se cree que los cambios en las propiedades reológicas iniciales que acompañan la gelificación del almidón resultan de la gelificación de la matriz de amilosa (Miles et al., 1985). Se ha sugerido que la gelificación involucra una separación de fases que produce regiones poliméricas ricas y deficientes, la fase polimérica da lugar a una tenue red, la cual es fortalecida por agregaciones de cadenas de amilosa combinadas con una cristalización lenta, tal proceso de cristalización reporta patrones tipo-B en difracción de rayos-X (Doublier & Choplin, 1989). Otro mecanismo de gelificación postula la formación y agregación parcial de dobles hélices, zonas de unión del gel, conectadas por cadenas amorfas libres, en donde

ocurre la cristalización, la cual conduce a la formación de cristales tipo-B (Matignon & Tecante, 2016).

## **Retrogradación**

La retrogradación del almidón es con frecuencia acompañada de una serie de cambios físicos: incremento de la viscosidad y turbidez de las pastas, formación de geles, exudación de agua e incremento del grado de cristalinidad acompañado de la aparición de polimorfos cristalinos tipo-B (Wang et al., 2015).

La velocidad de retrogradación depende de diversas variables, entre las que se encuentran: la relación molecular amilosa/amilopectina; las estructuras de las moléculas de amilosa y amilopectina, que vienen determinadas por la fuente botánica del almidón; la temperatura; la concentración de almidón y por último la presencia y concentración de otros ingredientes, como surfactantes y sales (Damodaran et al., 2010).

El término retrogradación es a menudo empleado para describir todas las reorganizaciones de los componentes macromoleculares del almidón en sistemas modelo, dispersiones de amilosa y amilopectina en exceso de agua, pero también la reorganización que ocurre tras la pérdida del orden nativo del gránulo de almidón (Matignon & Tecante, 2016). La amilosa y la amilopectina experimentan numerosas reorganizaciones después de tratamientos termomecánicos. Su respectiva ubicación dentro del gránulo de almidón o el medio continuo pueden modificar su comportamiento y tener un impacto significativo en las características del sistema. Los gránulos de almidón hinchado experimentan durante el almacenamiento un incremento en la cristalinidad de las moléculas de amilosa y amilopectina, que incluso podrían cristalizar juntas, y un aumento en la cantidad de cristales tipo-B formados (Matignon & Tecante, 2016).

El calentamiento del almidón en exceso de agua provoca cambios en la estructura de los gránulos que son acompañados de la separación de la amilosa y la amilopectina, lo cual resulta en amilosa lixiviada del gránulo. A temperaturas menores de 100°C y sin fuerzas de cizalla apreciables, la integridad del gránulo se mantiene (Keetels et al., 1996). Durante el almacenamiento de geles de almidón concentrados, las moléculas de almidón se reordenan y la rigidez aumenta. El desarrollo a corto plazo de la estructura del gel y la cristalización,

parece estar dominada por la gelificación y cristalización de la amilosa en la fase continua. Durante períodos más largos, el aumento en el módulo del gel se atribuye al reordenamiento de la amilopectina, que se produce a una velocidad mucho más lenta que la gelificación de amilosa. De este modo, como resultado del reordenamiento de la amilopectina, la rigidez de los gránulos aumenta (Keetels et al., 1996).

El calentamiento a temperaturas elevadas,  $> 120^{\circ}\text{C}$ , o en presencia de cizalla cambia el carácter reológico y estructural de los sistemas de almidón. La fragmentación parcial de los gránulos de almidón ocurre, y los fragmentos de gránulos dispersos en la fase continua son observados en los geles resultantes (Keetels et al., 1996). La observación de las microestructuras revela diferentes redes e interacciones. El medio continuo pudiera ser una red de asociados de amilopectina y amilosa, una red de fases separadas; una rica en amilosa y otra rica en amilopectina ó una red de amilosa enmarañada con amilopectina. Además, podrían presentarse interacciones entre remanentes y agregados de amilosa (Matignon & Tecante, 2016). En las dispersiones acuosas de los componentes macromoleculares del almidón la amilopectina parece tener un doble papel en sus interacciones con la red de gel de amilosa; primero, aumentando la concentración efectiva de amilosa y después, atrapando dominios de amilosa. En el primer caso, el gel se reforzaría y, en el segundo caso, se debilitaría (Svegmark et al., 1993).

### **Formación de complejos**

La molécula de amilosa es capaz de formar complejos moleculares con una variedad de compuestos: alcoholes alifáticos, lípidos y yodo. Este es el resultado de la habilidad de la amilosa para adoptar una conformación de hélice sencilla, creando un espacio donde las moléculas hidrofóbicas, o las cadenas laterales hidrofóbicas de las moléculas, pueden localizarse como ligandos (Ottenhof & Farhat, 2004). En la forma desordenada los complejos de inclusión-amilosa son conocidos como complejos “tipo I”. Cuando los complejos amorfos se organizan y dan lugar a la formación de cristales, son referidos como complejos de inclusión-amilosa “tipo II” (Putseys et al., 2010).

La posibilidad de la amilopectina de formar complejos ha sido descubierta solo recientemente. Sin embargo, la amilosa tiene mejor habilidad de complejación que la amilopectina y sería la primera para formar el complejo (Ottenhof & Farhat, 2004).

La formación de complejos con lípidos polares como surfactantes/emulsionantes y ácidos grasos, puede afectar al almidón de una o más de las tres siguientes formas: a) Afectando a los procesos asociados con la gelatinización del almidón y la formación de pastas, esto es, pérdida de birrefringencia, hinchamiento de los gránulos, lixiviación de amilosa, fusión de las regiones cristalinas e incremento de la viscosidad durante el cocinado; b) Modificando el comportamiento reológico de las pastas resultantes; y c) Inhibiendo la cristalización de las moléculas de almidón, asociada con el proceso de retrogradación (Damodaran et al., 2010).

### **1.2.2. Gluten**

Desde el punto de vista de la funcionalidad de las proteínas, se pueden distinguir dos tipos de proteínas de trigo: las proteínas no pertenecientes al gluten, ya sea sin o con solo un papel menor en la elaboración de pan, y las proteínas del gluten, con un papel mayor (Goesaert et al., 2005). Muchas de las proteínas no pertenecientes al gluten, entre 15 y 20 % del total de la proteína del trigo, son extraíbles en disoluciones de sales diluidas y por lo tanto se encuentran en las fracciones de albúminas y globulinas de Osborne. En su mayor parte son proteínas monoméricas, estructurales o fisiológicamente activas (Goesaert et al., 2005). Las proteínas del gluten representan entre 80 y 85 % del total de proteínas de trigo (Goesaert et al., 2005). Tradicionalmente se clasifican, Figura 3, en dos grupos: gliadinas y gluteninas (Shewry et al., 1997).

Las gliadinas son solubles en alcoholes acuosos, 60-70 % etanol, 50 % propan-1-ol, y se presentan como proteínas monoméricas (Shewry et al., 1997). Según su movilidad electroforética a bajo pH se pueden clasificar en  $\alpha/\beta$ -gliadinas,  $\gamma$ -gliadinas y  $\omega$ -gliadinas (Wieser, 2007 ). Las  $\omega$ -gliadinas se caracterizan por su alto contenido de glutamina, prolina y fenilalanina representando cerca de 80 % de la composición total. La mayoría de  $\omega$ -gliadinas carecen de cisteína lo que imposibilita la formación de enlaces disulfuro. Estas proteínas presentan casi en su totalidad secuencias repetidas ricas en glutamina y prolina (Wieser, 2007 ).

Las  $\alpha/\beta$ -gliadinas y  $\gamma$ -gliadinas tienen menor contenido de prolina y glutamina que las  $\omega$ -gliadinas. La diferencia entre las  $\alpha/\beta$ -gliadinas y  $\gamma$ -gliadinas radica en el contenido de algunos aminoácidos como tirosina y en la presencia de diferentes dominios N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal, 40-50 % del total de las proteínas, consiste principalmente de regiones repetitivas ricas en glutamina, prolina, fenolftaleína y tirosina. Dentro del dominio C-terminal las  $\alpha/\beta$ -gliadinas y  $\gamma$ -gliadinas no presentan regiones repetitivas y tienen menos glutamina y prolina que el dominio N-terminal (Wieser, 2007).

Las gluteninas son insolubles en alcoholes acuosos y se componen de subunidades de proteínas presentes en polímeros estabilizados por enlaces disulfuro entre cadena. La reducción de estos últimos enlaces resulta en subunidades solubles en mezclas alcohol/agua y se clasifican en dos tipos: de alta masa molar (GLAMM) y baja masa molar (GLBMM) (Shewry et al., 1997).

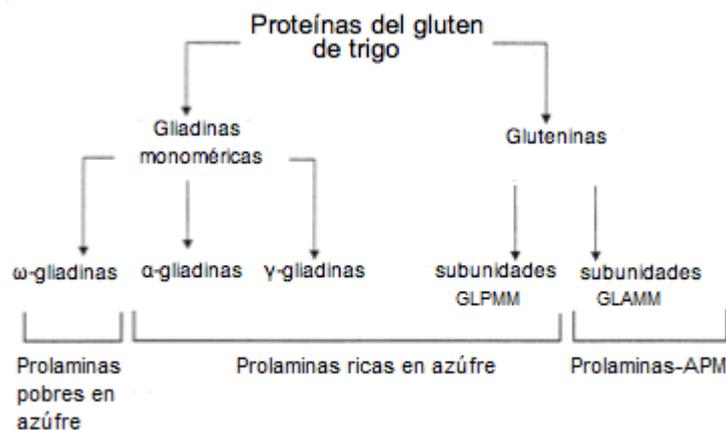


Figura 3. Clasificación de las subunidades de gliadina y glutenina en la harina de trigo (Lindsay & Skerritt, 1999).

Las GLAMM tienen dominios N-terminal no repetitivo y C-terminal. La mayoría de los residuos de cisteína se encuentran localizados en los dominios terminales; en el dominio N-terminal de subunidades más grandes “tipo-X” hay tres residuos de cisteína y en las subunidades más pequeñas “tipo-Y” hay cinco, mientras que en el dominio C-terminal de todos los GLAMM hay un solo residuo de cisteína (Lindsay & Skerritt, 1999).

Según su movilidad en análisis electroforéticos SDS-PAGE, existen tres grupos de GLBMM que han sido identificados; B- ( $M_r$  42-51,000), C- ( $M_r$  30-40,000) y D- ( $M_r$  55-70,000) (Lindsay & Skerritt, 1999).

Existen dos tipos principales de GLBMM; las subunidades m-GLBMM con metionina como el primer aminoácido de la secuencia, y las subunidades s-GLBMM con serina como el primer aminoácido de la secuencia. El grupo B-GLBMM comprende ambos tipos m- y s-GLBMM, mientras que algunas regiones N-terminal de C-GLBMM se conforman del tipo m-BMM y otras más tienen regiones similares a las gliadinas ( $\alpha$  y  $\gamma$ ). Las  $\alpha$  y  $\gamma$ -GLBMM contienen un residuo extra de cisteína que provoca que se unan covalente al polímero. Puesto que las subunidades contienen un número impar de residuos de cisteína extra, se ha postulado que actúan como terminadores de cadena. Por otro lado, muchos grupos B-GLBMM tienen un número par de residuos de cisteína y se cree que actúan como extensores de cadena. El grupo D-GLBMM se cree es el resultado de una mutación de uno o más genes que codifican para el tipo  $\omega$ -gliadinas, lo que resulta en la presencia de residuos de cisteína (Lindsay & Skerritt, 1999).

### **1.2.3. Lípidos**

Los lípidos contenidos en el trigo pueden clasificarse en lípidos polares y no polares. La mayoría de los lípidos polares del grano de trigo están presentes en el endospermo harinoso siendo mayoritarios el digalactosil diacilglicerol (DGDG), monogalactosil diglicerol (MGDG), N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), lisofosfatidilcolina (LPC) y lisofosfatidiletanolamina (LPE). En general, los lípidos polares conforman 70-75 % del total de los lípidos de la harina de trigo (Pareyt et al., 2011).

Los lípidos no polares están presentes predominantemente en el germen y los tejidos de la aleurona del grano del trigo, y consisten en ácidos grasos libres (FFA), monoglicéridos (MAG), diacilgliceroles (DAG) y triacilgliceroles (TAG). Durante la molienda de trigo, aproximadamente 50 % del TAG presente en el germen es transferido a la harina (Pareyt et al., 2011).

### **1.3. Envejecimiento del pan**

Si bien el envejecimiento del pan se ha estudiado por más de siglo y medio, no ha sido eliminado y permanece como responsable de grandes pérdidas económicas

para la industria panadera y el consumidor (Gray & BeMiller, 2003). Como se ha mencionado anteriormente, las causas más importantes responsables del envejecimiento del pan se deben a la transformación del almidón, las interacciones almidón-gluten y la redistribución de humedad (Fadda et al., 2014).

### **1.3.1. Transformación del almidón**

Se ha propuesto con anterioridad que la retrogradación de los polímeros de almidón es la responsable del envejecimiento del pan. La comparación entre patrones de difracción de rayos X de pan fresco y almidón recién gelatinizado muestran similitudes al igual que los patrones de rayos X entre pan envejecido y almidón retrogradado (Gray & BeMiller, 2003). La influencia de la amilosa sobre la recristalización de la amilopectina y la habilidad de la amilopectina para formar una red tridimensional son factores que afectan el envejecimiento del pan (Eliasson, 2012). La retrogradación de la amilosa es un evento relativamente rápido en relación con la retrogradación de la amilopectina (Ottenhof & Farhat, 2004). Se ha descubierto que la solubilidad de la amilosa disminuye marcadamente durante el primer día de almacenamiento, mientras que la solubilidad de la amilopectina disminuye de manera constante durante cinco días de almacenamiento y que la cantidad de amilopectina soluble en pan fresco es de cinco a veinticuatro veces la cantidad de amilosa soluble. Esto indica que una pequeña cantidad de amilosa se lixivia de los gránulos o que, una vez que el pan se ha enfriado a temperatura ambiente, gran parte se vuelve insoluble por la retrogradación, probablemente esta última (Gray & BeMiller, 2003). Se cree que el mecanismo de retrogradación en pastas concentradas de amilopectina y miga de pan es igual (Gray & BeMiller, 2003). Sin embargo, hay razones para creer que la retrogradación puede ocurrir más fácilmente en pan que en pastas, las cuales se estudian más a menudo, debido a que los gránulos en el pan horneado están todavía en gran parte intactos, aunque deformados porque su hinchamiento está limitado por una deficiencia de agua, las cadenas moleculares en ellos no están completamente desacopladas. Por lo tanto, aunque hay algún grado de perturbación en el orden de empaquetamiento cristalino, es mucho más fácil para las cadenas, que todavía están cercanas entre sí y alineadas de forma similar a la del gránulo nativo, reasociarse nuevamente que para las moléculas de

amilopectina en una pasta cocida realinearse y formar una estructura ordenada. Sin embargo, no se conoce si la recristalización dentro del gránulo está relacionada con el envejecimiento (Gray & BeMiller, 2003).

### **1.3.2. Interacción almidón-gluten**

El papel de las proteínas del gluten en el proceso de envejecimiento aún no está claro. Sin embargo, se cree que las interacciones almidón-gluten se encuentran de alguna forma involucradas en el proceso de endurecimiento de la miga (Gray & BeMiller, 2003). Martín et al. (1991) propusieron que el endurecimiento de la miga resulta de la formación de enlaces de hidrógeno entre la fase continua de proteína y la fase discontinua formada por remanentes de gránulos de almidón. Durante el envejecimiento del pan, mientras la miga pierde energía cinética, las interacciones incrementan en número y fuerza. La recuperación de la frescura en el recalentamiento sugiere que los enlaces que contribuyen a la firmeza de la miga deben ser relativamente débiles, posiblemente puentes de hidrógeno. Aunque se ha postulado al gluten como componente principal en la velocidad de envejecimiento, muchos otros investigadores han concluido que la dureza de la miga no se correlaciona significativamente con la calidad y concentración de la proteína (Goesaert et al., 2005).

### **1.3.3. Redistribución de humedad**

El agua está involucrada en los siguientes cambios en el sistema del pan: deshidratación, equilibrio de humedad entre miga y corteza, y redistribución de humedad entre los componentes del pan (Kulp et al., 1981). La deshidratación del pan no explica el envejecimiento, pero puede acelerar las reacciones que conducen a él. Además, se ha confirmado que existe una relación inversa entre el contenido de humedad del pan y la velocidad de envejecimiento, aunque se ha encontrado también una correlación directa entre su contenido de humedad y la velocidad de retrogradación (Gray & BeMiller, 2003).

Los cambios en la movilidad y distribución del agua causan modificaciones en las propiedades de difusión dentro de la miga y la corteza, y la percepción en la miga de que se ha vuelto rígida y seca (Rayas-Duarte, 2012). Mientras el pan comienza

a enfriarse, se forma un gradiente de humedad en la hogaza. Las diferencias de presión de vapor entre la corteza y la región interna de la miga resultan en la migración de humedad de la miga a la corteza. Con el tiempo, el contenido de humedad en el centro del pan disminuye, mientras que en la región externa se incrementa (Gray & BeMiller, 2003).

La deshidratación evidente de la miga puede ser resultado de la transferencia de humedad de uno de los compuestos de la miga a otro (Kulp et al., 1981). Se ha estudiado ampliamente si el envejecimiento involucra la deshidratación del gluten o el almidón, pero todavía es poco claro. Sin embargo, la mayoría de las evidencias sugieren una transferencia de agua del gluten hacia el almidón, conforme el almidón se cristaliza (Gray & BeMiller, 2003). El proceso de envejecimiento del pan está dominado por la recristalización de la amilopectina a una estructura parcialmente cristalina con regiones dispersas de cristales tipo-B, Figura 4. El polimorfo tipo-B es un hidrato cristalino de mayor humedad que el tipo-A. Su recristalización requiere la incorporación de moléculas de agua dentro de la red cristalina. En consecuencia, esta recristalización requiere una migración de humedad dentro de la estructura de la miga, por lo que el agua debe difundirse de la matriz amorfa circundante y ser incorporada como componente estructural en las regiones cristalinas, donde permanece estructuralmente inmovilizada. Dado que el agua del hidrato cristalino no puede plastificar ni las regiones amorfas de la red de almidón ni otras redes, glutenina, pentosanos, de la matriz de la miga y no puede percibirse organolépticamente, la consecuencia global de este fenómeno es una textura más seca y firme característica del pan viejo (Slade et al., 1991).

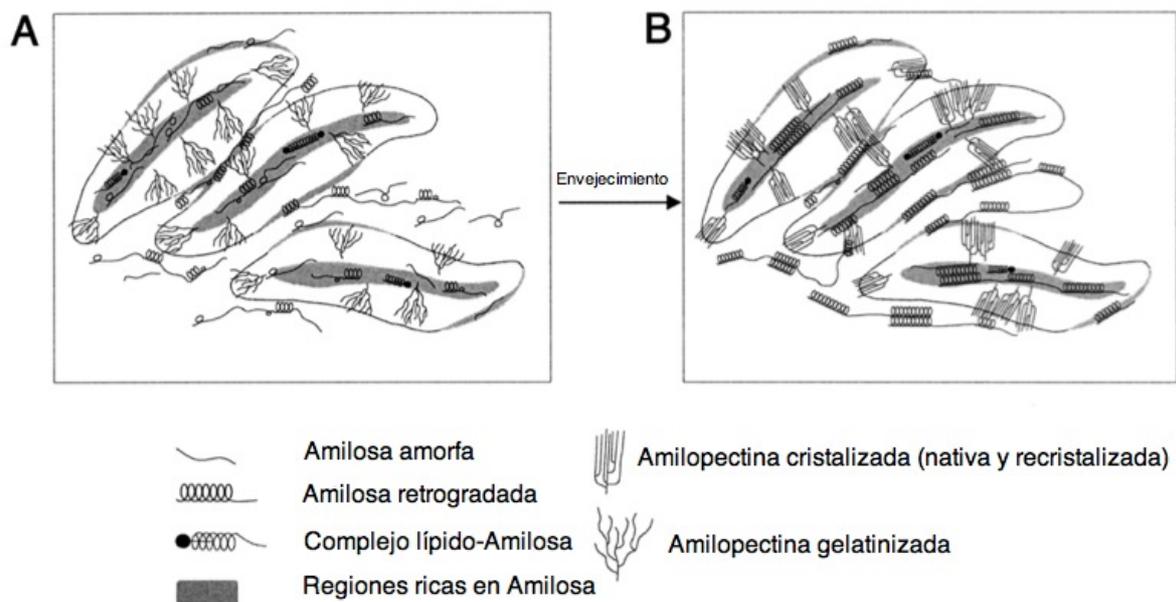


Figura 4. Modelo del envejecimiento del pan basado en los cambios de la fracción de almidón. A, miga de pan fresco; B, miga de pan envejecido (Hug-Iten et al., 2003).

## 1.4. Métodos y técnicas empleadas en el estudio de Pan de Muerto

### 1.4.1. Estudio de la retrogradación del almidón

Debido a que la retrogradación del almidón es un proceso complejo que involucra una serie de eventos moleculares y fisicoquímicos, una diversidad de métodos físicos y químicos han sido aplicados para investigar los cambios que toman lugar en las propiedades del almidón (Wang et al., 2015). A continuación, se describen las técnicas y métodos empleados en este estudio; difracción de rayos-X, calorimetría diferencial de barrido (DSC), determinación calorimétrica de complejación con yodo y resistencia del almidón a la hidrólisis enzimática.

#### 1.4.1.1. Difracción de rayos-X de polvos

Las técnicas de difracción de rayos-X son ampliamente utilizadas para identificar materiales cristalinos y obtener información de las estructuras cristalinas y las dimensiones de celdillas unitarias (Wang et al., 2015). En la Figura 5 se aprecian los patrones de difracción característicos de las estructuras cristalinas tipo-A, -B y -V. Las estructuras cristalinas tipo-A presentan picos de difracción de rayos-X

característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $11.2^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18.1^\circ$  y  $23.3^\circ$ . Las estructuras cristalinas tipo-B presentan los siguientes picos en  $2\theta$ :  $5.6^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $22^\circ$  y  $24^\circ$ . La estructura tipo-C es una combinación de la estructura A y B (Buléon et al., 1997). Los complejos de inclusión-amilosa, estructuras V-amilosa, tipo II presentan picos de difracción en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $7.5^\circ$ ,  $13^\circ$  y  $20^\circ$ . Sin embargo, en condiciones de baja humedad y altas temperaturas los picos cambian a ángulos más bajos,  $6.9^\circ$ ,  $12^\circ$  y  $18.5^\circ$ , resultando en la variante conocida como E-amilosa (Buléon et al., 1998).

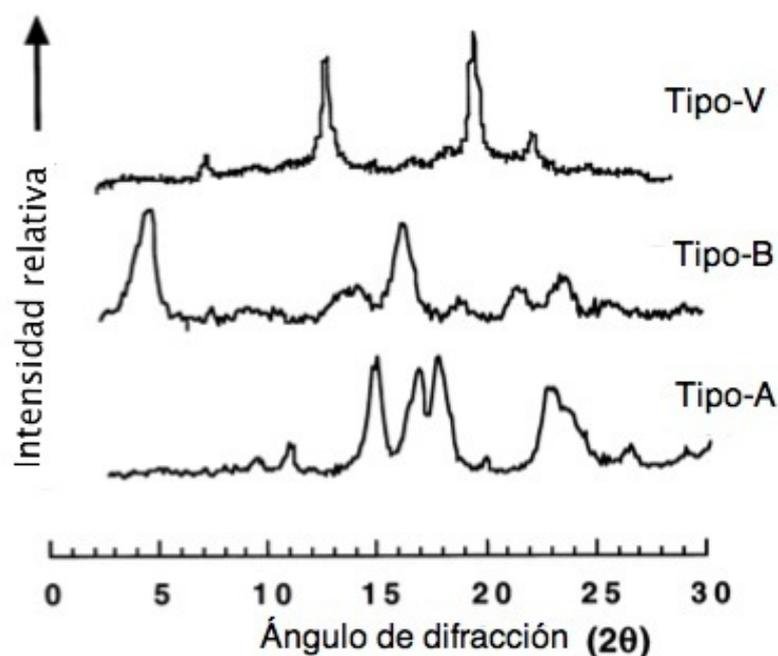


Figura 5. Patrones de difracción de rayos-X de almidones tipo -A, -B-, y -V (Buléon et al., 1998).

La cristalografía de rayos-X ha sido empleada para examinar el envejecimiento del pan, específicamente la naturaleza cristalina del almidón en los sistemas, el cual puede relacionarse a la firmeza del producto. El almidón de pan recién preparado es en su mayoría amorfo, pero lentamente se reordena durante el almacenamiento. La recristalización es reflejada en patrones de rayos-X. Por lo tanto, la cristalografía en rayos-X puede ser usada para determinar la organización molecular del almidón en el pan (Gray & BeMiller, 2003).

#### **1.4.1.2. Microcalorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Cuando un sistema es calentado, la absorción o liberación de calor o pérdida de masa a menudo ocurre como resultado de una transición de fase, tal como la fusión o la cristalización, o reacciones químicas, e.g., descomposiciones químicas. El realineamiento de las moléculas perturbadas de amilosa y amilopectina para formar una estructura parcialmente ordenada y la exudación de agua de los geles de almidón pueden ser monitoreados a través de técnicas como el DSC (Wang et al., 2015). El DSC ha probado ser una herramienta útil aportando información básica de la retrogradación del almidón (Gray & BeMiller, 2003). Esta técnica mide los cambios de energía en un material sujeto a un calentamiento o enfriamiento programado. Las temperaturas de transición (inicio,  $T_o$ ; pico,  $T_p$ ; conclusión,  $T_c$ ) y el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) debido a la fusión de los cristales y formación de estructuras ordenadas puede derivarse de los termogramas de DSC. (Wang et al., 2015). En el caso del almidón retrogradado, el valor de  $\Delta H$  provee una medición cuantitativa de la energía de transformación que ocurre durante la fusión de amilopectina cristalizada, al igual que las mediciones precisas de las transiciones de temperaturas de este fenómeno endotérmico (Abd Karim et al., 2000).

#### **1.4.1.3. Determinación calorimétrica de complejación con yodo**

El almidón puede formar un complejo de inclusión con iones poliyoduro, los cuales le otorgan un color azul fuerte característico. El contenido de amilosa de los almidones nativos es determinado con frecuencia colorimétricamente mediante la complejación con yodo. En los dominios amorfos, la conformación de las cadenas de amilosa parecen estar principalmente en forma de hélice sencilla o espirales aleatorias. La amilosa dispersa en la retrogradación puede formar asociaciones de doble hélice de 40-70 unidades de glucosa, lo cual no permite el arreglo del yodo. Como resultado, la amilosa pierde gradualmente su habilidad para formar el complejo azul con yodo si las asociaciones de dobles-hélices ocurren entre las cadenas de amilosa en la retrogradación (Wang et al., 2015).

#### **1.4.1.4. Medición de la resistencia del almidón a la hidrólisis enzimática**

La resistencia del almidón a hidrólisis enzimática puede ser usada como una medida del almidón retrogradado. La formación de estructuras ordenadas como dobles hélices/o cristales como resultado de la retrogradación incrementan la resistencia del almidón a la hidrólisis enzimática. Para evaluar el grado de retrogradación del almidón por hidrólisis enzimática, la selección de enzimas empleadas para la digestión es muy importante (Wang et al., 2015). El almidón retrogradado no digerible puede ser determinado colorimétricamente con yodo después de que el almidón gelatinizado ha sido digerido por un  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis* o *A. oryzae* (Tsuge et al., 1990; Tsuge et al., 1992).

#### **1.4.2. Estudio del gluten**

##### **1.4.2.1. Cizalla oscilatoria de baja amplitud**

La cizalla oscilatoria de baja amplitud, también conocida como ensayo dinámico oscilatorio, puede ser empleada para determinar las propiedades viscoelásticas de los alimentos. En experimentos de cizalla oscilatoria de baja amplitud, un esfuerzo o cizalla oscilante sinusoidal a una frecuencia ( $\omega$ ) es aplicada a un material y medida la diferencia de fase entre el esfuerzo y la cizalla oscilante, así como la relación de amplitud (Rao, 2007). El módulo de almacenamiento,  $G'$ , es medido como la energía almacenada en el material y recuperada por ciclo. Sobre una base molecular, la magnitud de  $G'$  es dependiente de los reordenamientos que ocurran dentro del periodo de oscilación y es tomado como un indicio del carácter sólido o elástico del material (Abd Karim et al., 2000). El módulo de pérdida,  $G''$ , es definido como el esfuerzo  $90^\circ$  fuera de fase con la deformación dividido por la deformación y es una medida de la energía disipada o perdida, como calor, por ciclo de deformación sinusoidal. Es por lo tanto, considerado como un indicio del comportamiento líquido o viscoso. Este tipo de comportamiento es exhibido por sistemas no entrecruzados permanentemente y

conduce a altos niveles de rearrreglos moleculares, y a grados altos de pérdida de energía (Abd Karim et al., 2000).

En las pruebas de barridos de frecuencias  $G'$  y  $G''$  son determinados como una función de la frecuencia,  $\omega$ , a una temperatura establecida. Estos ensayos pueden proveer datos en un amplio intervalo de frecuencias, sin embargo, cada prueba debe restringirse a la zona de comportamiento viscoelástico lineal (Rao, 2007).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La extracción de almidón con un disolvente adecuado de la matriz de pan mostrará señales de presencia de almidón en microcalorimetría diferencial de barrido y rayos-X y la porción aislada de proteína de trigo se modificará por la adición de un agente entrecruzante.

La disolución en medio alcalino de las moléculas de amilosa y amilopectina presentes en miga a diferentes días de almacenamiento se relacionarán con el estado amorfo o cristalino de las moléculas y por consiguiente con su grado de retrogradación.

El grado de retrogradación, calculado por un método enzimático, de miga liofilizada y desgrasada proveniente de pan de tradición almacenado durante más días será mayor debido a que se espera mayor ordenamiento de las moléculas/formación de cristales de amilopectina.

### **2.2. Objetivos**

Establecer una metodología que permita separar el almidón y el gluten de una matriz de pan de tradición para aplicarla en el estudio de su envejecimiento.

Estudiar el efecto que tiene un agente entrecruzante sobre la proteína de la miga liofilizada para comprender de qué manera se modifican las propiedades viscoelásticas de la matriz que contiene la proteína.

Estudiar la retrogradación en pan de tradición mediante la disolución de amilosa y amilopectina en medio básico y la aplicación de un método enzimático.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Desarrollo experimental

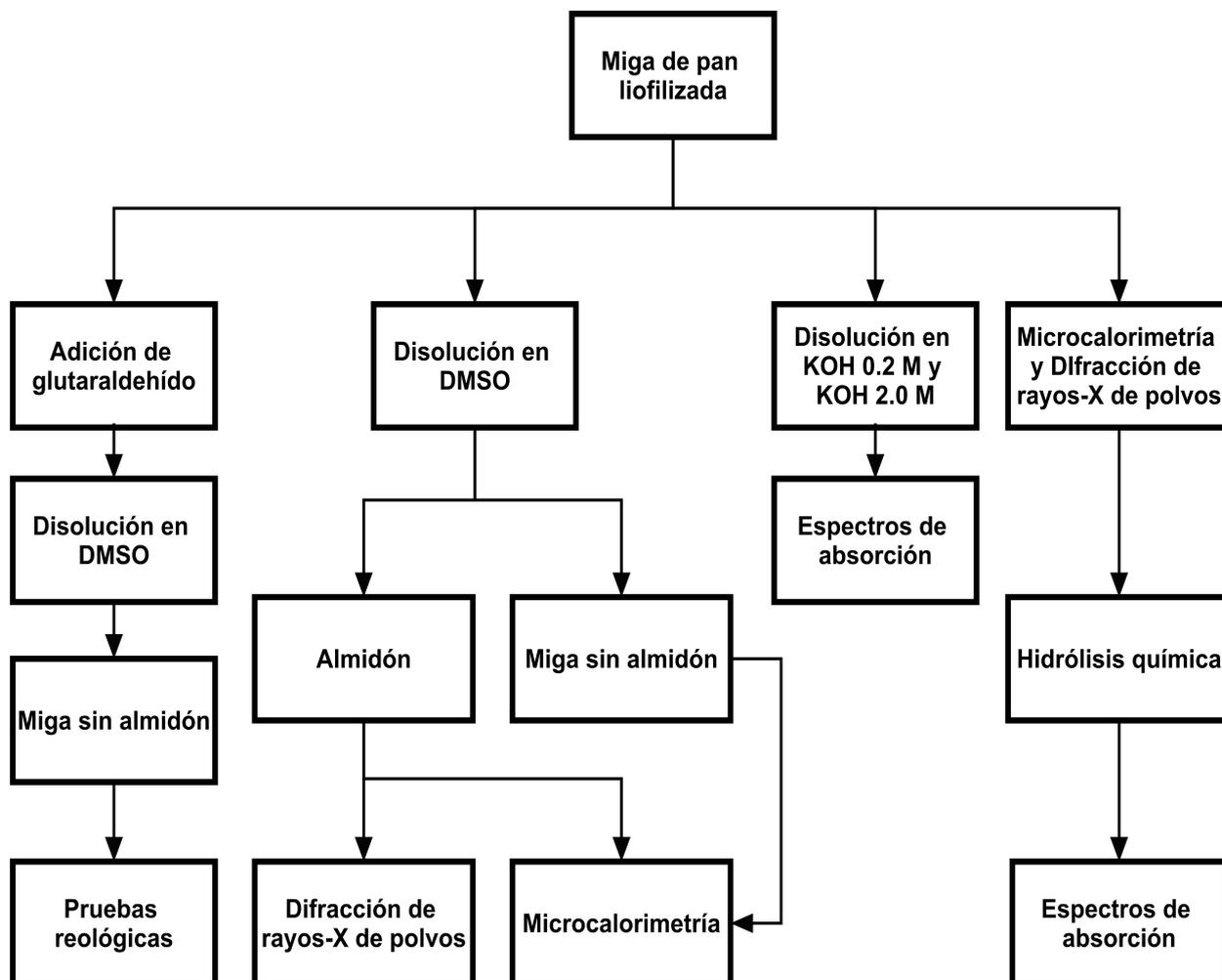


Figura 6. Diagrama general del proceso experimental.

#### 3.2. Materiales

Se trabajó con miga de pan proveniente de pan de tradición almacenado a diferentes días, 0, 1, 3 y 8 días, liofilizado y desengrasado. Glutaraldehído, grado II, 25 % en agua, sulfóxido de dimetilo, grado reactivo A.C.S, 99.9 % adquiridos, de Sigma-Aldrich, México. KOH en perlas grado reactivo A.C.S, 87.9 %, HCl grado reactivo A.C.S, 36.5-38 %, alcohol etílico absoluto grado reactivo A.C.S, 99.9 %, adquiridos estos últimos tres de J.T. Baker®, México.  $\alpha$ -Amilasa (EC 3.2.1.1) de *Aspergillus oryzae* y Actinasa E® (EC 232-909-5) proteasa tipo XIV de

*Streptomyces griceus* fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. A (St. Louis, MO, USA).

### **3.3. Procedimientos**

#### **3.3.1. Separación de las fracciones de almidón y proteína**

Se pesó aproximadamente 1.0 g de miga liofilizada y desengrasada. Se adicionaron 10 mL de DMSO 90% en agua y se dejó en agitación suave durante 48 h a temperatura ambiente (Jackson, 1991). Transcurrido ese tiempo se trasladó a un tubo que se centrifugó por 20 min a 6000 rpm en una centrifuga (Hermle Z200A, Labnet, Alemania). El sobrenadante resultante, alrededor de 7 mL, se agregó a 20 mL de etanol 70%, se agitó vigorosamente en una parrilla de agitación, y el precipitado de almidón se recuperó y se colocó en la campana para evaporar el etanol, una vez seco se trituró en un mortero y una pequeña muestra colocada sobre un portaobjetos se observó en un microscopio óptico (Olympus BX-45, Olympus Corporation, Japón). El sedimento obtenido en la centrifugación se lavó con agua para eliminar restos de DMSO y se centrifugó nuevamente durante 13 min a 6000 rpm. Se eliminó el agua del sobrenadante y se recuperó el residuo sólido.

#### **3.3.2. Entrecruzamiento de la miga sin almidón con glutaraldehído**

Se pesó aproximadamente 1.0 g de miga liofilizada y desengrasada, y se usaron dos concentraciones de glutaraldehído; 1000 y 2000 mg/kg. La miga se dejó remojar durante 1, 2, 3 y 4 h para ambas concentraciones (Reddy et al., 2008). Pasado el tiempo se retiró el exceso de glutaraldehído y la miga se lavó con agua destilada. Se adicionaron 10 mL de DMSO 99.9% y se siguió el mismo procedimiento que en la separación de las fracciones de almidón y proteína.

##### **3.3.2.1. Cizalla oscilatoria de baja amplitud**

En la miga sin almidón con glutaraldehído se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud en un reómetro (ARES-RFS III, TA Instruments,

Delaware, USA), en una geometría de cono-placa. El diámetro del cono-placa fue 25 mm, y el ángulo del cono 5.72°. Se hicieron barridos de frecuencia en un intervalo de 0.1 a 100 rad/s con una deformación de 1%.

### **3.3.3. Disolución de almidón con KOH**

Se disolvió ca. 1.0 g de miga liofilizada y desengrasada almacenada diferentes días en 100 mL de KOH 0.2 mol/L con agitación constante durante 20 min (Birch & Priestle, 1973). Después, se transfirió a tubos que se centrifugaron durante 10 min a 6000 rpm. El sobrenadante se aforó a 100 mL; de esta disolución se tomó una alícuota de 40 mL, y se neutralizó a pH  $7.0 \pm 0.2$  con HCl 36%. Finalmente, se aforó a 50 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 2 mL y se hizo reaccionar con 3 mL de una disolución de I/KI en oscuridad durante 20 min. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda de 400 a 700 nm. El sedimento obtenido en la centrifugación se disolvió en 100 mL de KOH 2.0 mol/L (Zhou et al., 2013) durante 20 min y se neutralizó a pH  $7.0 \pm 0.2$  con HCl 36%. Se aforó a 250 mL, se tomó una alícuota de 2 mL y se hizo reaccionar con 3 mL de una disolución de I/KI en un espacio oscuro durante 20 min. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda de 400 a 700 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.3.4. Evaluación enzimática del grado de retrogradación del almidón**

Para eliminar la interferencia de la proteína de la miga de pan se realizó una digestión previa con Actinasa E® (Tsuge et. al., 1990). La Actinasa se agregó al 0.2% en base seca (BS) a 225 mg de miga de pan liofilizada y se incubó durante 16 h a 37 °C en un buffer de sodio fosfato 0.1 mol/L, pH 7.5, adicionado con 1 mL de tolueno, para evitar deterioro microbiano. Después de la digestión la muestra se transfirió a una membrana de diálisis y se dializó en un baño de agua a 40°C durante 6 h; el agua se cambió en dos ocasiones cada 2 h.

### *Fracción total de almidón (a)*

Tres matraces aforados de 100 mL, G, H, I, fueron preparados como se describe a continuación. A una alícuota de 5 mL de la preparación digerida por Actinasa®, aproximadamente 25 mg de almidón, se le agregaron 5 mL de agua destilada, 2 mL de buffer de acetatos 0.1 N, pH 5.6, 5 mL de NaOH 4.0 mol/L y 5 mL de HCl 4.0 mol/L para obtener un pH 7.0. Se les adicionó 5 mL de la disolución 0.2% I<sub>2</sub>/2.0% KI y se llevó a la marca de aforo. Después de 20 min se leyó su absorbancia a 625 nm. Además, se preparó un blanco de reactivos.

### *Fracción de almidón analizada (b)*

Tres matraces, a, b, c, fueron preparados de la siguiente forma. A una alícuota de 5 mL de la preparación digerida por Actinasa®, aproximadamente 25 mg de almidón, se le agregaron 4.5 mL de agua destilada, 2 mL de buffer de acetatos 0.1 N, pH 5.6, y 0.5 mL de la disolución  $\alpha$ -amilasa con alrededor de siete unidades. Los tres matraces se incubaron durante 10 min a 37°C. Inmediatamente después de la incubación se adicionó a cada matraz 5 mL de NaOH 4.0 mol/L, con la intención de finalizar la reacción enzimática, y posteriormente se les agregó 5 mL de HCl 4.0 mol/L para obtener pH 7.0. Los matraces se aforaron a 100 mL. De cada matraz a, b y c, se transfirió una alícuota de 10 mL a tres matraces aforados de 100 mL, D, E, F, y se vertió 5 mL de una disolución de 0.2% I<sub>2</sub>/2.0% KI a cada uno y se aforó. Después de 20 min se leyó su absorbancia a 625 nm. Además, se preparó un blanco de reactivos.

### *Material residual después de la digestión completa de almidón (c)*

Finalmente, otros tres matraces aforados de 100 mL, A, B, C, fueron preparados como se describe a continuación. A una alícuota de 5 mL de la preparación digerida por Actinasa®, aproximadamente 25 mg de almidón, se le agregaron 4.5 mL de agua destilada, 2 mL de buffer de acetatos 0.1 N, pH 5.6, y 0.5 mL de la disolución  $\alpha$ -amilasa, ca. siete unidades. Los tres matraces se incubaron 10 min a 37°C. Inmediatamente después de la incubación, se adicionó a cada matraz 5 mL

de NaOH 4.0 mol/L con la intención de finalizar la reacción enzimática, y posteriormente se les agregó 5 mL de HCl 4.0 mol/L. Una vez neutra la disolución se les adicionó 5 mL de la disolución 0.2% I<sub>2</sub>/2.0% KI y se aforó. Después de 20 min se leyó su absorbancia a 625 nm. Además, se preparó un blanco de reactivos. El grado de gelatinización (DG%) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Tsuge et. al., 1990)

$$DG(\%) = \frac{(a - b)}{(a - c)} \times 100$$

**a** = absorbancia en la fracción total de almidón

**b** = absorbancia en la fracción de almidón a analizar

**c** = fracción en el material residual después de la digestión completa del almidón

La tabla 1 resume el procedimiento experimental seguido para determinar el grado de retrogradación del almidón.

Tabla 1. Preparación de las fracciones a, b y c para medir el grado de retrogradación del almidón

Fracción		a	b	c
Incubación 10 min/37 °C	Preparación digerida por Actinasa®		5 mL	5 mL
	Agua destilada		4.5 mL	4.5 mL
	Buffer de Acetatos 0.1 N, pH 5.6		2 mL	2 mL
	Disolución $\alpha$ - amilasa		0.5 mL	0.5 mL
Neutralización	NaOH 4.0 M		5.0 mL	5.0 mL
	HCL 4.0 M		5.0 mL	5.0 mL
Disolución en matraz aforado de 100 mL	Preparación digerida por Actinasa®	5.0 mL	Llevar al aforo la disolución de incubación	Una vez adicionada la disolución de $I_2/KI$ llevar al aforo la disolución de incubación
	Agua destilada	5.0 mL		
	Buffer de Acetatos 0.1, pH 5.6	2.0 mL		
	NaOH 4.0 M	5 mL		
	HCL 4.0 M	5 mL		
	Disolución 0.2 % $I_2$ /2.0 %KI	5 mL		5 mL
Dilución 10:100	Alicuota		10 mL	
	Disolución 0.2 % $I_2$ /2.0 %KI		5 mL	
Medición de absorbancia		625 nm	625 nm	625 nm

### 3.3.5. Microcalorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC)

Las mediciones se hicieron en un micro-calorímetro ( $\mu$ DSC Evo 7, Setaram, Francia). Se pesó una cantidad de muestra, alrededor de 150 mg para el almidón extraído y 200 mg para la miga sin almidón, para concentraciones de agua desionizada de alrededor de 75 y 80 %. La muestra se colocó en una celda de Hastelloy, se selló herméticamente para evitar la evaporación de agua y en la celda de referencia se utilizó agua desionizada. Posteriormente se hizo la prueba a una tasa de calentamiento de 1.0 °C/min en el intervalo de temperatura de 0 a 120 °C.

### 3.3.6. Difracción de Rayos X de polvos

El almidón extraído en polvo se analizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) en condiciones de medición de reflexión y con un ángulo de difracción de 2 a 40°. El porcentaje de cristalinidad se calculó de la relación del área del pico cristalino a partir del área total de las regiones cristalinas.

$$\text{Cristalinidad}(\%) = \frac{\text{Área dispersada cristalina}}{\text{Área dispersada cristalina total}} \times 100$$

### 3.3.7. Análisis estadístico

Para determinar si el método empleado de complejación con yodo permite ver diferencias en la disolución de las moléculas de amilosa y amilopectina a diferentes días de almacenamiento de la miga liofilizada, se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) con  $\alpha = 0.05$ . Para distinguir entre cuáles días hubo diferencia significativa se empleó un análisis de diferencia mínima significativa. Se hizo otro análisis estadístico de varianza para determinar si existe diferencia entre el grado de retrogradación de la miga liofilizada al día 0 y la almacenada al día 8.

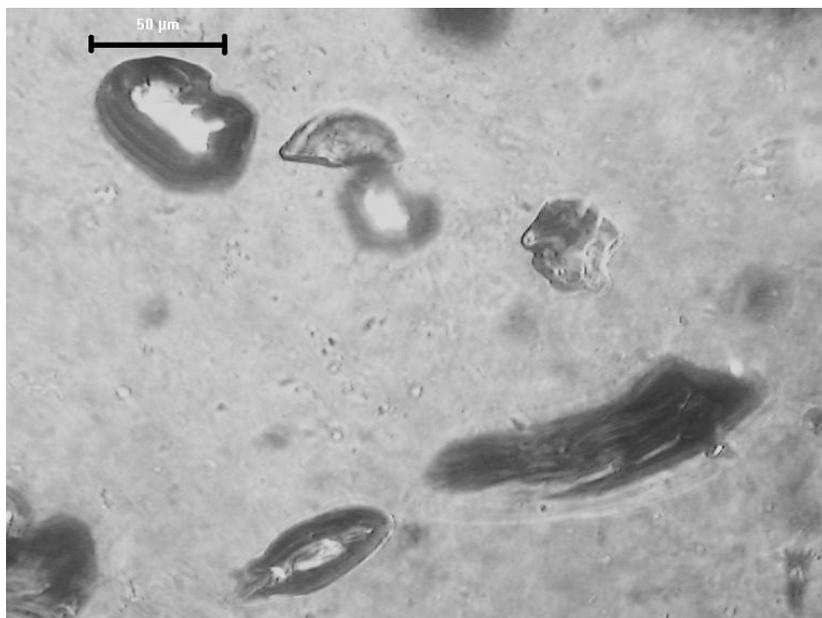
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Separación de almidón y la proteína de la miga liofilizada de pan

Al almidón separado de la disolución de DMSO se le agregó una disolución de 0.2 % I<sub>2</sub>/2.0 % KI y se observó su presencia mediante la formación de una coloración morada, Figura 7a.



a)



b)

Figura 7. a) Prueba de yodo, se identifica la presencia de almidón en el extracto b) gránulos del almidón extraído observados a 40X en microscopio óptico.

Algunas de las estructuras que se observan en la Figura 7b se atribuyen a gránulos de almidón. Sin embargo, por su forma, discos, y tamaño, 2-30  $\mu\text{m}$ , no son gránulos intactos (Buleón et al., 1998), sino gránulos deformados por el tratamiento mecánico y de mayor tamaño debido a su estado gelatinizado. Además, la presencia de partículas en el fondo de la imagen puede corresponder a compuestos macromoleculares del almidón dispersos en el medio.

Una vez que se verificó la presencia de almidón, el polvo se sometió a pruebas de calorimetría diferencial de barrido. La prueba en DSC durante el ciclo de calentamiento no mostró ningún tipo de transición, la ausencia de un pico endotérmico en el ciclo de calentamiento es posiblemente porque el almidón presente se encuentra gelatinizado, al menos la amilopectina, en este punto no se descarta la presencia de cristales de amilosa debido a que funden a temperaturas por encima de  $150^{\circ}\text{C}$  (Hug-Iten et al., 2003). La Figura 8 muestra en el termograma del ciclo de enfriamiento una transición exotérmica para la muestra de almidón extraído por DMSO y la Figura 9 su apariencia al finalizar la prueba en DSC, según lo reportado en la literatura durante el enfriamiento disoluciones de amilosa calentadas a temperaturas por debajo de  $160^{\circ}\text{C}$  se produce un gel, que coincide con lo que muestra la Figura 9, también se ha reportado que el efecto de la historia térmica es completamente reversible (Doublier et al., 1992), lo que indica que si existe presencia de cristales de amilosa aún a la temperatura del experimento el resultado será un gel, el pico exotérmico obtenido en el ciclo de enfriamiento, Figura 8, se atribuye a la formación de este gel, durante el calentamiento la muestra de almidón absorbe energía que se libera gradualmente en el enfriamiento y se favorece la organización de la estructura que da lugar a la formación gel de amilosa. La Tabla 2 muestra el intervalo de temperaturas de formación de gel. En ambos ciclos ocurrió una transición exotérmica amplia en intervalos semejantes de temperatura. Lo que confirma el carácter reversible de la transición. En el Ciclo 2 se observa una transición exotérmica más pequeña que antecede a la más grande. La suma de ambas entalpías es  $0.126 \text{ J/g}$ , valor muy cercano al del Ciclo 1,  $0.130 \text{ J/g}$ . Por ello, ambas señales se atribuyen a la formación de gel.

Tabla 2. Valores obtenidos para la curva de enfriamiento de dos ciclos en  $\mu$ DCS para el almidón extraído.

Ciclo Enfriamiento	Prueba [H <sub>2</sub> O]	T <sub>0</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta H$ (J/g)
1	75 %	84.1	81.5	77.1	0.130
2		86.7 85.2	86.0 82.4	85.4 78.6	0.00891 0.117

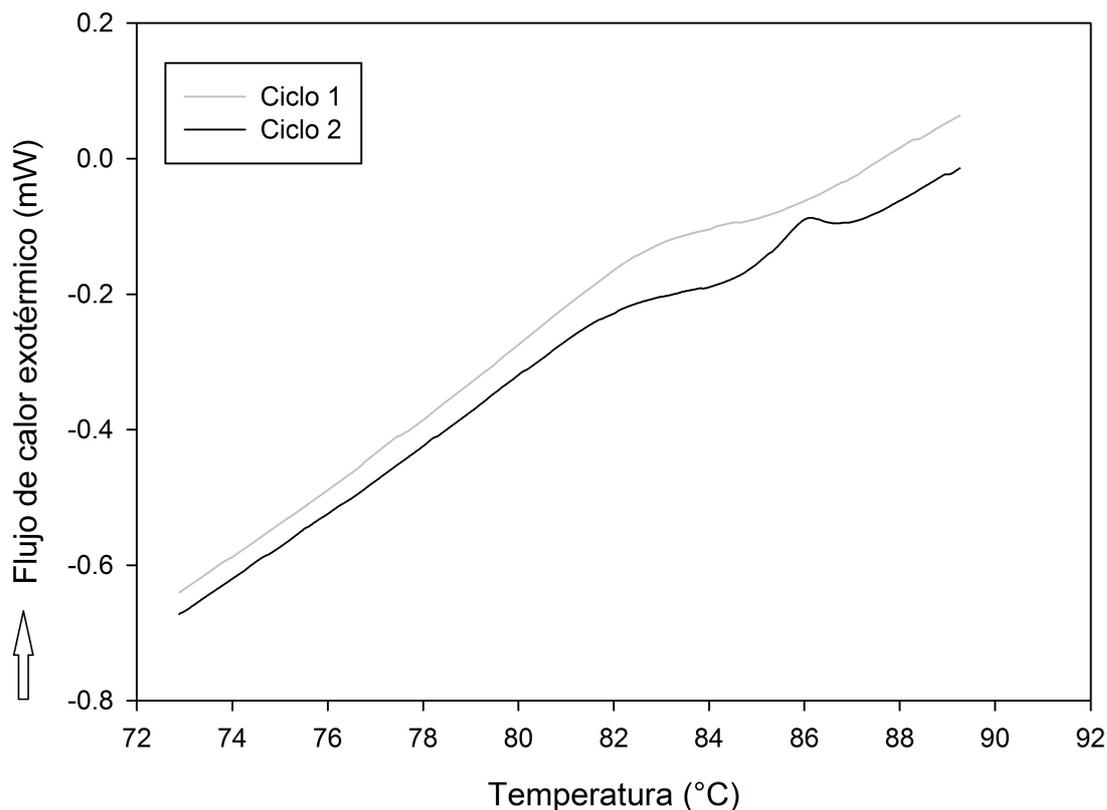


Figura 8. Termograma del almidón extraído con DMSO obtenido por  $\mu$ DSC en función de la temperatura en el ciclo de enfriamiento.



Figura 9. Almidón después de la prueba en microcalorimetría.

El espectro de Rayos X obtenido para el extracto de almidón, Figura 11, no tiene parecido con aquellos difractogramas reportados para las moléculas de amilosa y amilopectina por lo que se puede decir que no se obtienen las estructuras típicas de los cristales de amilosa y amilopectina, Figura 10.

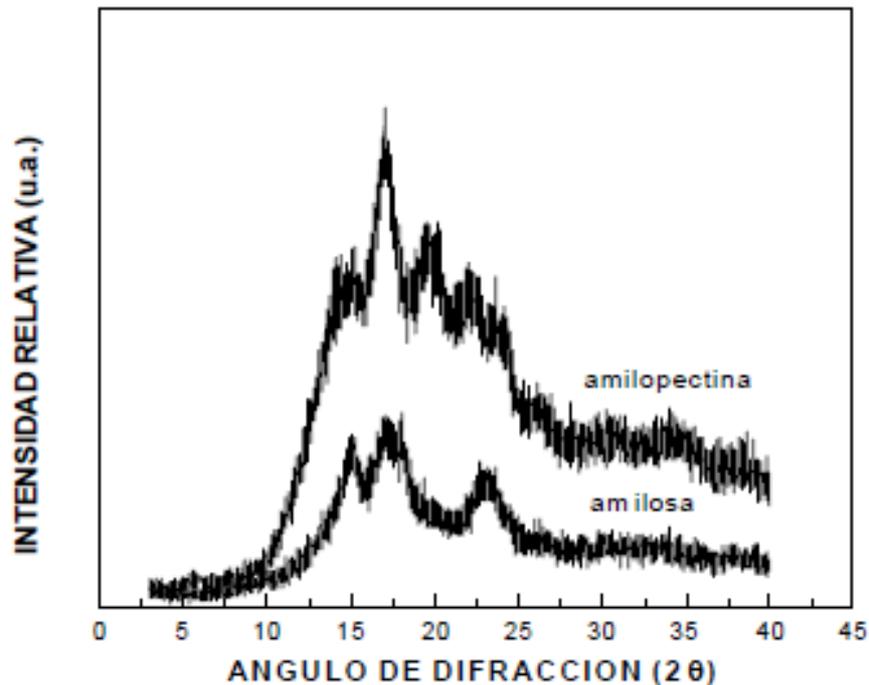


Figura 10. Espectro de rayos-X de amilosa y amilopectina (Rodríguez et al., 2001).

El espectro corresponde a una estructura V-amilosa, término genérico empleado para amilosas obtenidas como hélices individuales co-cristalizadas con compuestos tales como yodo, DMSO, alcoholes o ácidos grasos (Buléon et al., 1998). La matriz de pan de muerto con el que se trabajó contiene mantequilla y manteca de cerdo, por consiguiente la formación de complejos con amilosa desde la preparación del pan ya es posible. Si se toma en cuenta el tratamiento posterior para disolver el almidón con DMSO, así como la deshidratación con etanol (Putseys et al., 2010), existen tres tipos de complejos que resultan en el espectro obtenido; DMSO, etanol y ácidos grasos.

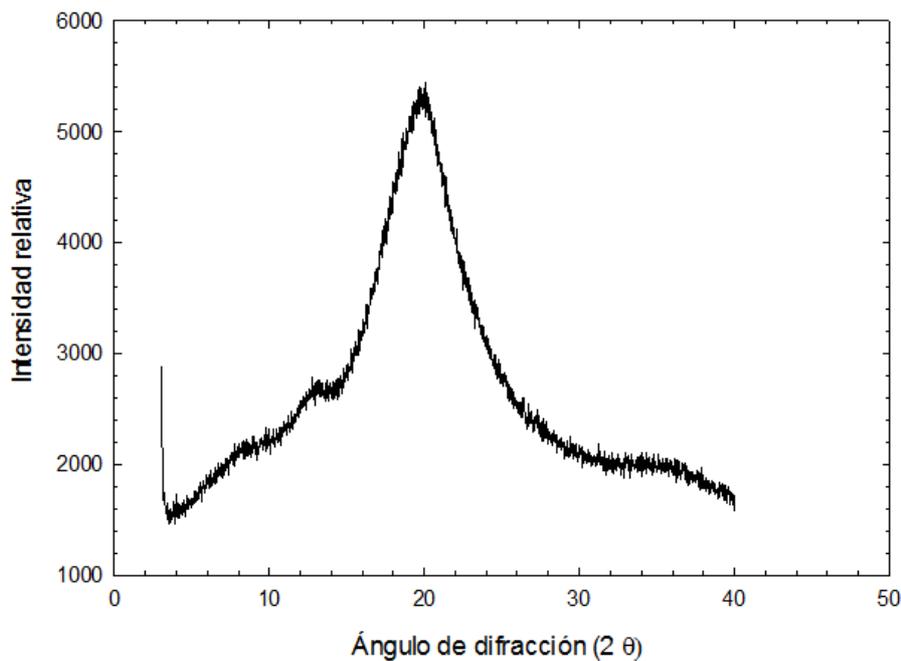


Figura 11. Difractograma del almidón extraído de la miga. Los ángulos de difracción en los cuales aparecen los picos (7.5°, 13° y 20°) son característicos del complejo V-amilosa (Buléon et al., 1998).

La separación del almidón de la miga se verificó realizando la prueba de iodo en la miga sin almidón obtenida de la disolución de la miga en DMSO, el color característico de complejo iodo-almidón permaneció escasos segundos indicando que la presencia de este compuesto es escasa o que el almidón se encuentra formando otros complejos, observado en el microscopio se encuentra lo que posiblemente sea almidón (Figura 12b).

La miga sin almidón obtenida de la disolución de la miga en DMSO también se estudió en el microcalorímetro. Las Figuras 13 y 14 muestran los patrones típicos obtenidos para las migas sin almidón a los diferentes días. En los ciclo de calentamiento se encuentran señales de picos exotérmicos y endotérmicos a diferentes temperaturas, lo cual puede deberse a que durante la aplicación de DMSO las uniones formadas entre las proteínas y el almidón se ven perturbadas por la formación del nuevo complejo de hélice, y después, al retirar las moléculas de almidón que le permitían mantener una estructura rígida, la proteína que permanece en la miga atraviesa por cambios espaciales condicionados por el estado termodinámicamente más estable que pueda alcanzar en tales condiciones (García & Olivares, 2004). Una vez que la miga se somete a aumentos de calentamiento en disolución ocurre nuevamente un reacomodo

aleatorio en la estructura de los residuos de proteína por lo que las señales de calentamiento no son repetibles.

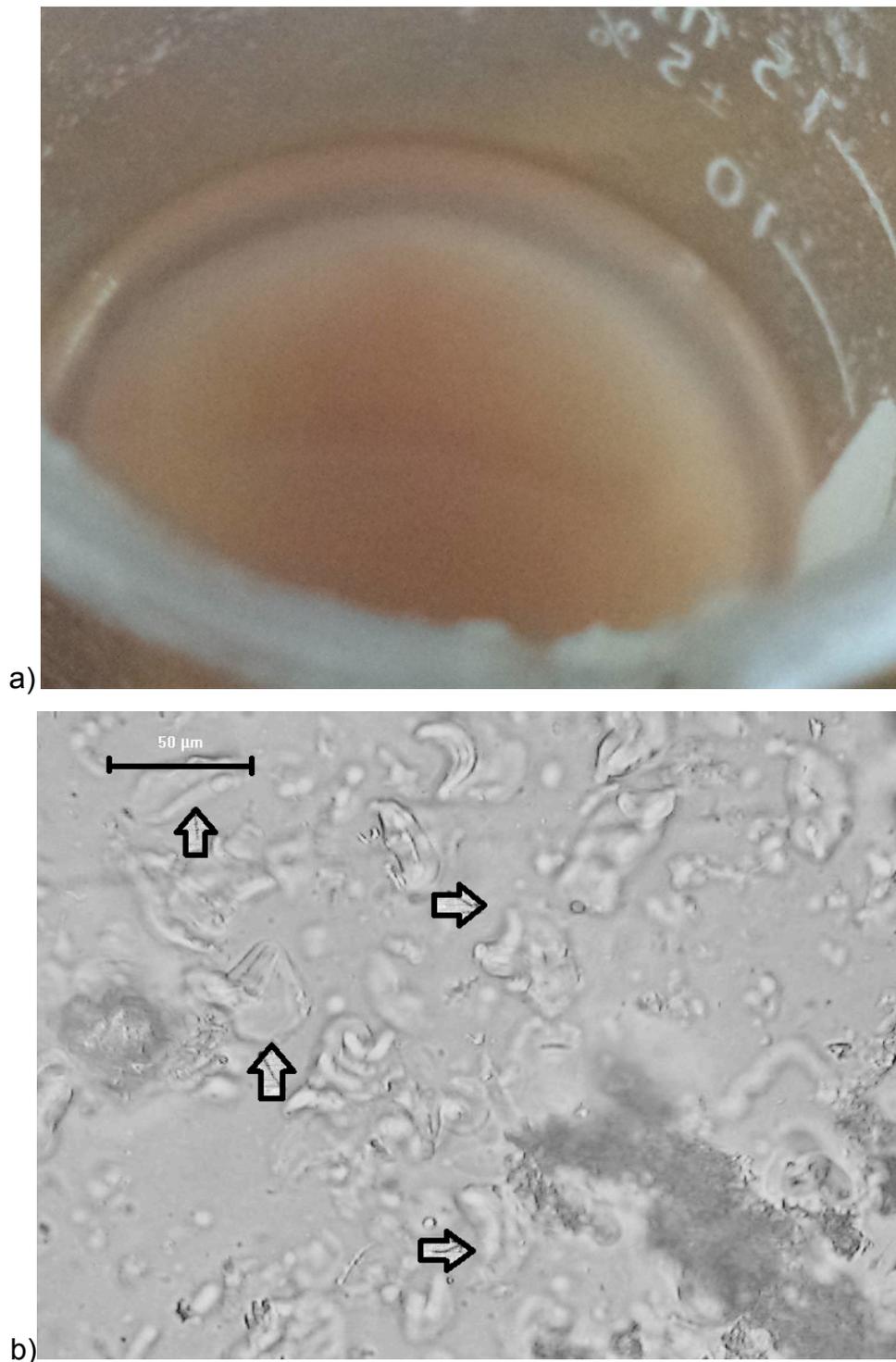


Figura 12. a) Prueba de yodo en la que apenas es detectable la presencia de almidón en la miga sin almidón y b) Micrografía a 40X de la miga sin almidón donde se señala con flechas lo que quizá sean restos de almidón.

En los ciclos de enfriamiento, Figura 13 y 14, se observa la misma señal encontrada para el extracto de almidón, por lo que una vez más no se descarta la presencia de remanentes de almidón en la miga sin almidón.

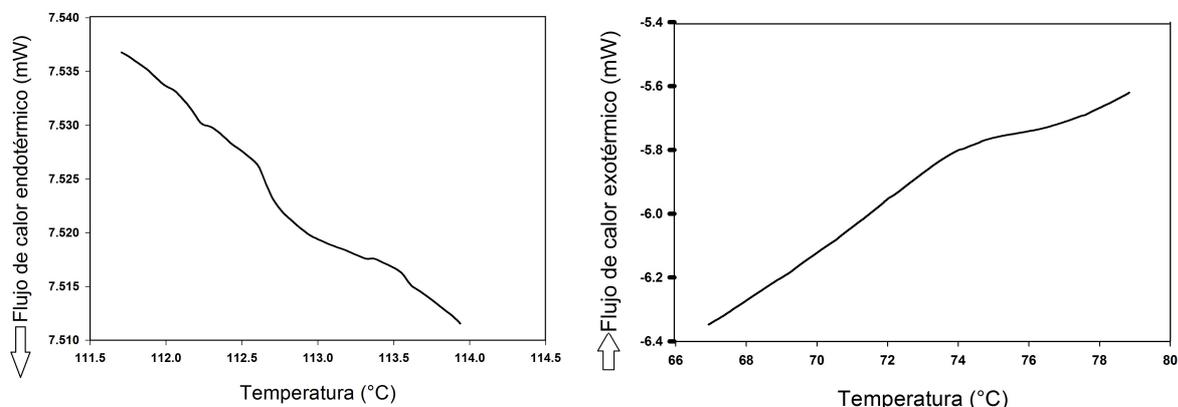


Figura 13. Termograma de la miga sin almidón con un ciclo de calentamiento (derecha) y enfriamiento (izquierda).

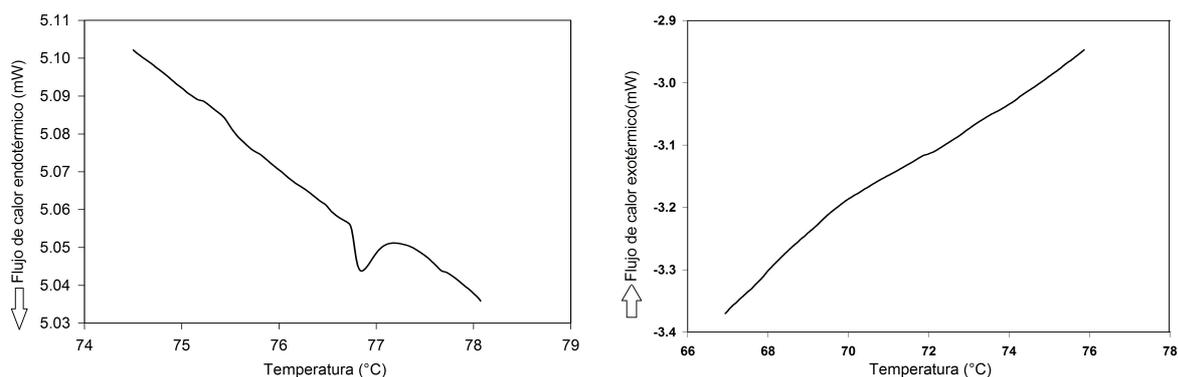


Figura 14. Termograma de la miga sin almidón. Los insertos amplían las señales de los ciclos de calentamiento (derecha) y enfriamiento (izquierda).

Tabla 3. Temperaturas de transición de los termogramas de las Figuras 13 y 14.

	Figura 13		Figura 14	
	Calentamiento	Enfriamiento	Calentamiento	Enfriamiento
$T_0$ (°C)	112.4	73.2	76.1	77.5
$T_p$ (°C)	113.0	69.5	76.5	73.6
$T_c$ (°C)	113.7	62.4	77.2	66.3
$\Delta H$ (J/g)	0.000346	0.051	0.000384	0.141

Las transiciones endotérmicas registradas en el ciclo de calentamiento de ambos termogramas se asocian a la proteína del trigo, a la ruptura de los nuevos enlaces disulfuro formados para estabilizar los agregados de proteínas después de la

pérdida de su estructura original durante el horneado. En la literatura se reporta que las proteínas del trigo tienen picos endotérmicos en el intervalo de temperaturas de 50-85 °C (Leon et al. 2003), por lo que la transición endotérmica de la Figura 14 correspondería a una proteína. Por otro lado la señal endotérmica de la Figura 15 se atribuye a la gelatinización del almidón.

Las señales detectadas en el ciclo de enfriamiento en el intervalo de 77.5-62.4 °C , Figuras 12 y 13, representan transiciones exotérmicas. En la literatura se han reportado señales exotérmicas para las gluteninas en el ciclo de enfriamiento en un intervalo de 50-80 °C aproximadamente (Leon et al., 2003). Por ello, estas señales se atribuyen a la proteína y no al almidón. Anteriormente, Figura 8, las señales registradas en un intervalo similar se atribuyeron a la amilosa, pero en la Figura 12a el compuesto que se forma con la miga sin almidón y la disolución de 0.2 % I<sub>2</sub>/2.0 % KI es característico del complejo amilopectina-yodo, rojo púrpura.

#### **4.1.1. Efecto de la adición de un agente entrecruzante en miga sin almidón**

Entre varios compuestos químicos utilizados para la reticulación de proteínas, el glutaraldehído ha sido ampliamente estudiado como un agente entrecruzante de proteínas en alimentos, textiles, medicina y otras aplicaciones industriales (Reddy et al., 2008). En alimentos se han explorado las influencias del entrecruzamiento sobre propiedades de la masa, y sobre las propiedades de producto horneado, volumen de la hogaza, textura y resistencia de la miga, con efectos en los tiempos de relajación (Gerrard et al., 2003). En este trabajo se estudió la miga liofilizada de pan para saber si el glutaraldehído ejerce algún efecto de entrecruzamiento sobre las fibras de proteína desnaturalizada que deben estar presentes en la miga sin almidón, la miga estudiada para esta prueba y las dos siguientes corresponde a miga sin almidón con adición de un agente entrecruzante.

En la Figura 15 se observa que el G' fue superior a G'', lo que significa que en ambas muestras el comportamiento elástico predominó. La adición de glutaraldehído contribuyó al carácter elástico manifestado por el aumento de G', posiblemente debido a la reacción de entrecruzamiento entre prolaminas, globulinas y gliadinas a través de sus residuos de lisina y tirosina, donde los grupos amino atacan a los grupos carbonilos provenientes del glutaraldehído,

favoreciendo así la formación de una estructura de red tridimensional y como consecuencia tiempos de relajación más largos (Mita & Bohlin 1983; Gerrard et al., 2002).

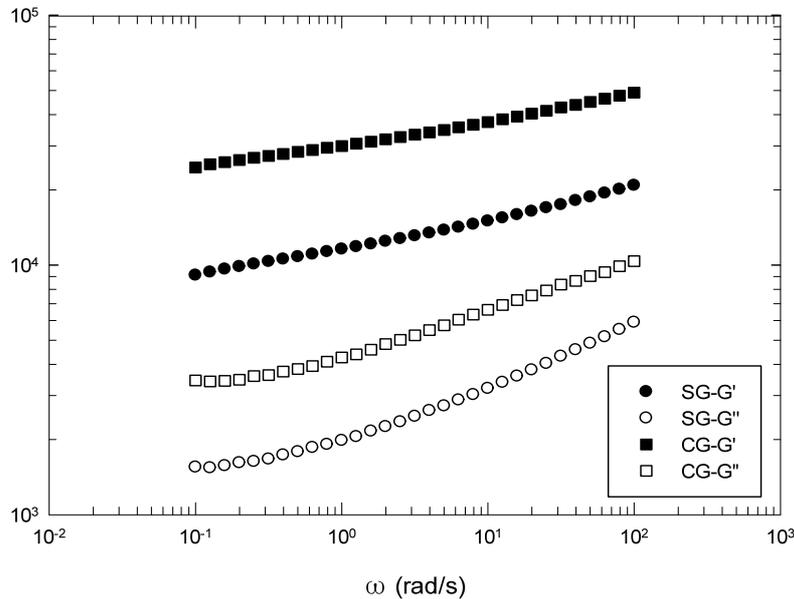


Figura 15. Barrido de frecuencia de miga de pan sin almidón tratada con glutaraldehído (CG) y miga de pan sin almidón sin tratamiento (SG).

#### 4.1.2. Efecto del tiempo de reacción con glutaraldehído

La reacción de entrecruzamiento con el agente entrecruzante y los grupos amino de las proteínas requiere un cierto tiempo para superar las barreras de la reacción y entrecruzar los polímeros (Reddy et al., 2008). Como se observa en la Figura 16, una hora de reacción no representa una diferencia notable en comparación con el control, i.e., sin tratamiento con glutaraldehído, lo que indica que el tiempo para que se lleve a cabo la reacción bajo las condiciones estudiadas deberá ser mayor, tal como se muestra a las 4 h de reacción, donde el aumento de los módulos se relaciona con el alcance de la formación de la red tridimensional.

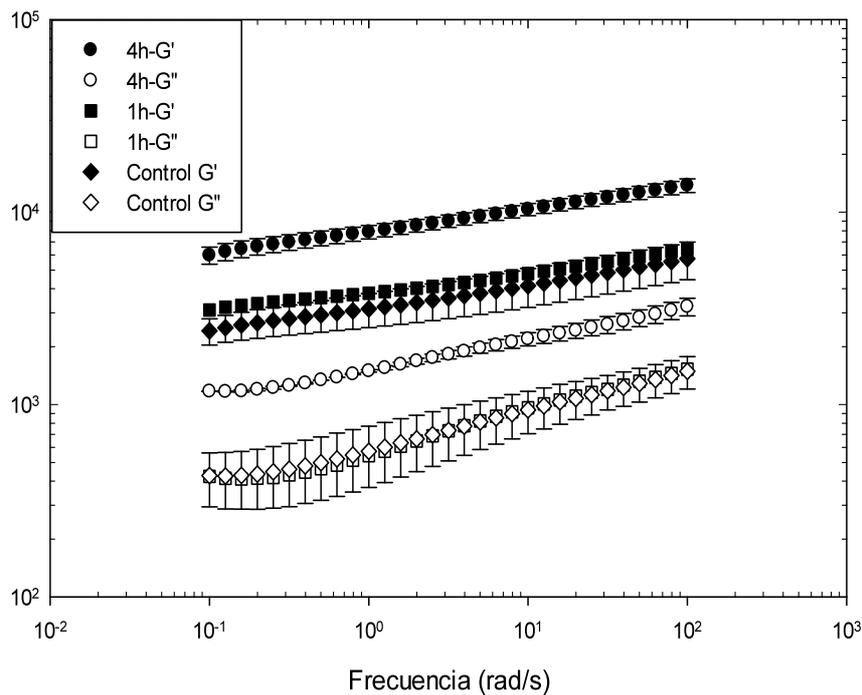


Figura 16. Barrido de frecuencia para miga de pan sin almidón tratada con glutaraldehído por 4 horas (4h) y 1 hora (1h) y miga de pan sin almidón sin tratamiento (control).

#### 4.1.3. Efecto de la concentración de glutaraldehído

En la Figura 17 se muestran dos diferentes concentraciones de glutaraldehído; 1000 y 2000 ppm. Para ambas condiciones a dos horas de reacción se observa un aumento de  $G'$  y  $G''$  en comparación con el control. Por ello, incluso a la concentración más baja, 1000 ppm, se pudieron aumentar los tiempos de relajación. Para una concentración de 2000 ppm la reacción de entrecruzamiento entre los residuos de las proteínas fue mayor que para 1000 ppm por lo que se requirió menos tiempo para lograr la formación de una red más articulada.

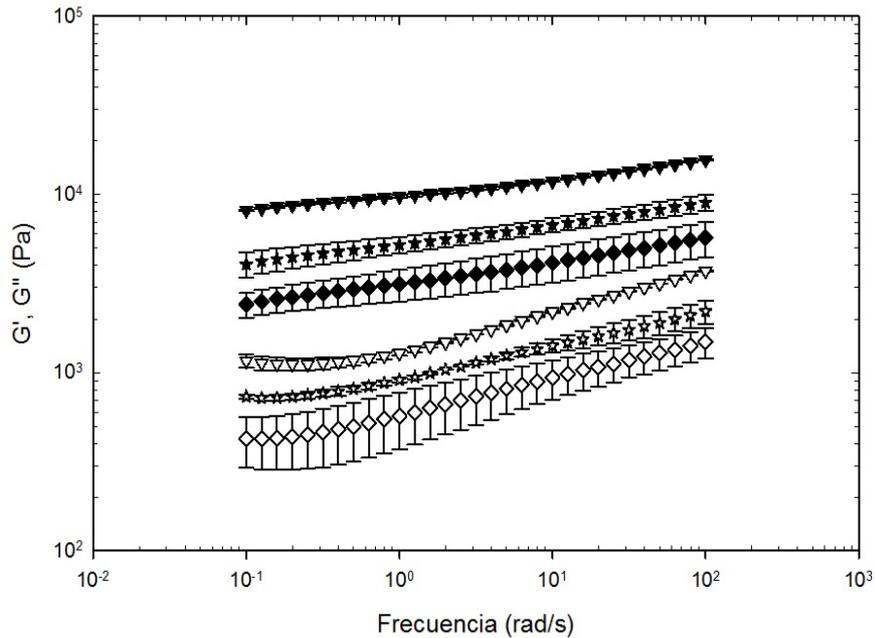


Figura 17. Barrido de frecuencia para miga de pan sin almidón tratada con 1000 ppm (estrellas) y 2000 ppm (triángulos invertidos) de glutaraldehído por dos horas y miga de pan sin almidón y sin tratamiento (control; diamantes).  $G'$  (símbolos llenos),  $G''$  (símbolos vacíos).

## 4.2. Estudio de los cambios en las moléculas de almidón

### 4.2.1. Por su disolución en KOH

Se ha reportado que el almidón gelatinizado libera las moléculas de amilosa en bajas concentraciones de un álcali. La concentración de 0.2 mol/L de KOH permite diferenciar entre almidones gelatinizados y crudos (Birch & Priestle, 1973). Los resultados de las migas liofilizadas almacenadas los días 0, 1 y 3 disueltas en KOH 0.2 mol/L se muestran en la Figura 18. La absorbancia para el día 0 a una longitud de onda de 600 nm, donde el complejo amilosa-yodo es estable, fue significativamente mayor que para los días 1 y 3; Tabla A.2. Esto se traduce como una mayor presencia de amilosa gelatinizada en el día 0 y una disminución de la solubilidad para los días 1 y 3 debido a la retrogradación de amilosa que ocurre desde el primer día de almacenamiento (Gray & BeMiller, 2003). El análisis estadístico muestra que para los días 1 y 3 no hubo diferencia significativa entre los valores de absorbancia a 600 nm, Tabla A.2, lo que significa que la reorganización completa de las moléculas de amilosa a su forma cristalina

se logra casi desde el día cero. Por ello los demás días lo que se obtiene como señal corresponde a regiones amorfas de amilopeptina que se logran disolver a esa concentración baja del álcali.

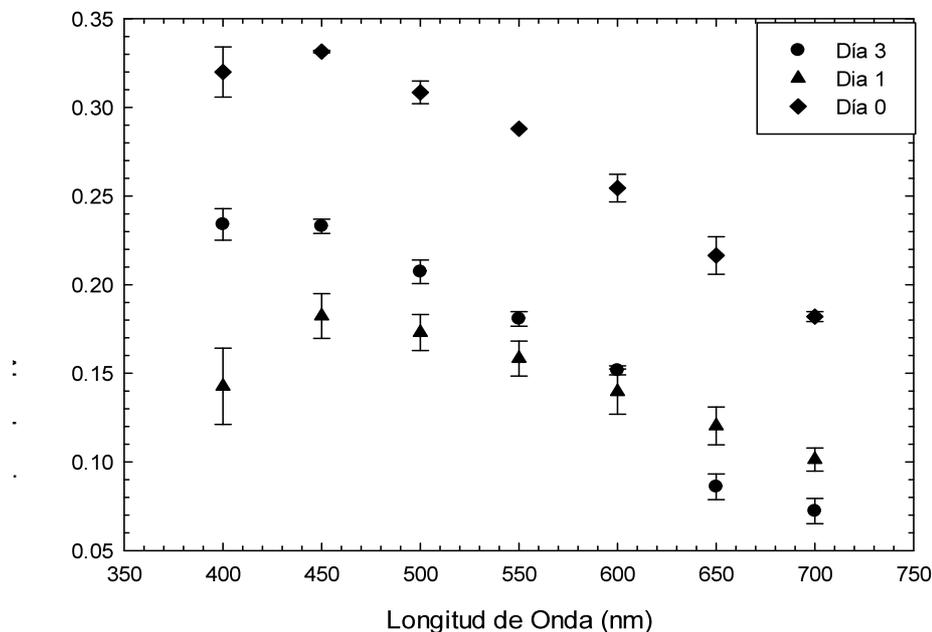


Figura 18. Espectros de absorción para la disolución de almidón soluble, amilosa, con KOH 0.2 mol/L en miga liofilizada almacenada 0, 1 y 3 días.

Por otro lado, la formación del complejo amilopeptina-yodo tiene un máximo de absorción en el intervalo de 530-540 nm (Guraya & Toledo, 1993). El tratamiento con KOH 2.0 mol/L para la miga liofilizada durante los diferentes días de almacenamiento se muestra en la Figura 18. Es visible que para las tres muestras el pico de absorbancia máximo se encuentra alrededor de 550 nm lo cual significa que la amilopeptina se encuentra en mayor proporción que la amilosa. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa en la cantidad de almidón disuelto en KOH 2.0 mol/L por lo que este método no permitió observar la evolución de la retrogradación de la amilopeptina conforme transcurrieron los días de almacenamiento (Tablas A.3 y A.4).

El método empleado para el seguimiento de la amilosa y la amilopeptina con los días de almacenamiento de la miga por disolución en KOH en concentraciones de 0.2 y 2.0 mol/L no resultó adecuado, ya que cuando se empleó KOH 0.2 mol/L para días diferentes de cero se encontraron señales de amilosa-yodo a 600 nm y sin diferencia significativa. Lo mismo sucedió cuando se usó KOH 2.0 mol/L,

donde la retrogradación lenta de la molécula de amilopectina no se logró detectar durante los días de almacenamiento estudiados.

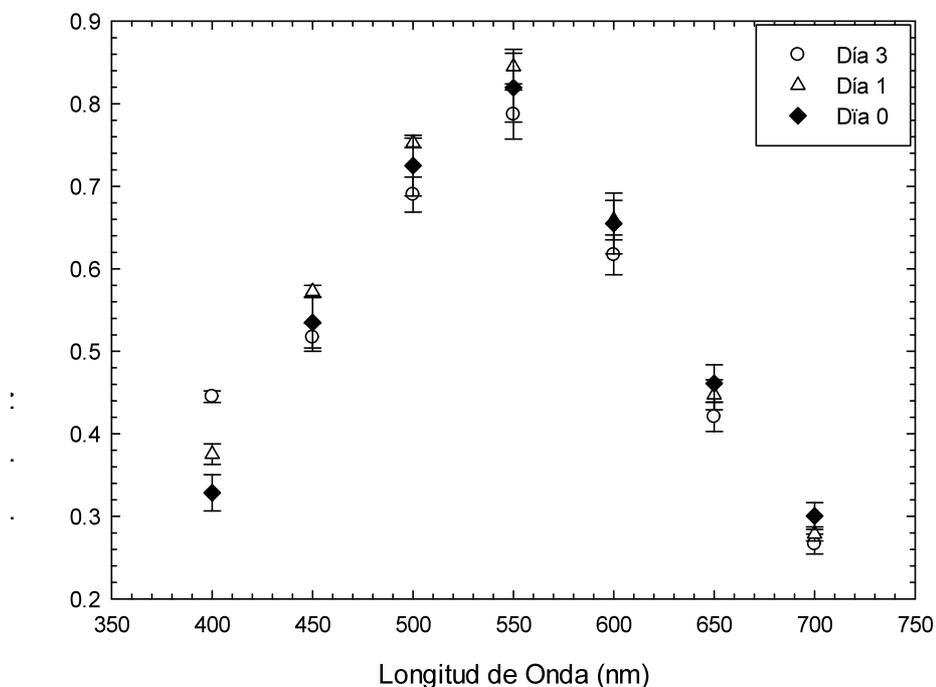


Figura 19. Espectros de absorción para la disolución de almidón insoluble con KOH 2.0 mol/L en miga liofilizada almacenada 0, 1 y 3 días.

#### 4.2.1. Por su hidrólisis enzimática

##### 4.2.1.1. Análisis térmico de la miga liofilizada

La Tabla 4 muestra los resultados del análisis térmico en  $\mu$ DSC en el ciclo de calentamiento llevado a cabo a diferentes concentraciones de agua para la miga liofilizada; en el día 0 (Mq0) y la almacenada en el día 8 (Mq8). En ambas migas se obtuvieron señales de retrogradación de almidón. Los picos endotérmicos se encuentran entre 43–47 °C, que son valores cercanos a los observados para el intervalo de fusión de cristales de amilopectina; 50-70 °C (Hug-Iten et al., 2003). Esta señal puede incluir también una transición vítrea, la cual es siempre menos notable (Biliaderis, 1991). La recristalización de la amilopectina depende considerablemente del historial de la muestra, ya que tanto el calentamiento inicial

durante la cocción como el envejecimiento subsiguiente durante el almacenamiento son procesos de no-equilibrio (Slade et al., 1991).

Los resultados obtenidos para los diferentes contenidos de humedad señalan una diferencia en la forma de organización de los cristales de almidón durante la retrogradación. En la Tabla 4 se observa que las temperaturas  $T_0$ ,  $T_p$  y  $T_f$  de la miga al día 0 estuvieron en un intervalo de 36.3-42.2, 43.2-44.4 y 49.2-50.6 °C, respectivamente. El intervalo de temperaturas de transición,  $(T_f-T_0)$ , fue 7.0-14.3 °C. Por otro lado, las temperaturas  $T_0$ ,  $T_p$  y  $T_f$  de la miga almacenada al día 8 estuvieron en un intervalo de 39.4-40.8, 44.8-47.3, y 50.0-54.4 °C, respectivamente. El intervalo de temperatura de transición,  $(T_f-T_0)$ , fue 10.6-14.1 °C. Las temperaturas de transición  $T_0$ ,  $T_p$  y  $T_f$  de la miga al día 0 son de 3.6 a 9.4 % menores que la almacenada al día 8. Esto indica que la fusión de los cristales en la miga al día 0 es más rápida que en los cristales de miga con moléculas de almidón más ordenadas. Las temperaturas  $T_p$  y  $T_f$  de la miga almacenada al día 8 disminuyen de 44.8 a 45.8 °C y de 50.0 a 53.5, respectivamente, con el aumento en el contenido de agua. Asimismo, con este incremento de humedad, la diferencia  $T_f-T_0$  disminuye de 14.1 a 10.6 °C. De forma similar,  $T_p$  y  $T_f$  de la miga al día 0 disminuyen sus valores de 0.2 a 1.4 °C en comparación con  $T_f-T_0$  que va de 14.3-7.0 °C.

Contenidos de humedad mayores provocaron un aumento de  $T_0$  en la miga al día 0. Esto sugiere una diferencia de comportamiento al inicio de la fusión de los cristales en relación con la miga almacenada al día 8. La similitud de valores sugiere que el inicio de la fusión de los cristales ocurre por un mecanismo equivalente.

El cambio de entalpía en la miga al día 0 fue 0.424 J/g. Este valor fue el máximo en las pruebas realizadas a la menor humedad, 60 %, y disminuyó a 0.086 J/g conforme aumentó el contenido de agua. En la miga almacenada al día 8 se observan también valores menores de entalpía para contenidos menores de humedad. La matriz de pan tradicional no es homogénea y la variación entre los valores de entalpía se puede explicar con base en la existencia de zonas más ordenadas y por lo tanto con estructuras más complejas que requieren más energía para modificar su orden molecular.

La simetría de la transición tiende a ser mayor conforme aumenta la cantidad de miga en el día 0. Este comportamiento podría indicar una diferencia en el

crecimiento y distribución de los cristales. Además, también está presente en la miga almacenada al día 8, Sin embargo, en este caso la simetría es mucho mayor para las diferentes cantidades usadas, lo que indicaría un crecimiento más homogéneo y por lo tanto más organizado que resultaría del hecho de que las moléculas de almidón han tenido mayor tiempo para organizarse.

Los valores de entalpía reflejan la destrucción de las dobles hélices de amilopectina que componen las regiones cristalinas del polímero (Ottenhof & Farhat, 2004). Las bajas entalpías se pueden explicar si se considera una fusión incompleta del material cristalino (Biliaderis et al., 1985).

Tabla 4. Resultados de  $\mu$ DSC para el ciclo de calentamiento.

	Prueba [Miga]	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$\Delta T$ (°C)	$\Delta T_1$ (°C)	$\Delta T_2$ (°C)
Mq0	40 %	36.3	43.5	50.6	0.424	14.3	7.2	7.0
	20 %	37.3	44.4	49.4	0.194	12.1	7.1	4.9
	15 %	42.2	43.2	49.2	0.086	7.0	1.0	6.0
Mq8	40.50 %	39.4	45.8	53.5	0.306	14.1	6.5	7.7
	35 %	40.8	47.3	54.4	0.537	13.6	6.5	7.1
	20 %	39.4	44.8	50.0	0.137	10.6	5.5	5.1

Nota.  $\Delta T = T_f - T_0$ ,  $\Delta T_1 = T_p - T_0$ ,  $\Delta T_2 = T_f - T_p$

La Tabla 5 corresponde a los valores de los picos exotérmicos obtenidos en el ciclo de enfriamiento y se encuentra en el mismo intervalo de temperatura que los eventos térmicos observados para el extracto de almidón y la miga sin almidón, también aquí se atribuye a la formación de un gel y se relaciona la cantidad de cristales en la miga con el aumento en los valores de entalpía, porque una cantidad mayor de cristales sin fundir por completo se organizan más rápidamente para producir una agregación de moléculas que dan lugar a la red tridimensional responsable de la gelificación (Doublier et al., 1992).

Tabla 5. Resultados de  $\mu$ DSC para el ciclo de enfriamiento.

Miga	Prueba [Miga]	$T_0$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
Mq0	40 %	85.0	82.4	78.0	0.177
	20 %	78.2	76.0	72.1	0.130
	15 %	77.4	74.6	70.0	0.108
Mq8	40.50 %	85.5	83.2	79.0	0.301
	35 %	83.2	81.3	76.7	0.358
	20 %	77.9	75.7	71.8	0.148

#### 4.2.1.2. Difractogramas de la miga liofilizada, día 0 (Mq0) y día 8 (Mq8)

En las Figuras 18 y 19 se muestra el diagrama de difracción de rayos X obtenido para las muestras de miga liofilizada Mq0 y Mq8, respectivamente. Los difractogramas de ambas migas muestran patrones tipo-V; picos a 7.5 y 20°. Este último pico es característico de la presencia del complejo amilosa-lípido cuya formación es facilitada cuando ocurre la lixiviación de la amilosa del gránulo de almidón durante el horneado (Putseys et al., 2010). Además, muestran también señales correspondientes al patrón cristalino tipo-B, picos a 17°, formados por la retrogradación de la amilopectina durante el envejecimiento del pan (Martin et al., 1991).

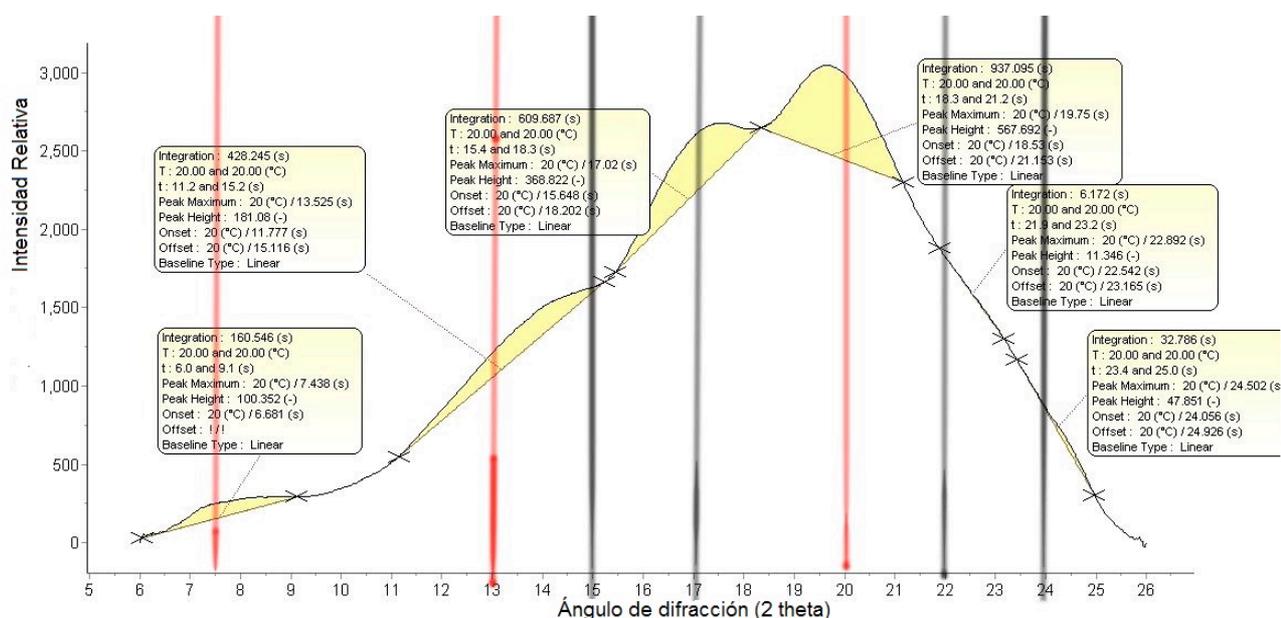


Figura 20. Difractograma de la miga liofilizada Mq0

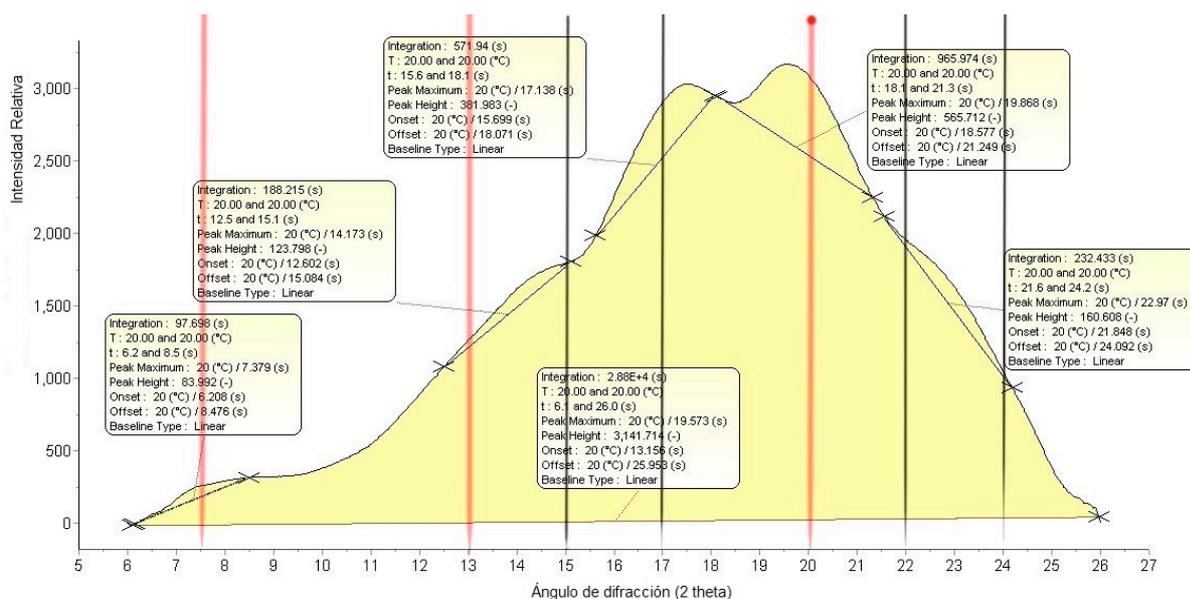


Figura 21. Diffractograma de la miga liofilizada Mq8.

El desarrollo de los patrones de difracción tipo-A o tipo-B durante el envejecimiento del pan depende de la cantidad de agua presente. Para contenidos de agua superiores a 43% se desarrolla el patrón tipo-B, mientras que contenidos de agua inferiores a 29% conducen al desarrollo del patrón tipo-A (Martin et al., 1991). Es así como en la miga Mq8 el pico a 23°, Figura 19, se atribuye al patrón de difracción tipo-B, al ser un pico bastante amplio ubicado entre los grados característicos de este patrón de difracción y porque las condiciones de almacenamiento no fueron tales que provocaran una disminución tan pronunciada en el contenido de humedad.

En la Tabla 6 se muestra un incremento de la cristalinidad tipo-B para la miga Mq8, es decir, que la cristalinidad aumentó durante el almacenamiento. También durante este periodo ocurrió una transformación de los cristales tipo V a tipo B, lo que explicaría la disminución de los porcentajes de cristalinidad para los picos a 7.5 y 20° para Mq0 y Mq8, Tabla 6 (Eliasson, 2012).

En consecuencia, la organización cristalina de las muestras de miga Mq0 y Mq8 puede ser descritas como una mezcla de estructuras tipo-V y tipo-B (Hug-Iten et al., 2003). También se puede observar por el pico a 14° ubicado entre señales características para ambos patrones; 13 y 15°, patrón-V y patrón B, respectivamente.

Tabla 6. Porcentajes de cristalinidad de los picos obtenidos para cada miga.

Ángulos típicos	Miga				
	Mq0		Mq8		
	Porcentaje de cristalinidad				
	Tipo-B	Tipo-V	Tipo-B	Tipo-V	Tipo-A
7.5		7.52		4.75	
14	20.07		9.15		
17	28.58		27.81		-
20		43.83		46.98	
23			11.30		
<b>total (%)</b>	28.58	51.35	39.11	51.73	-

#### 4.2.1.3. Grado de retrogradación (DG)

Para evaluar el grado de retrogradación se empleó la enzima  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* debido a que es específica para almidón gelatinizado, y por analogía, se considera que el almidón retrogradado posee una estructura muy similar al almidón nativo (Tsuge et al., 1992).

El porcentaje de retrogradación (%DG) para la miga liofilizada Mq0 fue de  $1.314 \pm 0.021$  con un C.V de 1.589 y el de la miga liofilizada Mq8  $1.756 \pm 0.187$  con un C.V de 10.642, el análisis estadístico de varianza, Tabla A.5, muestra que existe diferencia significativa entre los %DG obtenidos. Los valores promedio cercanos entre sí coinciden con los resultados obtenidos en DSC y difracción de rayos-X. Ambas muestras presentan señales de retrogradación aunque para más días de almacenamiento, Mq8, el porcentaje de retrogradación es solo ligeramente mayor, probablemente por las condiciones favorables de almacenamiento y una cantidad importante de lípidos en la formulación del pan (Gray & BeMiller, 2003; Eliasson, 2012).

Los resultados obtenidos por DSC, rayos X y el método enzimático indican la presencia de estructuras cristalinas en ambos tiempos de almacenamiento. Se esperaba que para el día 0 los componentes principales del pan, gluten y almidón, se encontraran en estado amorfo y solo se detectara la presencia de cristales tipo-V, por el complejo amilosa-lípido. Una primera explicación para la presencia de estructuras cristalinas en Mq0 podría ser que durante el calentamiento, debido a una limitada cantidad de agua en el sistema, una pequeña fracción de gránulos

quedará en estado cristalino. Por otro lado, el estudio del pan de tradición se llevó a cabo empleando muestras liofilizadas, así que durante la congelación la temperatura podría haberse desplazado hacia valores ligeramente mayores que  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T_g$ ) y ocasionar una muy leve nucleación que no se logró inhibir por completo (Slade et al., 1991). Aunque en la práctica no se ha encontrado cristalización de almidón en sistemas con bajo contenido de humedad almacenadas por debajo de la temperatura ambiente (Slade et al., 1991), el tiempo de almacenamiento podría ser el suficiente para generar organizaciones de las moléculas del sistema apenas perceptibles.

## CONCLUSIONES

La extracción de almidón de una matriz de pan de tradición es posible mediante el uso de DMSO, con la metodología descrita se obtiene almidón en estado amorfo por lo que no hay señales detectables de retrogradación por  $\mu$ DSC.

Se encontró que la miga sin almidón se ve afectada por la reacción de entrecruzamiento por el glutaraldehído. Bajo las condiciones estudiadas el aumento del tiempo de reacción y la concentración favorecen la reticulación.

El método colorimétrico para el estudio de las moléculas de almidón resultó poco satisfactorio pues no permite establecer claramente los cambios ocurridos entre los días de almacenamiento, al contrario que con el método enzimático que junto con el análisis en DSC y rayos-X proporciona información sobre la evolución de la estructura cristalina y un indicador del grado de retrogradación general para la matriz de almidón a diferentes días de almacenamiento.

## REFERENCIAS

- Abd Karim, A., Norziah, M.H., & Seow, C.C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry* 71, 9-36.
- Biliaderis, C. G., Page, C. M., Slade, L., & Sirett, R. R. (1985). Thermal behavior of amylose-lipid complexes. *Carbohydrate Polymers* 5 (5), 367-389.
- Biliaderis, C.G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69, 60-78.
- Birch, G. G., & Priestley, R. J. (1973). Degree of gelatinisation of cooked rice. *Starch-Starke* 25, 98-100.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., & Ball, S. (1997). Starches from A to C (*Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin cristal). *Plant Physiology* 3 (115), 949-957.
- Buléon, A., Véronèse, D. G., & Putaux, J. L. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian Journal of Chemistry* 60, 706-718.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2010). *Química de los alimentos* (3ª edición). Zaragoza: Acribia.
- Doublier, J. L. & Choplin, L. (1989). A rheological description of amylose gelation. *Carbohydrate Research* 193, 215-226.
- Doublier, J. L., Côté, I., Llamas, G. & Charlet, G. (1992). Effect of thermal history on amylose gelation. *Progress in Colloid & Polymer Science* 90, 61-65.
- Eliasson, A. C. "Wheat Starch Structure and Bread Quality." In *Breadmaking improving quality*, by S. P Cauvain, 130-135. Woodhead Publish Limited, 2012.
- Fadda, C., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Collar, C., & Piga, A. (2014). Bread Staling: Updating the View. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 473-492.
- García, C.S.L., & Olivares, Q.L. (2004). Plegamiento de las proteínas: un problema interdisciplinario. *Revista de la Sociedad Química de México* 48, 95-105.

- Gerrard, J. A., & Brown, P.K. (2002). Protein crosslinking: Mechanisms, consequences, applications. *International Congress Series 1469*, 201-205.
- Gerrard, J. A., Brown, P. K., & Fayle, S. E. (2003). Maillard crosslinking of food proteins III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. *Food Chemistry 80*, 45-50.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology 16*, 12–30 .
- Gray, J. A. & BeMiller, J. N. (2003). Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety 2*, 1-21.
- Guraya, H., & Toledo, R. (1993). Determining gelatinized starch in a dry starchy product. *Journal of Food Science 58*, 888–889.
- Hug-Iten, S., Escher, F. & Conde-Petit, B. (2003). Staling of Bread: Role of Amylose and Amylopectin and Influence of Starch-Degrading Enzymes. *Cereal Chemistry 80* (6), 654–661.
- Jackson, DS. (1991). Solubility behavior of granular corn starches in methyl sulfoxide (DMSO) as measured by high-performance size-exclusion chromatography. *Starch/Stärke 43*, 422–7.
- Keetels, C. J. A. M., van Vliet, T., & Walstra, P. (1996). Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: Gelation. *Food Hydrocolloids 10*(3), 363-368. .
- Kulp, K., Ponte, J.G. Jr., & D'Appoloni, B. L. (1981). Staling of white pan bread: fundamental causes. *Critical Review in Food Science and Nutrition 15*(1), 1-48.
- Leon, A., Rosell, C. M. & Benedicto de Barber, C. (2003). A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *Eur Food Res Technol 217*, 13-16.
- Lindsay, M. P., & Skerritt, J. H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology 10*, 247-253.
- Martin, M. L., Zeleznak, K. J., & Hosney, R. C. (1991). A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry 5* (68), 498–503.
- Matignon, A., & Tecante, A. (2016). Starch retrogradation: From starch components to cereal products. *Food Hydrocolloids 68*, 1-10.

- Miles, M. J., Morris, V. J., & Ring S. G. (1985). Gelation of amylose. *Carbohydrate Research* 135, 257-269 .
- Mita, T., & Bohlin, L. (1983). Shear stress relaxation of chemically modified gluten. *Cereal Chemistry* 60 (2), 93-97.
- Ottenhof, M.A & Farhat, I. A. (2004). Starch Retrogradation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 21, 215-228.
- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A. and Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science* 54, 266-279 .
- Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science* 51, 238-247 .
- Rao, A. M. (2007). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications* (2<sup>a</sup> ed.). Whashington: Springer.
- Rayas-Duarte, P. (2012). Bread staling . In S. P. Cauvain, *Breadmaking Improving Quality* (2<sup>a</sup> edición ed., pp. 580-596). UK: Woodhead Publishing Limited.
- Reddy, N., Tan, YC., Li Y., & Yang, Y.Q. (2008). Effect of glutaraldehyde crosslinking conditions on the strength and water stability of wheat gluten fibers. *Macromolecular Materials Engineering* 293 (7), 614-620.
- Rodríguez, P., San Martín, M.E., & González de la Cruz, G. (2001). Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Sociedad Mexicana de Ciencia de Superficies y de Vacío* 13, 61–65.
- Slade, L., Levine, H., & Reid, D. S. (1991). Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *CRC Critical Review Food Science Nutrition* 30 (2-3), 115-360.
- Shewry, P. R., Tatham, A. S., & Lazzeri, P. (1997). Biotechnology of Wheat Quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 397–406.
- Svegmark, K., Kidman, S., & Hermansson, A. M. (1993). Molecular structures obtained from mixed amylose and potato starch dispersions and their rheological behaviour. *Carbohydrate Polymers* 22 (1), 19-29.
- Tsuge, H., Hishida, M., Iwasaki, H., Watanabe, S., & Goshima, G. (1990). Enzymatic evaluation for the degree of starch retrogradation in foods and foodstuffs. *Starch/Starke* 42 (6), 213-216.

- Tsuge, H., Tatsumi, E., Ohtani, N., & Nakazima, A. (1992). Screening of  $\alpha$ -Amylase Suitable for Evaluating the Degree of Starch Retrogradation. *Starch/Starke* 44 (1), 29-32.
- Vermeulen, R., Derycke, V., Delcour, J. A., Goderis, B., Reynaers, H., & Koch, M. H. J. (2006b). Gelatinization of starch in excess water: Beyond the melting of lamellar crystallites. A combined wide- and small-angle X-ray scattering study. *Biomacromolecules* 7(9), 2624-2630.
- Wang, S.J., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14, 568-585.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24, 115–119.
- Zhou X., Chung H-J., Kim J-Y., Lim S-T. (2013). In vitro analyses of resistant starch in retrograded waxy and normal corn starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 113– 117.

## ANEXO A

### Análisis estadístico

Tabla A.1 Análisis estadístico para las absorbancias a 600 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento disueltas en KOH 0.2 mol/L.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0213	2	0.0107	102.06	2.3283E-05	5.1432
Dentro de los grupos	0.0006	6	0.0001			
Total	0.0219	8				

Tabla A.2. Análisis de diferencia mínima significativa para las absorbancias obtenidas a 600 nm de migas liofilizadas almacenadas a diferentes días (Día 0-D0-, Día 1 -D1- y D3 -D3-) disueltas en KOH 0.2 M.

Comparación de medias	Diferencia	n tratamiento 1	n tratamiento 2	S comparaciones	Diferencia Mínima Significativa					
					Intervalo				Conclusión	
$\mu_{D0}-\mu_{D1}$	0.109	3	3	0.008	0.088	<	$\mu_0-\mu_1$	<	0.129	H1
$\mu_{D0}-\mu_{D3}$	0.097	3	3	0.008	0.076	<	$\mu_0-\mu_3$	<	0.117	H1
$\mu_{D3}-\mu_{D1}$	0.012	3	3	0.008	0.008	<	$\mu_3-\mu_1$	<	0.032	H0

Nota: H1-Existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos y H0-No se encontró diferencia significativa entre la media de los tratamientos.

Tabla A.3. Análisis estadístico para las absorbancias a 600 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento disueltas en KOH 2.0 mol/L.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0310	2	0.01552	2.6937	0.1463	5.1433
Dentro de los grupos	0.0346	6	0.0058			
Total	0.0656	8				

Tabla A.4. Análisis estadístico para las absorbancias a 550 nm de las migas a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento en KOH 2.0 mol/L.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0311	2	0.0155	2.6937	0.1463	5.1433
Dentro de los grupos	0.0346	6	0.0058			
Total	0.0657	8				

Tabla A.5. Análisis estadístico para el DG% de las migas a los días 0 y 8 de almacenamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.2936	1	0.2936	16.5991	0.0152	7.7087
Dentro de los grupos	0.0708	4	0.0177			
Total	0.3643	5				