



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del grado de retrogradación del almidón, en el contenido de fibra dietética, en masa y tortilla de maíz blanco nixtamalizado.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A  
**MARÍA GUADALUPE LUISILLO HERNÁNDEZ**



MÉXICO, D.F.

2014



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:** Francisca Aida Iturbe Chiñas

**VOCAL:** Lucía Cornejo Barrera

**SECRETARIO:** Arturo Navarro Ocaña

**1er. SUPLENTE:** Inés Miranda Martínez

**2do. SUPLENTE:** Iliana Elvira González Hernández

Trabajo realizado en los laboratorios 322 y 323 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, D.F.

Asesor del tema: Francisca Aida Iturbe Chiñas

\_\_\_\_\_

Supervisor técnico: Bertha Julieta Sandoval Guillén

\_\_\_\_\_

Sustentante: María Guadalupe Luisillo Hernández

\_\_\_\_\_

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Introducción.....	1
Hipótesis.....	3
Objetivos .....	3
Objetivo general .....	3
Objetivos particulares.....	3
1 Marco teórico.....	4
1.1 Fibra dietética.....	5
1.1.1 Componentes en la fibra dietética.....	7
1.1.2 Determinación de fibra dietética.....	8
1.2 Almidón .....	11
1.2.1 Amilosa .....	13
1.2.2 Amilopectina .....	14
1.2.3 Gelatinización .....	15
1.2.4 Retrogradación .....	18
1.3 Almidón resistente.....	19
1.3.1 Determinación de almidón resistente.....	22
1.4 Fundamentos para el desarrollo del protocolo de determinación de almidón .....	24
1.4.1 Solubilización diferencial.....	26
1.4.2 Selección de longitud de onda.....	27
2 Metodología.....	30
2.1 Desarrollo del protocolo de determinación de almidón por solubilización diferencial y complejación con yodo .....	30
2.1.1 Curva patrón .....	31
2.1.2 Evaluación de variables en la complejación .....	31
2.1.2.1 Solubilización del almidón.....	31
2.1.2.2 Efecto de las sales en la cuantificación del complejo almidón-yodo.....	33

2.1.3	Condiciones para retrogradación .....	34
2.2	Implementación del protocolo para determinar almidón en la muestra .	35
2.3	Evaluación de la retrogradación.....	36
2.4	Determinación del contenido de fibra dietética.....	36
3	Resultados y discusión.....	38
3.1	Curva patrón .....	38
3.2	Variables de complejación .....	39
3.2.1	Solubilidad .....	39
3.2.2	Tiempo de solubilización para almidón en KOH 2.0 M .....	40
3.2.3	Recobro de almidón en KOH 2.0 M .....	41
3.2.4	Efecto del cloruro de potasio .....	42
3.3	Condiciones para promover la retrogradación .....	43
3.3.1	Refrigeración .....	43
3.3.2	Ciclos congelación/descongelación .....	46
3.4	Cuantificación de almidón en masa y tortilla de maíz blanco nixtamalizado .....	48
3.5	Retrogradación.....	49
3.5.1	Tortilla almacenada en empaque plástico.....	50
3.5.2	Tortilla almacenada en papel.....	52
3.5.3	Masa almacenada en papel.....	55
3.6	Fibra dietética.....	59
3.6.1	En masa y tortilla evaluando efecto térmico .....	59
3.6.2	En masa evaluando efecto de ciclos de temperatura .....	61
3.6.3	En tortilla evaluando efecto de ciclos de temperatura.....	63
	Conclusiones.....	64
	Bibliografía .....	65
	Apéndice .....	68

## Introducción

El concepto de fibra dietética ha sido tema de discusión a través de los años; su modificación ha implicado cambios en la metodología para su cuantificación. La determinación de fibra dietética consta en una primera parte de una hidrólisis enzimática de proteínas e hidratos de carbono o carbohidratos<sup>1</sup> digeribles, componentes que no son considerados dentro de la fibra. Sin embargo, se ha observado que, con la mayoría de los procedimientos establecidos, se incluye en la determinación a una fracción del almidón (actualmente conocida como almidón resistente) que tras varios estudios se incorporó al concepto por poseer propiedades similares a la fibra dietética.

La retrogradación del almidón es un fenómeno complejo ampliamente estudiado, principalmente en el ámbito de la industria de alimentos al ser un efecto no deseado en alimentos procesados con alto contenido en almidón (como el pan y la tortilla) ya que afecta la calidad del producto y su aceptación por el consumidor.

Lo que se sabe de la retrogradación en los alimentos es que ocasiona cambios en la textura, debido a que, una vez gelatinizado el almidón se reorganiza formando estructuras más estables en las que el almidón se encuentra poco disponible a los sistemas enzimáticos y se considera resistente. Está influenciada por una gran variedad de factores, entre los más importantes: los procesamientos térmicos, las condiciones de almacenamiento, el contenido de agua y la relación amilosa/amilopectina.

Relacionando el fenómeno de retrogradación con la inclusión del almidón resistente en la definición de fibra dietética, surge el cuestionamiento de la posible variación del contenido de fibra por formación de almidón resistente, en una misma muestra.

---

<sup>1</sup> El término carbohidratos es considerado por algunos autores como inconveniente (Bourges, 2001); sin embargo, actualmente tanto hidratos de carbono como carbohidratos son aceptados por la RAE y se usan de manera indistinta para etiquetado nutricional de alimentos (NOM-051-SCFI/SSA1-2010).

Se ha relacionado el cambio en el contenido de fibra dietética y almidón resistente (determinado a partir de la fibra), en distintos alimentos, por efecto de procesos térmicos como cocción; sin embargo, no se ha estudiado el efecto del almacenamiento en éstos. Por lo que, en este caso lo que se quiere evaluar es cómo afecta al contenido de fibra dietética, de un alimento rico en almidón, el almacenamiento; es decir, si la retrogradación se ve reflejada en un cambio significativo del contenido de fibra dietética.

## **Hipótesis**

*La retrogradación progresiva de las muestras estará reflejada en un incremento en el contenido de fibra dietética.*

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar la retrogradación del almidón en un alimento para evaluar el efecto en el contenido de fibra dietética.

### **Objetivos particulares**

- a) Establecer un protocolo para monitorear la retrogradación del almidón de las muestras.
- b) Seleccionar muestras con diferentes grados de retrogradación del almidón para comparar el contenido de fibra dietética medido con el método oficial AOAC 985.29.

## 1 Marco teórico

En los ensayos para determinar fibra dietética se descubrió que se incluye una fracción del almidón, natural y/o formada con ciertos procesos térmicos, que es resistente a la hidrólisis por amilasas; tras estudiarla se vio que podía conducir a propiedades semejantes a las ya establecidas de la fibra dietética y se convirtió en motivo de controversia en el sentido de si debía o no incluirse dentro del concepto de fibra dietética (Asp, 1987; Pak, 1997).

Así surgió la definición de almidón resistente como la fracción que no puede ser hidrolizada por las enzimas humanas en el intestino delgado y que actualmente es parte de la fibra dietética (McCleary, 2003, Perera *et. al.*, 2010) y aunque el interés por éste es reciente, ya es reconocido como un contribuyente significativo en la salud gastrointestinal debido a que actúa fisiológicamente como fibra dietética; se cree que tiene un efecto positivo sobre el control y prevención del cáncer de colon, el consumo de altas cantidades podría tener efectos negativos gastrointestinales pero en general, los beneficios del consumo de almidón resistente son considerados superiores a cualquier malestar gastrointestinal (McCleary y Rossiter, 2004; Perera *et. al.*, 2010).

Por lo tanto, la determinación confiable de fibra dietética total, soluble e insoluble en productos de panadería y harinas de cereales es un tema importante para investigación, etiquetado nutrimental y mercadotecnia y ha aumentado el uso de análisis de fibra dietética con esos fines, acompañado de un incremento en el conocimiento público de los beneficios en la salud de los alimentos con alto contenido de fibra (McCleary *et. al.*, 2011; Hollman *et. al.*, 2013).

Con la integración reciente de compuestos, como almidón resistente y oligosacáridos, en el concepto de fibra dietética, se desarrollaron métodos para la determinación específica de ciertos compuestos no digeribles, lo cual es muy útil pero puede no ser manejable cuando se trata de determinar en una muestra desconocida el contenido de fibra dietética total; retomando la importancia de la determinación confiable junto con la necesidad de un método universal para propósitos de etiquetado y control (McCleary, 2003). La AACC Internacional

(Asociación Americana de Químicos de Cereales) ha estado activa en el desarrollo y validación de la metodología para la determinación de la fibra dietética y permanecerá activa en áreas de definición de fibra dietética, análisis y formulación de productos alimentarios amigables con el consumidor (McCleary, 2011).

El almidón resistente como parte de la fibra dietética influye en la salud y por lo tanto su determinación analítica cuantitativa debe proveer información nutrimental cierta a los consumidores; de ahí la importancia de evaluar la relación que tiene la retrogradación del almidón, como parte formadora de almidón resistente, con el contenido de fibra dietética tanto por procesamiento térmico como por almacenamiento.

### **1.1 Fibra dietética**

McCance y Lawrence, en 1929, hicieron la primera distinción de carbohidratos en los alimentos como *disponibles* y *no disponibles*; en 1953 Hipsley fue el primero en usar fibra dietética como un nuevo término, describiendo las paredes celulares de las plantas en la dieta como benéficas a la salud (pensando que protegían contra la toxemia asociada con el embarazo) y en 1972, Trowell revivió el término (Asp, 1987; McCleary, 2011). Entonces surgió gran interés por ésta e investigadores, como Burkitt y colaboradores, propusieron la hipótesis de que su deficiencia se relaciona con la existencia de una serie de enfermedades como constipación, hemorroides, diverticulosis, cáncer de colon, diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Pak, 1997; Fennema, 2000; McCleary, 2011).

Así, la fibra dietética es un término de nutrición cuyos componentes tienen en común que son polímeros no digeribles (Fennema, 2000). Las definiciones actuales, de acuerdo con una revisión del *Codex Alimentarius* (2008), son:

- *Codex alimentarius*, 1993: material comestible de origen vegetal o animal que no es hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano por el método aprobado.
- *Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC)*, 2001: partes comestibles de plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con una fermentación

parcial o completa en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas. La fibra dietética promueve resultados fisiológicos benéficos incluyendo efectos laxantes y/o disminución del colesterol en sangre y/o disminución de glucosa en sangre (esta definición ha sido confirmada por la AOAC en 2004).

- *Instituto de Medicina de Estados Unidos (IOM), 2002*: consiste en hidratos de carbono no digeribles y lignina que están intrínsecos e intactos en las plantas. La fibra funcional consiste en aislados, hidratos de carbono no digeribles y lignina que tienen efectos fisiológicos benéficos en humanos. La fibra total es la suma de la fibra dietética y la fibra funcional.
- *Consejo de Salud de Holanda, 2006*: es el término colectivo para un grupo de sustancias que no son digeridas o absorbidas en el intestino delgado humano y que tiene carácter químico de carbohidratos, compuestos análogos a carbohidratos, lignina o sustancias relacionadas a la lignina.
- *Consejo Superior de Salud de Bélgica, 2006*: un grupo de nutrientes muy heterogéneos respecto a su estructura química, pero que son caracterizados por su resistencia a las enzimas digestivas secretadas por o en el tracto gastrointestinal de humanos o animales. Ejemplos que describen la fibra dietética son pectinas, oligosacáridos, almidón resistente, celulosa y lignina.
- *Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), 2007*: todos los hidratos de carbono que están en alimentos que no son digeribles en el intestino delgado humano; incluyendo: polisacáridos no amiláceos, almidón resistente, oligosacáridos resistentes con tres o más unidades monoméricas, otros componentes no digeribles que se asocian de forma natural con fibra dietética, especialmente lignina.

Todas las definiciones tienen un punto en común: son compuestos que no se digieren y por lo tanto no pueden ser absorbidos en el intestino delgado humano, sin embargo reducir el concepto a eso lo vuelve ambiguo y por ello es que se ha tratado de delimitar el tipo de componentes de la fibra dietética.

### 1.1.1 Componentes en la fibra dietética

Los principales componentes en la fibra dietética son (Asp, 1987; Pak, 1997):

- *Celulosas*
- *Hemicelulosas*
- *Pectinas*
- *Gomas* (Arábigo, Guar, Gatti, Karaya, Tragacanto, entre otras)
- *Mucilagos*
- *Pared celular de algas* (alginatos, carrageninas, agar)
- *Lignina*
- *Celulosa modificada*

Y los recientemente incluidos (*Codex Alimentarius*, 2008; Hollman *et. al.*, 2013):

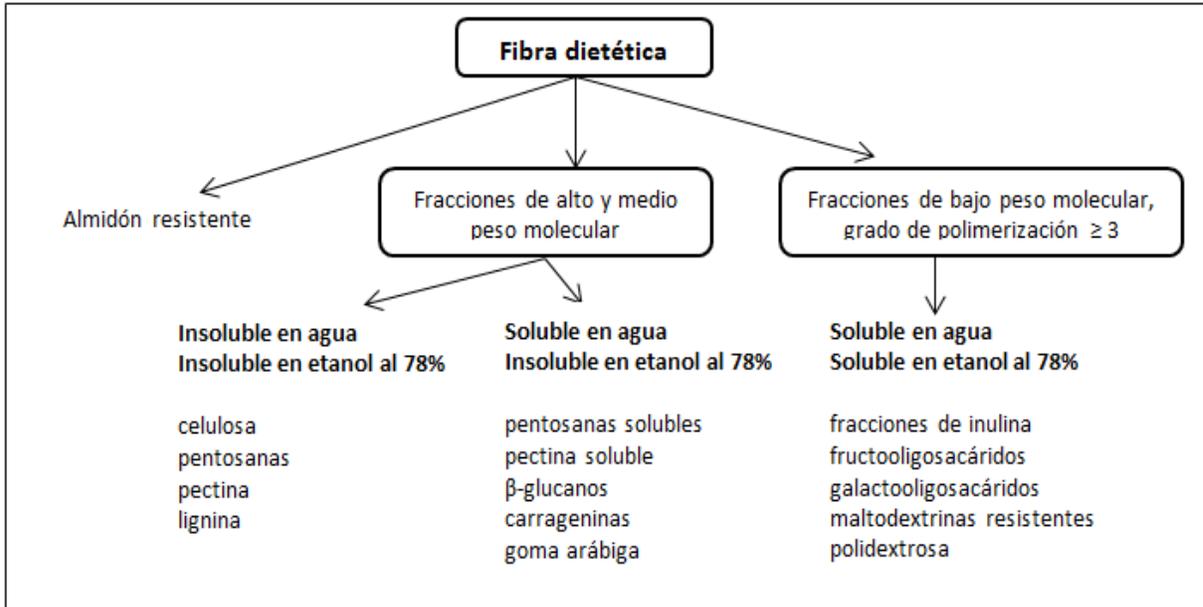
- *Inulina*
- *Fructooligosacáridos*
- *Almidón resistente*
- *Oligosacáridos no digeribles* (con 3 o más unidades monoméricas)

Una de las formas más usadas para clasificar la fibra dietética es por su solubilidad en agua (Pak, 1997):

- *Fibra insoluble*: compuesta por celulosa, gran parte de las hemicelulosas y lignina (polímero no polisacárido, que contiene unidades de fenilpropano).
- *Fibra soluble*: en donde se encuentran pectinas, gomas, mucilagos, ciertas hemicelulosas, polisacáridos de algas y celulosa modificada

Continuando con la clasificación de la fibra dietética por su solubilidad, junto con los métodos enzimático-gravimétricos para su determinación, se tienen tres grupos (figura 1):

- Insoluble en agua e insoluble en etanol al 78%.
- Soluble en agua e insoluble en etanol al 78%.
- Soluble en agua y soluble en etanol al 78%.



**Figura 1.** Fibra dietética clasificada de acuerdo con su solubilidad en el contexto de los métodos gravimétricos de Fibra Dietética Total (Hollman *et. al.*, 2013)

### 1.1.2 Determinación de fibra dietética

Henneberg y Stohmann en 1860 desarrollaron el sistema de análisis proximal de los alimentos (humedad, proteína, hidratos de carbono, lípidos extraíbles y cenizas) donde los hidratos de carbono se medían por diferencia; cuando el análisis proximal se aplicó en estudios de fisiología se hizo evidente que el valor de hidratos de carbono no era constante y se identificó una fracción fibrosa insoluble que no era digerida (McCleary, 2003). Desde entonces el desarrollo de métodos analíticos para aislar y cuantificar la fracción indigerible ha sido constante.

Se empezó con el método de fibra cruda, llevado a la nutrición por McCance y Lawrence. Widdowson y McCance, en 1935, desarrollaron métodos para el análisis de azúcares reductores, sacarosa y almidón como una medida de los carbohidratos disponibles mientras los carbohidratos no disponibles se determinaban como residuo insoluble corregido para proteína y cenizas; posteriormente se desarrollaron métodos con detergentes por Van Soest en 1963 y Van Soest y Wine en 1967 que llevaron a una mejora en la determinación del valor de fibra respecto al de fibra cruda (Asp, 1987; McCleary, 2003).

Así, en la búsqueda de la metodología adecuada al concepto y cuantitativamente precisa, se han propuesto diversas mejoras; la fibra dietética se clasificó por su solubilidad en agua y se desarrollaron protocolos para determinarla con base en dicha clasificación, como los aprobados por la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales), considerando importante cuantificar las fracciones de fibra con una metodología que cumpla con las necesidades de investigación, regulación y etiquetado.

Los primeros procedimientos para determinar simultáneamente los componentes de fibra dietética tanto soluble como insoluble fueron desarrollados independientemente por: Furda, Schweizer y Würsch y Asp y Johansson entre 1977 y 1981 (McCleary, 2003; McCleary *et. al.*, 2011). Estos autores, junto con DeVries, Prosky y Harland, diseñaron la primera versión del método oficial AOAC 985.29 enzimático-gravimétrico, al cual se cambió el amortiguador de fosfatos por MES-TRIS para dar lugar al método AOAC 991.43 (McCleary, 2003; Hollman *et. al.*, 2013).

Los protocolos de fibra han adoptado dos enfoques generales: métodos enzimático-gravimétricos, como los oficiales por la AOAC, capaces de medir la fibra dietética total así como sus fracciones soluble e insoluble y métodos enzimático-químicos que tienden a ser requeridos para obtener información de la composición monomérica de la fibra dietética con fines de investigación (Asp, 1987).

Los métodos enzimático-gravimétricos incluyen como paso principal tratamientos enzimáticos para remover almidón y proteína con la posterior precipitación en etanol de la fibra soluble (soluble en agua), separación y pesado del residuo de fibra y la corrección por contenido de proteína y cenizas en dicho residuo, para obtener finalmente el valor de fibra dietética total (McCleary, 2003).

Los métodos enzimático-químicos, consisten también en una remoción enzimática como paso principal para aislar los residuos de fibra y liberar por hidrólisis ácida los azúcares neutros que constituyen los polisacáridos de la fibra, midiéndolos

específicamente por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases (GLC) o colorimétricamente (Pak, 1997; McCleary, 2003).

Tras la modificación del concepto de fibra dietética, se han desarrollado métodos para la cuantificación de los nuevos componentes pero como protocolos adicionales. La determinación de fibra dietética sigue siendo fundamentada en el protocolo enzimático-gravimétrico y los nuevos compuestos se miden ya sea en la fracción resultante de fibra dietética total, como es el caso del almidón resistente, o como sucede con los oligosacáridos que se cuantifican en la solución etanol-agua que suele descartarse en el paso de filtrado.

Se han aprobado oficialmente métodos para cuantificar oligosacáridos no digeribles (no como grupo sino específicamente), fructooligosacáridos, inulina, trans-galactooligosacáridos, povidona, fibersol 2 y almidón resistente; evidentemente si estos compuestos son analizados específicamente y los valores son añadidos al valor de fibra dietética total obtenida por el método oficial AOAC 985.29 o 991.43, se debe considerar que ninguno se “cuente dos veces” (McCleary, 2003).

Con base en lo anterior, en el 2007 se publicó un método enzimático-gravimétrico (para la cuantificación de fibra dietética de alto peso molecular) extendido y optimizado que acopla un ensayo por cromatografía líquida (con el que se determina fibra dietética soluble de bajo peso molecular); dando como resultado la medición de fibra dietética total y con la evaluación a través de un estudio colaborativo entre la AACC Internacional y la AOAC Internacional se aprobó recientemente como método oficial AOAC 2009.01 (McCleary *et. al.*, 2011; Hollman *et. al.*, 2013).

No hay que perder de vista que los métodos deben desarrollarse de acuerdo con las definiciones y tomar en cuenta los fines de la determinación, para propósitos de investigación pueden ser separados en diferentes niveles de complejidad y determinados por separado pero se necesitan métodos abreviados para etiquetado y control; la aprobación de nuevos métodos no significa que los datos analíticos de bases de datos reportados con otros métodos sean incorrectos, pero

para algunas muestras la fibra dietética podría ser subestimada (McCleary, 2003; McCleary y Rossiter, 2004) así que es importante al elegir el método considerar el tipo de muestra y el fundamento del protocolo para evitar subestimar el contenido real así como los propósitos de la determinación.

## 1.2 Almidón

Los hidratos de carbono han sido siempre la principal fuente de energía metabólica de los humanos, el almidón proporciona del 70 a 80% de calorías consumidas por los humanos; es la reserva de energía principal en las plantas y es uno de los carbohidratos más abundantes de la biosfera. Se encuentra en los cereales, tubérculos y en algunas frutas (como el plátano) y su concentración varía dependiendo del estado de madurez de la fuente; los almidones comerciales se obtienen principalmente del maíz (normal, ceroso y alto contenido en amilosa), arroz (varios tipos), trigo, papa y yuca (Fennema, 2000; Núñez, 2009).

Los almidones y sus derivados tienen aplicación en diferentes ramas de la industria: alimentaria, textil, papelera, farmacéutica, etc. (Núñez, 2009) y en la industria de alimentos son los principales proveedores de volumen y cuerpo, así como responsables de las características de textura en muchos alimentos con alto contenido de almidones (Fennema, 2000).

**Tabla 1.** Características generales de amilosa y amilopectina (Fennema, 2000; Núñez, 2009).

<b>Propiedades</b>	<b>Amilosa</b>	<b>Amilopectina</b>
<i>Estructura general</i>	Lineal	Ramificada
<i>Ramificaciones</i>	<1%	4-6%
<i>Masa molecular</i>	$10^6$	$10^7$ a $5 \times 10^8$
$\lambda_{max}$ (nm) <sup>a</sup>	600-660	530-570
<i>Solubilidad en agua</i>	Variable	Soluble

<sup>a</sup>En presencia de I<sub>2</sub>/KI, el pico máximo varía dependiendo de la fuente de almidón.

En la tabla 1 se observan las características generales de los polímeros del almidón. El almidón cuenta con características físicas y químicas únicas, a diferencia de los otros carbohidratos, se presenta en la naturaleza como partículas complejas discretas (gránulos) que son relativamente densas e insolubles. Los

gránulos de almidón están compuestos de: amilosa (polisacárido esencialmente lineal) y/o amilopectina (polisacárido muy ramificado) ordenadas de forma radial que se puede observar por la cruz blanca que produce por birrefringencia (Fennema, 2000; Núñez, 2009).

Las ramificaciones de la amilopectina agrupadas en paralelo se encuentran plegadas como dobles hélices, este empaquetamiento forma pequeñas áreas cristalinas muy densas que alternan con las menos densas y amorfas dando lugar a regiones cristalinas y no cristalinas en capas; las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina y algunas pueden lixiviar a partir de gránulos parcialmente embebidos de agua. Debido a que la cristalinidad es producida por el ordenamiento de las cadenas de amilopectina, los gránulos de almidón ceroso tienen parecido grado de cristalinidad al de almidones normales (Fennema, 2000).

La composición y algunas propiedades generales de los principales almidones se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Propiedades generales de algunos gránulos de almidón de diferentes fuentes y sus pastas (Fennema, 2000).

Fuente de almidón	Maíz común	Maíz ceroso	Maíz alto en amilosa	Papa	Tapioca	Trigo
Tamaño de gránulo (eje mayor, $\mu\text{m}$ )	2-30	2-30	2-24	5-100	4-35	2-55
Amilosa (%)	28	<2	50-70	21	17	28
Temperatura de gelatinización ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>a</sup>	62-80	63-72	66-170 <sup>b</sup>	58-65	52-65	52-85
Viscosidad relativa	Media	Media-alta	Muy baja <sup>b</sup>	Muy alta	Alta	Baja
Claridad de la pasta	Opaca	Muy ligeramente turbia	Opaca	Clara	Clara	Opaca
Tendencia a gelificar/retrogradar	Alta	Muy baja	Muy alta	Media a baja	Media	Alta
Lípidos (%GS)	0.8	0.2	-	0.1	0.1	0.9
Proteína (%GS)	0.35	0.25	0.5	0.1	0.1	0.4
Fósforo (%GS)	0	0	0	0.08	0	0

<sup>a</sup>Desde la temperatura inicial de gelatinización hasta completar la formación de la pasta.

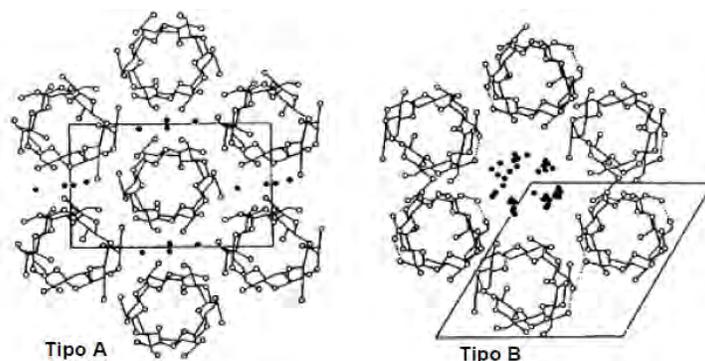
<sup>b</sup>Bajo las condiciones habituales de cocción, cuando la lechada se calienta a 95-100 $^{\circ}\text{C}$ , el almidón rico en amilosa no produce prácticamente viscosidad. La pasta no se forma hasta que la temperatura alcanza 160 $^{\circ}\text{C}$ -170 $^{\circ}\text{C}$ .

Los almidones normalmente contienen de un 70 a 80% de amilopectina pero existen algunas variedades de maíz y mijo (céreas) que llegan a contener prácticamente el 100% (Núñez, 2009); todos los almidones retienen pequeñas cantidades de cenizas, lípidos y proteínas, pero los cereales son los únicos cuyo almidón contiene lípidos endógenos en sus gránulos, estos lípidos internos son principalmente ácidos grasos libres (Fennema, 2000).

### **1.2.1 Amilosa**

La amilosa es un  $\alpha$ -D-(1,4)-glucano, cadena lineal de unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4), con 200 a 2500 unidades monoméricas y de peso molecular alrededor de  $10^6$  (Fennema, 2000; Núñez, 2009). Existen también moléculas que poseen unas pocas ramificaciones en posición  $\alpha$ -1,6 (el 0.3 a 0.5% de los enlaces) y las ramificaciones pueden ser muy largas o muy cortas, pero los puntos de ramificación están separados por largas distancias de manera que las propiedades de la amilosa son esencialmente las de las moléculas lineales (Fennema, 2000).

Por difracción de rayos X, en fibras orientadas de amilosa, se ha observado el acoplamiento de los monómeros en una estructura de hélice o espiral con giro a la derecha en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, por lo tanto es lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. Los patrones corresponden a los tipo A y B (figura 2), los elementos estructurales de la forma B son hélices dobles empaquetadas de forma hexagonal antiparalela, el canal que se encuentra en el centro está relleno de agua, en cambio, en la forma A el canal central está ocupado por otra doble hélice, de manera que el empaquetamiento es más denso; el agua ocupa los espacios comprendidos entre las hélices (Fennema, 2000; Núñez, 2009).



**Figura 2.** Estructuras y disposición de las dobles hélices en amilosa tipo A y B (Núñez, 2009).

Las moléculas de amilosa son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas pequeñas como yodo (dando lugar a un color azul característico) y porciones lineales hidrófobas de ácidos grasos, monoglicéridos, fenoles, halogenuros de arilo, n-butanol, t-butanol, ciclohexano, entre otros. En éstos se estabiliza la conformación tipo V que posee también 6 restos de glucosa por vuelta; el diámetro de la hélice se acomoda al tamaño de la molécula incluida y oscila entre 13.7 y 16.2 Å. La conformación V, tras la eliminación de una molécula incluida se transforma lentamente, en atmósfera húmeda, en la conformación estirada B; esta transformación ocurre también durante el envejecimiento de productos de panadería (Fennema, 2000; Núñez, 2009).

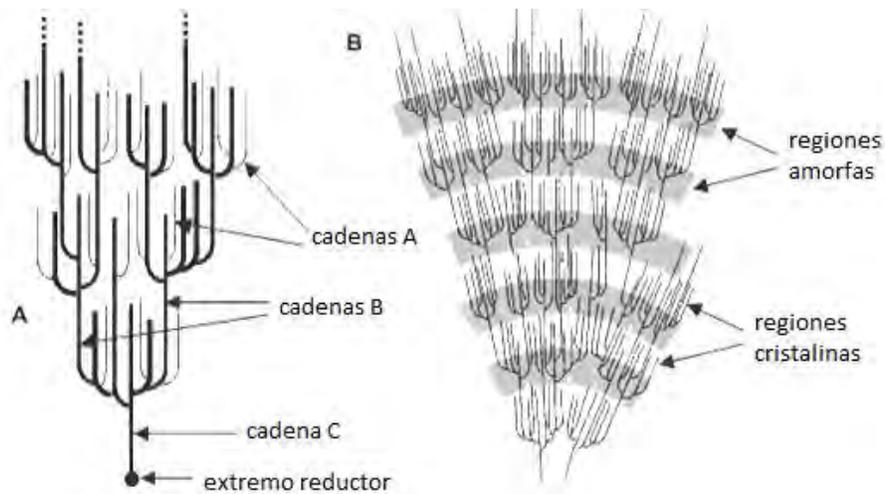
La amilosa es soluble en agua caliente formando una suspensión coloidal; la mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa, los dos con alto contenido de amilosa que existen comercialmente poseen alrededor del 52% y del 70 a 75% (Fennema, 2000).

### 1.2.2 Amilopectina

La amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada, con enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 que constituyen alrededor del 4 a 5% del total de los enlaces, con peso molecular muy elevado que se encuentra en el intervalo de  $10^7$  a  $5 \times 10^8$  y tiene tendencia a formar agregados moleculares (Fennema, 2000).

Su estructura consiste en una cadena que contiene el único extremo reductor, denominada cadena C, la cual tiene numerosas ramas, llamadas cadenas B, a las que se unen por su parte varias cadenas A; las ramas de las moléculas de

amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices, lo anterior se puede observar en la figura 3A. La amilopectina contribuye con la estructura cristalina de los gránulos de almidón las áreas donde comienza la ramificación y aquellas que solo tienen cadenas lineales están claramente separadas, produciendo capas amorfas (segmentos menos densos) y cristalinas (más densos) respectivamente, como se muestra en la figura 3B (Fennema, 2000; Perera *et. al.*, 2010).



**Figura 3.** Representación de la amilopectina: **A)** cadenas en diagrama de racimo **B)** representación de regiones amorfas y cristalinas.

Algunos almidones están formados exclusivamente por amilopectina, y se les conoce como almidones cerosos porque cuando se corta el grano la superficie que aparece es de aspecto vítreo o ceroso, a pesar de que no contiene ninguna cera (Fennema, 2000).

La amilopectina también puede formar complejos de inclusión con yodo en sus ramificaciones, dando un color rojo-púrpura, pero éstos son poco estables (Fennema, 2000); por ello es que la longitud de onda de máxima absorción del complejo difiere entre amilosa y amilopectina.

### 1.2.3 Gelatinización

Los gránulos de almidón no dañados son insolubles en agua fría pero pueden embeber agua de manera reversible, hincharse ligeramente con el agua y volver al tamaño original al secarse; pero cuando se calientan en agua los gránulos de

almidón sufren un proceso denominado gelatinización, que es la interrupción del orden de las moléculas en los gránulos: hinchamiento irreversible del gránulo, pérdida de birrefringencia y pérdida de cristalinidad. Durante la gelatinización se produce la lixiviación de la amilosa, pero también puede producirse antes de la gelatinización. La gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan por tener mayor área de contacto; la temperatura inicial aparente de gelatinización y el intervalo dentro del cual tiene lugar dependen del método de medida, fuente de almidón, relación almidón-agua, proteína, lípidos, así como de las heterogeneidades en la población de gránulos, (Guraya y Toledo, 1993; Fennema, 2000; Baks *et. al.*, 2007; Núñez, 2009).

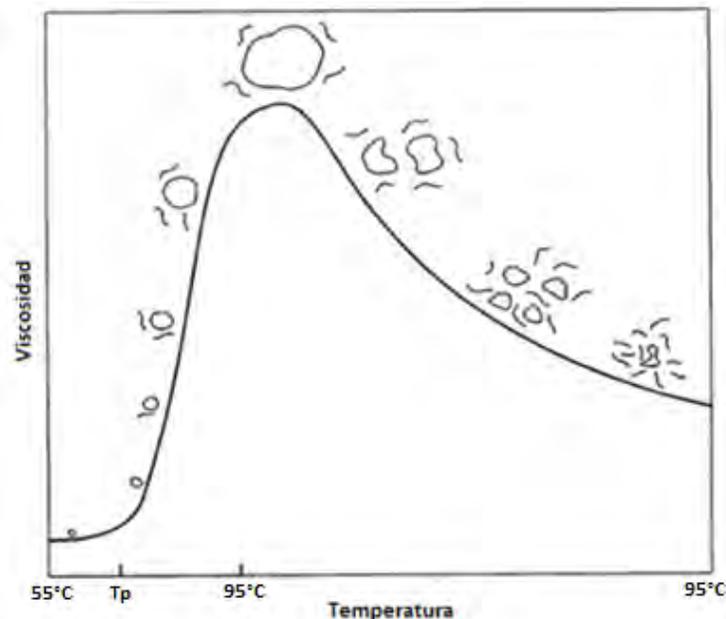
La gelatinización del almidón ha sido estudiada principalmente usando la birrefringencia del punto final, viscosidad relativa para el valor máximo, difracción de rayos X y calorimetría de barrido diferencial, técnicas (excepto por la viscosidad) aplicables solo a fracciones purificadas de almidón y que requieren instrumentación costosa (Guraya y Toledo, 1993).

En este proceso, el agua actúa como plastificante; su efecto favorecedor de la movilidad se lleva a cabo en primer lugar en regiones amorfas, que físicamente tienen la naturaleza de un vidrio. Cuando los gránulos de almidón se calientan en presencia de suficiente agua (al menos 60%) y se alcanza una temperatura específica ( $T_g$ , temperatura de transición vítrea), las regiones amorfas plastificadas del gránulo sufren una transición de fase de un estado de vidrio a otro de goma (Fennema, 2000).

Los gránulos de almidón absorben del 20 a 40% de agua y la viscosidad de la disolución aumenta notablemente. A la vez, una parte de la amilosa se difunde fuera del gránulo y pasa a disolución; existen cadenas de amilosa de bajo peso molecular altamente hidratadas que rodean a los agregados que también están hidratados de los restos de los gránulos. Finalmente el gránulo explota (gránulo fantasma). En esta primera fase de la gelatinización, los cristales de almidón se funden y forman una red polimérica. A temperaturas más elevadas (100°C

aproximadamente), esta red se rompe y como consecuencia la amilosa y la amilopectina se disuelven, disminuyendo la viscosidad (Núñez, 2009).

Una representación de este fenómeno medida con un viscoamilografo de Brabender se observa en la figura 4; con el uso de este equipo se obtienen perfiles de viscosidad, las unidades de viscosidad Brabender determinadas por este método no son cuantitativas sino cualitativas; durante las fases iniciales de calentamiento no se menciona ningún cambio de viscosidad cuando se hidrata el gránulo ya que estos cambios ocurren a nivel molecular. La viscosidad de los almidones nativos debe sus cambios a las transformaciones estructurales durante el hinchamiento, ruptura y dispersión de los componentes del gránulo de almidón (Núñez, 2009).



**Figura 4.** Curva representativa del viscoamilografo de Brabender, que muestra los cambios de viscosidad relacionados con el hinchamiento de los gránulos de almidón y su desintegración, al calentar una suspensión de gránulos hasta 95°C y mantenerla después a esa temperatura. Tp es la temperatura de formación de la pasta, es decir, la temperatura a la que se produce un notable incremento de la viscosidad (Fennema, 2000).

Como la gelatinización es un proceso endotérmico, es muy utilizada la técnica de calorimetría diferencial de barrido, que mide tanto la temperatura como la entalpía de gelatinización (Fennema, 2000). También se ha determinado el almidón gelatinizado en alimentos por cuantificación de la glucosa liberada por digestión

con amiloglucosidasa usando la reacción colorida con o-toluidina (Guraya y Toledo, 1993).

Finalmente, al enfriar, algunas moléculas de almidón se re-asocian parcialmente para formar un precipitado o un gel, este proceso se denomina retrogradación (Fennema, 2000); se explicará en la siguiente sección y es de especial interés en este trabajo.

#### **1.2.4 Retrogradación**

La retrogradación del almidón ha sido ampliamente estudiada (Gray y Bemiller, 2003; Zhou *et. al.*, 2013), es un fenómeno definido como la insolubilización y precipitación espontánea del almidón, es decir, la pérdida de solubilidad del almidón gelatinizado debido a que las moléculas del almidón tienden a re-asociarse y formar una estructura estrechamente compacta (Fennema, 2000; Zhou *et. al.*, 2013).

En las moléculas de amilosa, las cadenas se orientan paralelamente y forman entre sí puentes de hidrógeno a través de sus múltiples grupos hidroxilo, estas interacciones se pueden efectuar por diversas rutas que dependen de la concentración y de la temperatura del sistema; en cambio, la retrogradación de la amilopectina parece que requiere en primer lugar la asociación de sus ramas exteriores, y eso requiere de un tiempo mucho mayor respecto a la retrogradación de la amilosa (Fennema, 2000).

Los agregados de amilosa gelatinizada forman una red gelatinosa durante su enfriamiento, mientras que la amilopectina actúa como un agente de agregación y una red rellena (Perera *et. al.*, 2010). La conocida relación entre alto contenido de amilosa y almidón resistente surge del gran número de largas ramificaciones que pueden formar especies retrogradadas pequeñas (Shi *et. al.*, 2013).

El desarrollo de las zonas de asociación en un gel puede ser considerado como la primera fase del inicio de la cristalización por parte de las moléculas de almidón, al enfriar y dejar en reposo las pastas de almidón, éste se hace progresivamente menos soluble. En soluciones diluidas las moléculas de almidón tienden a

precipitar, y este material insoluble es cada vez más difícil de re-disolver por calentamiento (Fennema, 2000; Núñez, 2009).

La velocidad de retrogradación depende de diversas variables, entre las que se encuentran: la proporción amilosa/amilopectina (que se rige por el genoma y su potencial genético a sufrir mutaciones), el largo de sus cadenas, 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 lípidos, surfactantes y sales (Fennema, 2000; Perera *et. al.*, 2010).

La retrogradación es de especial interés para la industria de alimentos porque muchos defectos de calidad como endurecimiento del pan y pérdida de viscosidad y precipitación de sopas y salsas son debidos, al menos en parte, a la transición gradual del almidón amorfo a otro parcialmente cristalino (retrogradado). En estos productos la velocidad de retrogradación depende de la formulación, del proceso y de las condiciones de almacenamiento (Fennema, 2000).

El almidón retrogradado es un tipo de almidón resistente (tipo 3). Factores como el secado, enfriamiento y condiciones de almacenamiento pueden alterar el nivel de almidón resistente en alimentos y se han reportado estos cambios en distintos alimentos para ciertas condiciones (Anchondo, 1998; Perera *et. al.*, 2010) así como estudios de fibra dietética y su respectivo contenido de almidón resistente en cereales, tubérculos y leguminosas tanto crudos como cocidos (Nava, 2008; Ramos, 2008; Escalona, 2009; Padilla, 2009). Lo que se ha evaluado en dichos estudios es el efecto de cocción y secado en alimentos; ningún estudio relaciona la retrogradación por almacenamiento y su efecto, si lo hay, en el valor de fibra dietética, que es el objetivo de este trabajo.

### **1.3 Almidón resistente**

Actualmente el concepto de almidón resistente está basado en la incapacidad de las enzimas digestivas de hidrolizar algunas formas físicas y químicas del almidón en los alimentos *in vivo* o *in vitro*. Su importancia a nivel nutricional y la razón por la cual ha llamado la atención en las últimas décadas, radica en su efecto positivo

para la salud; ha mostrado tener beneficios fisiológicos parecidos a los de la fibra dietética incluyendo efecto laxante, efecto prebiótico en la microflora del colon, mejora del metabolismo del colesterol, reducción del riesgo de colitis ulcerativa y prevención y control del cáncer de colon (Perera *et. al.*, 2003; Shi *et. al.*, 2013).

Por lo tanto, el almidón resistente es definido como almidón y productos de la degradación del almidón que no pueden ser absorbidos en el intestino delgado de individuos saludables y, por consiguiente, es fermentado por microorganismos en el intestino grueso para producir ácidos grasos de cadena corta (Perera *et. al.*, 2010, Gaytán *et. al.*, 2012; Shi *et. al.*, 2013).

Una vez descubierto que el almidón no era completamente hidrolizado y absorbido en el intestino delgado humano, fue clasificado primero con base en su digestibilidad, en 1987 por Englyst y Cummings, en tres grupos: almidón fácilmente digerible, almidón parcialmente resistente y almidón resistente. De acuerdo a esa clasificación, el almidón que no es accesible a las enzimas digestivas (como el que está protegido en los granos enteros por recubrimientos difíciles de digerir y en los molidos gruesos y la amilopectina retrograda) es considerado almidón parcialmente resistente; la amilosa retrogradada que puede ser solubilizada en hidróxido de potasio y que subsecuentemente es susceptible a hidrólisis por amiloglucosidasa es referida como almidón resistente. Sin embargo, lo que Englyst y Cummings definieron como almidón parcialmente resistente y almidón resistente fue reclasificado como almidón resistente tipo 1, 2 y 3 (Perera *et. al.*, 2010).

Así, se re-clasificó el almidón resistente en (Perera, *et. al.*, 2010; Shi *et. al.*, 2013; Zhou *et. al.*, 2013):

- *Almidón resistente tipo 1*: aquel que es físicamente inaccesible a las enzimas como resultado de una estructura rígida, es decir, impedimentos físicos como paredes celulares o partículas de gran tamaño. Generalmente es calculado como la diferencia entre el contenido de glucosa extraíble con enzimas de determinado alimento con y sin tratamiento de homogeneización previo al análisis.

- *Almidón resistente tipo 2*: constituido por gránulos nativos o almidón no gelatinizado; se encuentra en los alimentos crudos y los alimentos cocinados con sólo un poco de agua (lo que evita la completa gelatinización del almidón). Analíticamente es medido como la diferencia en la cantidad de glucosa liberada por pancreatina y amiloglucosidasa después de 120 minutos de hidrólisis de dos muestras del mismo alimento (teniendo el mismo tamaño de partícula), una que ha sido previamente hervida y otra que no.
- *Almidón resistente tipo 3*: constituido por almidón retrogradado o cristalino, formado durante el enfriamiento del almidón gelatinizado; éste es de particular interés debido a su estabilidad térmica. Existen diversos métodos para cuantificarlo, pero a grandes rasgos constan de una hidrólisis enzimática para digerir el almidón, solubilización del almidón resistente a la digestión y una nueva hidrólisis para la posterior cuantificación.
- *Almidón resistente tipo 4*: a este grupo pertenecen los almidones modificados químicamente.

Además, se incluyeron los términos de almidón de digestión rápida y almidón de digestión lenta, fundamentadas en el tiempo con el que el almidón es hidrolizado *in vitro* con  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa, siendo 20 minutos para el primero y de 20 a 120 minutos para el segundo. El almidón que no es hidrolizado después de 120 minutos de incubación se considera almidón resistente (Perera *et. al.*, 2010). Las industrias de almidones están interesadas en éstos tipos de almidones como producto alimentario de valor nutrimental (Shi *et. al.*, 2013).

A través de su influencia en la gelatinización y retrogradación, las diferencias en las condiciones del procesamiento de alimentos, tal como cambios en la humedad, temperatura y duración del calentamiento y subsecuente enfriamiento, influyen en el contenido de almidón resistente en los alimentos, especialmente el tipo 3 (Perera *et. al.*, 2010). En particular, la amilosa retrogradada tiene alta estabilidad térmica y por lo tanto permite que el almidón resistente soporte el tratamiento térmico durante la cocción. El almidón resistente tipo 3 de amilosa retrogradada ha sido comercialmente usado como aditivo de fibra dietética. Como el almidón nativo comúnmente contiene menos del 30% de amilosa, el almidón resistente tipo 3

comercial es preparado con el almidón con alto contenido de amilosa (Zhou *et. al.*, 2013).

Para la cuantificación de almidón resistente se han desarrollado una variedad de protocolos analíticos; debido a que, además de la complejidad y sus diversas clasificaciones, el contenido de almidón resistente en productos con alto contenido en almidón es muy variable. El tipo de almidón resistente que es cuantificado depende del protocolo (Perera *et. al.*, 2010).

### **1.3.1 Determinación de almidón resistente**

La determinación de almidón resistente en ingredientes alimentarios y alimentos procesados es indispensable para proveer información nutrimental tanto a investigadores como a los consumidores; esto con la finalidad de emplear la información sobre almidón resistente para el procesamiento de alimentos y aplicaciones de nutrición (Perera *et. al.*, 2003).

A continuación se describen brevemente los principales métodos desarrollados para la cuantificación de almidón resistente:

- *Método de Englyst*: protocolo diseñado para determinar almidón de acuerdo con la clasificación por tiempo de digestión (digestión rápida, digestión lenta y resistente); emplea  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa en amortiguador de acetatos (pH 5.2, 0.1 M), la incubación en baño de agua es con agitación (170 rpm) a 37°C. Para la cuantificación se toman alícuotas, a los 20 minutos, 2 horas y 16 horas de iniciada la digestión, que se mezclan con etanol al 80% y la cuantificación final de azúcares se hace empleando el protocolo de glucosa oxidasa peroxidasa (Zhou *et. al.*, 2013).
- *Método de Goni*: emplea pepsina y  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina en amortiguador tris-malato (pH 6.9, 0.1 M), se incuba en baño de agua con agitación (100 rpm) a 37°C por 16 horas. Los residuos se obtienen por centrifugación y se solubilizan con KOH 2 M. Por último emplean amiloglucosidasa para liberar la glucosa cuyo contenido puede ser determinado por el método de glucosa oxidasa (Zhou *et. al.*, 2013).

- *Método de la AACC (32-40)*: para la hidrólisis emplea una mezcla de  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa en baño de agua a 37°C por 16 horas; los residuos se tratan con KOH 2 M para solubilizar el almidón resistente e incubar posteriormente con amiloglucosidasa (previo tratamiento de neutralización). La glucosa se determina usando el ensayo de glucosa oxidasa (Zhou *et. al.*, 2013).
- *AOAC 2002.02*: se hidroliza el almidón no resistente con  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa por 16 horas a 37°C; el almidón resistente se recupera como pellet por centrifugación que se disuelve en KOH 2 M. La solución es neutralizada con amortiguador de acetatos y el almidón es hidrolizado a glucosa con amiloglucosidasa. La glucosa es medida con el reactivo de glucosa oxidasa peroxidasa (AOAC, 2003).

Sin embargo, existen diferencias significativas entre los procedimientos por la preparación de la muestra, las enzimas empleadas y el establecimiento de las condiciones experimentales que imiten la digestión gastrointestinal del almidón. Los métodos *in vitro* para el análisis están basados conceptualmente en la digestión gastrointestinal del almidón en los alimentos; la hidrólisis enzimática es una característica común de todos estos métodos. La mayoría de los métodos están enfocados en la determinación de almidón resistente total, pero se han desarrollado métodos específicos para cuantificar los tipos 1, 2 y 3 así como los clasificados de acuerdo al tiempo de su digestión. Las diferencias en la preparación de la muestra son significativas y el tipo de almidón resistente que es cuantificado depende del protocolo (Perera *et. al.*, 2010).

Cuando el protocolo incluye molienda de la muestra para pasar un tamiz de 1 mm, que genera una harina gruesa, se considera que el almidón resistente tipo 1 se está contabilizando (AOAC, 2003), mientras que el uso de una homogeneización a un tamaño menor descarta contribución del almidón resistente tipo 1 al valor final de almidón resistente. Si además el ensayo incluye pasos de ebullición se está eliminando la cuantificación de almidón resistente tipo 2. Otras modificaciones han sido hechas para el paso de la preparación de la muestra en la determinación de

almidón resistente, con la intención de simular condiciones más cercanas a la digestión *in vivo* (Perera et. al., 2010).

Por las variaciones en los procedimientos analíticos, es razonable creer que, podrían alterar significativamente el nivel de almidón resistente detectado en alimentos similares (Perera et. al., 2010); independientemente a eso, cualquiera de los métodos usados para medir almidón resistente debe garantizar valores en concordancia con los obtenidos con los pacientes de ileostomía (McCleary, 2003).

El método desarrollado por McCleary y Monaghan en 2002 (AOAC 2002.02), finalmente dio valores de almidón resistente para una gama de muestras en línea con los obtenidos por ileostomía (McCleary, 2003).

#### **1.4 Fundamentos para el desarrollo del protocolo de determinación de almidón**

La determinación directa del almidón en los alimentos puede resultar difícil debido a que se encuentra dentro de una matriz muy compleja tanto química como estructuralmente y por lo tanto en algunos casos es necesario aislarlo de otros componentes.

En la sección 1.3.1, ya se han citado los principales métodos para determinar almidón resistente, entre los cuales existen diferencias significativas y todos incluyen tratamiento enzimático; con la finalidad de evitar los problemas de la determinación enzimática del almidón se propone medirlo por complejación con yodo.

La complejación con yodo es uno de los métodos más usados en la determinación de almidón. Con este método el almidón puede ser cuantificado por titulación potenciométrica del yodo o colorimétricamente. Éste último será el único que se trate a detalle debido a que es parte importante de la metodología experimental en este trabajo, para el seguimiento al proceso de retrogradación de las muestras.

El método de complejación es particularmente empleado para la cuantificación de amilosa en almidones aislados por absorbancia del complejo azul amilosa-yodo (Guraya y Toledo, 1993; McGrance et. al., 1998; Fitzgerald et. al., 2009, Vilaplana

*et. al.*, 2012), pero también se ha empleado para medir este polímero en productos alimentarios (Bayram, 2006).

Muchos investigadores se han ocupado de las complejidades que rodean el comportamiento de este método y por eso se han propuesto cambios al protocolo; algunos citados por Fitzgerald *et. al.* (2009) son los siguientes:

- *McCready y Hassid, 1943*: propusieron la primera versión del método de enlace del almidón con yodo para arroz. La curva estándar fue generada usando mezclas de amilosa y amilopectina purificadas.
- *Williams y colaboradores, 1958*: adaptaron el método para determinar el contenido de amilosa en arroz usando una curva estándar de sólo amilosa de papa, midiendo a 590 nm la intensidad del color del complejo.
- *Juliano, 1971*: hizo cambios en la preparación de la solución de almidón, la química de la reacción y la longitud de onda en que se mide la absorción (de 590 nm a 620 nm).
- *Birch y Priestly, 1973*: usaron álcali como disolvente para la amilosa.
- *Johnson y Webb, 1976*: sugirieron regresar al estándar de 1943 y reemplazar la amilosa de papa con mezclas de amilosa de papa y amilopectina de arroz para disminuir la interferencia del complejo de yodo-amilopectina.
- *Pérez y Juliano, 1978*: emplearon como estándar un set de arroz desengrasado contra una curva estándar de amilosa de papa desengrasada.
- *La Organización Internacional de Normalización (ISO), 1987*: aprobó el último método como ISO 6647:1987, con el uso de mezclas de amilosa y amilopectina para generar la curva estándar y la opción de usar cultivos calibrados de arroz para análisis de rutina. Éste método fue retirado en 1998.
- *AACC, 1999*: aprobó un método similar, AACC 61-03; las mezclas de amilosa y amilopectina usadas para la curva estándar están calculadas con base en un contenido promedio de almidón del 90% en la ISO 6647 y 70% en AACC 61-03 para tener en cuenta el contenido de humedad, las muestras son desengrasadas en el protocolo de la ISO y es opcional para la AACC.

- *ISO, 2007*: el método ISO 6647:2007 aprobado describe el uso de estándares mezclados (para un contenido de 90% de almidón) y para análisis de rutina, la curva estándar, es generada de muestras conocidas. Considera las longitudes de onda de 620 nm y 720 nm pero no hace una recomendación específica.

Es el método más extendido por su bajo costo, ausencia de reactivos “delicados” (como enzimas), alto rendimiento por día y requerimientos de equipo mínimos (espectrofotómetro), es rápido, simple, preciso, la longitud de onda se elige tal que convenga al particular almidón que se está analizando, puede ser adaptado a un método en micro-escala, la sensibilidad de la reacción almidón-yodo es alta y aplicable para cantidades de almidón que contienen menos de 100 µg de amilosa y puede usarse para almidones de una amplia variedad de fuentes botánicas (McGrance *et. al.*, 1998; Mahmood *et. al.*, 2007).

Sin embargo, hay muchas variantes de este protocolo: diferencia en solventes, concentración de la solución de yodo, pH, elección de longitudes de onda, número de longitudes de onda empleadas y cálculo para convertir absorbancia a contenido de amilosa (Mahmood *et. al.*, 2007; Vilaplana *et. al.*, 2012) que deben tomarse en cuenta al establecer las condiciones de experimentación y seleccionar las óptimas para los propósitos de la cuantificación.

#### **1.4.1 Solubilización diferencial**

El almidón debe estar soluble/gelatinizado para que se forme el complejo de inclusión con yodo. Se ha reportado el uso de muchos solventes para la disolución eficaz del almidón: ácido perclórico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, DMSO (dimetil sulfóxido), DMSO-urea, DMSO-CaCl<sub>2</sub> y una buena disolución es el primer paso en la estimación válida del contenido de almidón (Mahmood *et. al.*, 2007).

El solvente que permite diferenciar como se encuentra el almidón es hidróxido de potasio (KOH), que se ha usado en concentración ≤ 0.2 M para la determinación de almidón gelatinizado de los alimentos (Guraya y Toledo, 1993; Bayram, 2006, Baks *et. al.*, 2007) así como en concentración 2 M para la cuantificación de

almidón resistente (AOAC, 2003; McCleary, 2003; McCleary y Rossiter, 2004; Perera *et. al.*, 2010; Shi *et. al.*, 2013; Zhou *et. al.*, 2013).

Se ha reportado, en un estudio para distinguir entre almidones crudos y gelatinizados (Bayram, 2006), que el tratamiento con KOH disuelve la amilosa en una solución acuosa, señalando como concentración en la cual se obtiene la máxima absorbancia para almidón de arroz gelatinizado 0.2 M, mientras que para el almidón de arroz crudo fue empleando 0.5 M, pero este estudio sólo evalúa el intervalo de concentración de KOH de 0 a 0.65 M.

De igual manera Birch y Priestly, muchos años atrás, en 1973, encontraron que el almidón gelatinizado se disuelve en KOH 0.2 M pero el almidón crudo no se disuelve hasta llegar a concentraciones de KOH 0.5 M (Guraya y Toledo, 1993).

Los métodos desarrollados por Goni, AACC y AOAC para la determinación de almidón resistente emplean KOH 2 M en el paso de solubilización.

#### **1.4.2 Selección de longitud de onda**

Otra de las variantes experimentales del método es la longitud de onda en que se mide la absorbancia del color producido por el complejo almidón-yodo. De acuerdo con los propósitos del método y la fuente de almidón se han empleado diferentes longitudes de onda para leer la absorbancia del complejo.

Generalmente el color y la longitud de onda están asociados a la molécula de almidón complejada y la fuente de almidón; algunas de las variaciones en la longitud de onda máxima parecen depender de las cantidades relativas de yodo y amilosa usadas, otros también lo han asociado al grado de polimerización de la amilosa (Mahmood *et. al.*, 2007; Perera *et. al.*, 2010).

Mahmood *et. al.* (2007), emplean 2 longitudes de onda, 535 nm y 620 nm, fundamentado en que el pico de absorción de amilosa en presencia de yodo está alrededor de 620nm (610 a 650 nm, dependiendo de la fuente vegetal) y que el máximo de absorción del complejo con amilopectina se encuentra entre 535 y 550 nm; con la segunda longitud de onda se cuantifica el contenido de amilopectina. Sin embargo, no siempre resulta un beneficio trabajar con 2 longitudes de onda;

en ese estudio los cálculos sólo aportaron un pequeño beneficio cuando el sustrato era almidón purificado.

En un estudio, McGrance *et. al.* (1998), definieron con base en los espectros de absorción UV-visible, las longitudes máximas para diferentes proporciones amilosa/amilopectina de almidones de distintas fuentes; el resultado del pico máximo de absorción en la región visible se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Absorbancia máxima (nm) de complejos con yodo de almidones de papa, maíz y trigo y de mezclas de amilosa/amilopectina de almidón de papa (% m/m en base seca). (McGrance *et. al.*, 1998).

Tipo de almidón	Pico de máxima absorbancia (nm)
Amilosa de papa	636
75% amilosa de papa y 25% amilopectina de papa	628
50% amilosa de papa y 50% amilopectina de papa	613
25% amilosa de papa y 75% amilopectina de papa	592
10% amilosa de papa y 90% amilopectina	566
Amilopectina de papa	552
Amilosa de maíz (70%)	604
Amilopectina de maíz	521
Almidón de maíz	606
Almidón de trigo	617

De los valores obtenidos por McGrance *et. al.* (1998), tabla 3, son de interés los de almidón de maíz y la mezcla 25% amilosa/75% amilopectina (proporción común en los almidones normales), 606 y 592 nm respectivamente, para considerarlos al seleccionar la longitud de onda a emplear debido a que el almidón estándar para generar la curva patrón es de papa y las muestras son de maíz.

Así, leer absorbancia del complejo almidón-yodo a 600 nm tiene como ventajas que es un valor intermedio y es característico del complejo amilosa-yodo (el complejo más estable) y por ello ha sido seleccionado por diversos investigadores:

- Guraya y Toledo (1993) para el grado de gelatinización del almidón en productos secos.
- McGrance *et. al.* (1998), para la cuantificación del contenido de amilosa de almidones de diferentes fuentes botánicas ya que los complejos de amilosa y

amilopectina tienen picos que son extremadamente anchos y por lo tanto no hay necesidad de usar el máximo de absorbancia de cada tipo de almidón.

- Bayram (2006), en un estudio de determinación del grado de gelatinización (comparando trigo crudo y cocinado); entre otros.

## **2 Metodología**

Los principales pasos en la metodología experimental son:

- a) Desarrollo de un protocolo para la determinación de almidón utilizando solubilización diferencial en hidróxido de potasio y posterior complejación con yodo.
- b) Pruebas del protocolo aplicadas a un sistema ideal (almidones de maíz).
- c) Inducción y monitoreo de retrogradación de las muestras con el protocolo implementado.
- d) A partir de las muestras con diferentes grados de retrogradación, determinación del contenido de fibra dietética con el método oficial AOAC 985.29.
- e) Evaluación del efecto del almidón retrogradado en el contenido de fibra dietética.

Las muestras en este trabajo son: masa y tortilla preparadas con harina de maíz blanco nixtamalizado (MASECA®) la cual se hidrata con agua fría para obtener la masa y ésta pasa por una máquina tortilladora donde alcanza una temperatura alrededor de 97°C en la cocción.

### **2.1 Desarrollo del protocolo de determinación de almidón por solubilización diferencial y complejación con yodo**

Para cuantificar almidón por complejación con yodo la absorbancia debe referirse a una curva patrón, la cual se preparó con concentraciones conocidas de almidón de papa.

La concentración del reactivo de yodo considerada en la reacción de complejación es la propuesta por Iturbe y Sandoval (2013), al emplear KOH como solvente fue necesario llevar el pH a neutro ( $7 \pm 0.2$ ) debido a que la reacción de complejación no se da a pH alcalino y que un cambio a pH ácido modifica la respuesta del método.

Posteriormente se evaluó experimentalmente el efecto de variables como solubilización, tiempo de solubilización, recobro e interferencia por sales producto de la neutralización.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la solubilización y cuantificación del almidón, se probó el protocolo en soluciones de almidón de maíz normal (comercial marca Maizena®) y almidón de maíz alto en amilosa (marca Arancia, 64% amilosa) en las que se promovió la retrogradación por refrigeración y ciclos de congelación/descongelación.

### **2.1.1 Curva patrón**

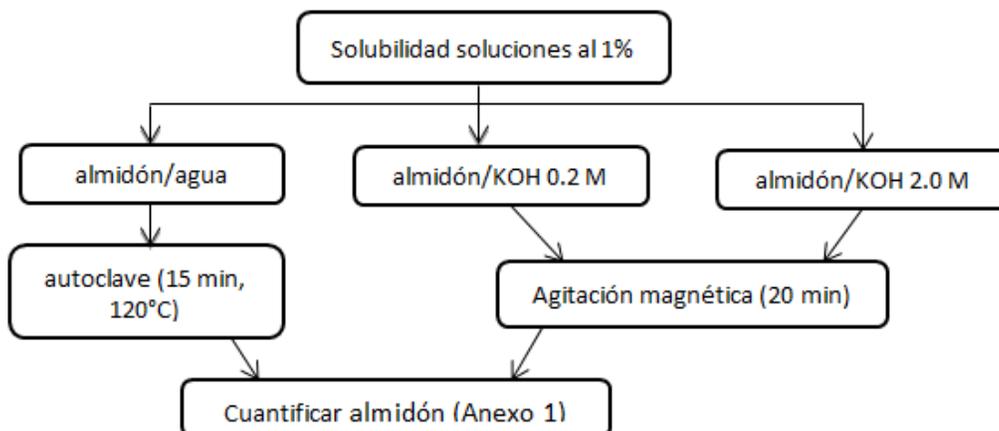
El cálculo de contenido de almidón fue referido a una curva patrón preparada con cantidades conocidas de almidón de papa estándar (marca Alyt) dentro del intervalo de sensibilidad del método con concentraciones de 0.02 a 0.20 mg de almidón soluble/mL; a mayor concentración de almidón los complejos precipitan.

Se prepararon 100 mL de solución stock 0.20 mg almidón/mL y se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 0.14, 0.10, 0.06 y 0.02 mg de almidón soluble/mL. Se leyó absorbancia de las soluciones (metodología en anexo 1) por triplicado en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer Lambda 3B) a 600 nm frente a un blanco de reactivos. La ecuación de regresión lineal se calculó considerando masas de almidón estándar en base seca.

### **2.1.2 Evaluación de variables en la complejación**

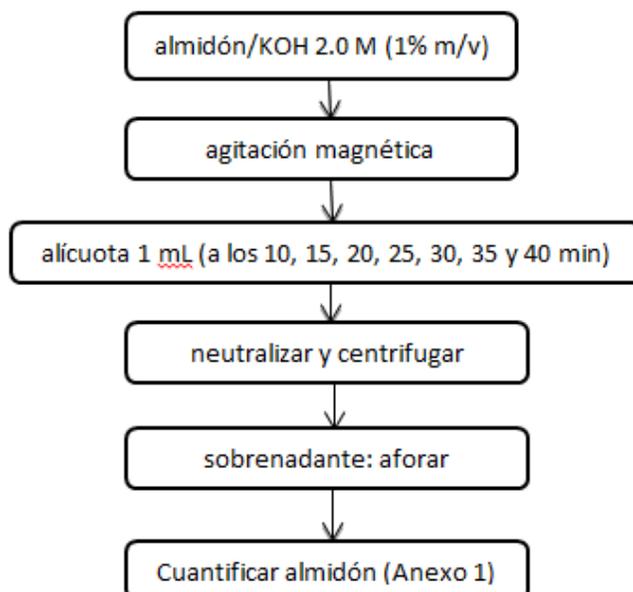
#### **2.1.2.1 Solubilización/gelatinización del almidón**

La complejación almidón-yodo depende de que el almidón se encuentre soluble. En la figura 5 muestra el diagrama de comparación para la solubilización de almidón de maíz normal y alto en amilosa considerando el uso de calor en solución acuosa y 2 concentraciones de KOH.



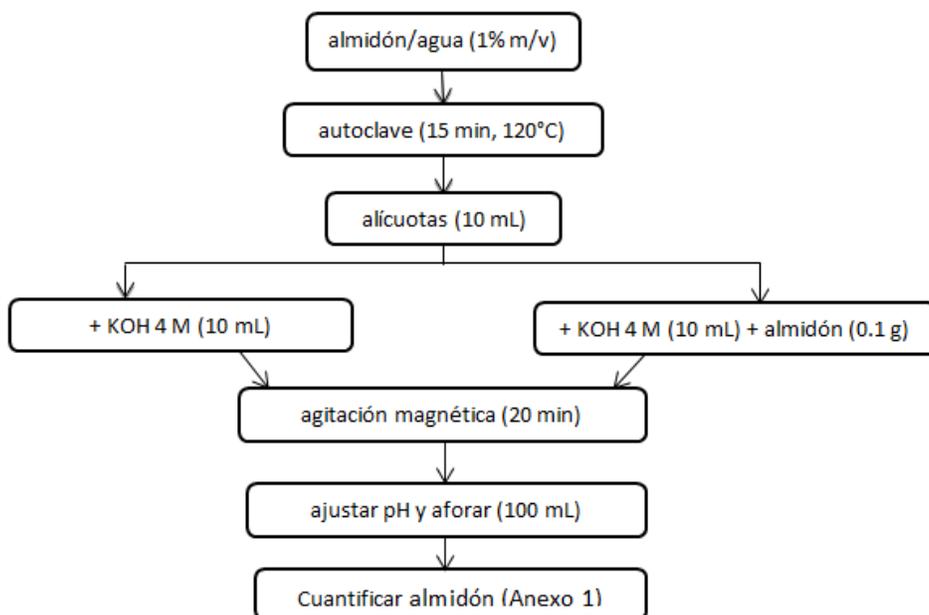
**Figura 5.** Pruebas de solubilidad de almidones en distintos solventes: agua destilada, KOH 0.2 y 2.0 M.

También se evaluó el tiempo necesario para disolver completamente al almidón en KOH 2.0 M, de acuerdo al diagrama de la figura 6, ya que un exceso de tiempo además de innecesario puede llevar a la degradación de los componentes del almidón. La centrifuga empleada fue Beckman J2-MC (7000 rpm, 10 min).



**Figura 6.** Determinación del tiempo requerido para la solubilización de almidón en KOH 2.0 M

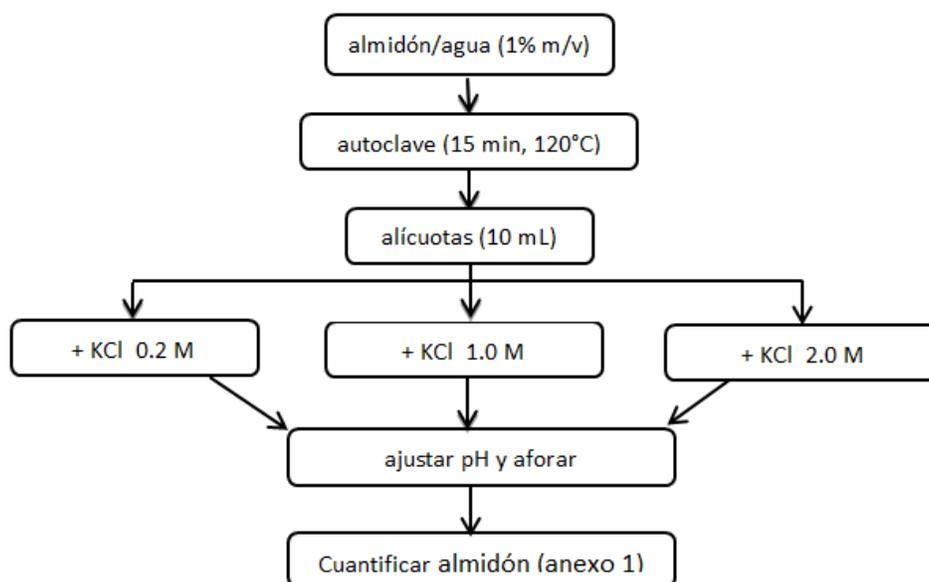
Para determinar el porcentaje de recobro del almidón al emplear KOH 2.0 M, como medida de la correcta cuantificación de almidón total, en la figura 7 se muestra el esquema utilizado.



**Figura 7.** Prueba de recobro de almidón en KOH 2.0 M.

### 2.1.2.2 Efecto de las sales en la cuantificación del complejo almidón-yodo

La formación de sales en el paso de neutralización, una vez solubilizado el almidón, no se ha referido como una variable del método pero tampoco se cuenta con información que reporte que no influye, por lo que a alícuotas de una misma solución de almidón se les añadió una concentración conocida de KCl (marca Merck) disuelto en agua destilada y se cuantificó almidón como se muestra en la figura 8.

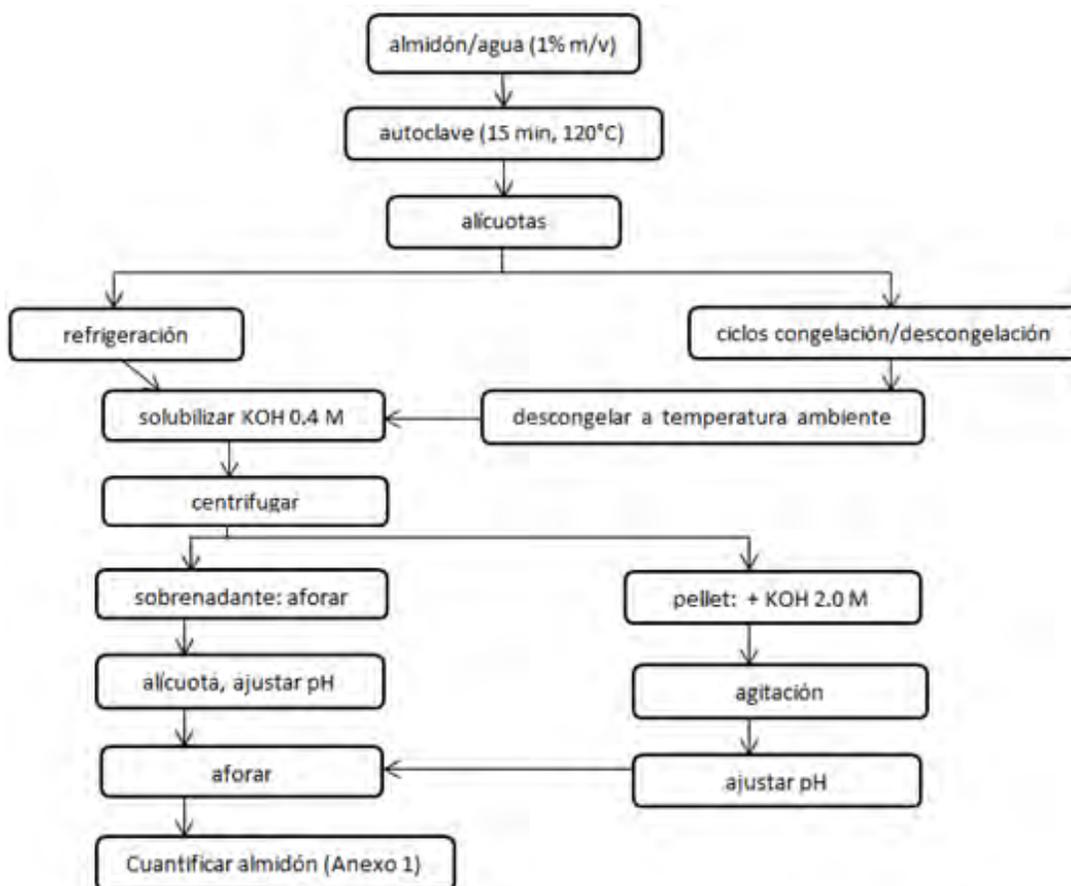


**Figura 8.** Evaluación de posible efecto de la presencia de KCl en la cuantificación de almidón.

### 2.1.3 Condiciones para retrogradación

Se evaluaron 2 condiciones de almacenamiento, en soluciones acuosas al 1% m/v de almidón de maíz normal y alto en amilosa, para inducir la retrogradación del almidón: refrigeración a 3°C y ciclos de congelación (- 8°C)/descongelación (~ 20°C) con la finalidad de detectar un cambio en la cantidad de almidón soluble.

Se utilizó la solubilización con KOH 0.2 M para el almidón gelatinizado y KOH 2.0 M para el almidón insoluble (que representa el retrogradado). En la figura 9 se presenta el procedimiento que se siguió. Los tiempos de agitación fueron de 20 min, se centrifugó a 7000 rpm (10 min); del sobrenadante, aforado a un volumen conocido, se tomó una alícuota y al pellet se añadió KOH 2.0 M. Se neutralizó una alícuota del sobrenadante y la solución final se llevó a pH 7.0 ± 0.2 con ácido clorhídrico (HCl) y finalmente, en la solución adecuadamente diluida, se cuantificó el almidón por complejación con yodo.

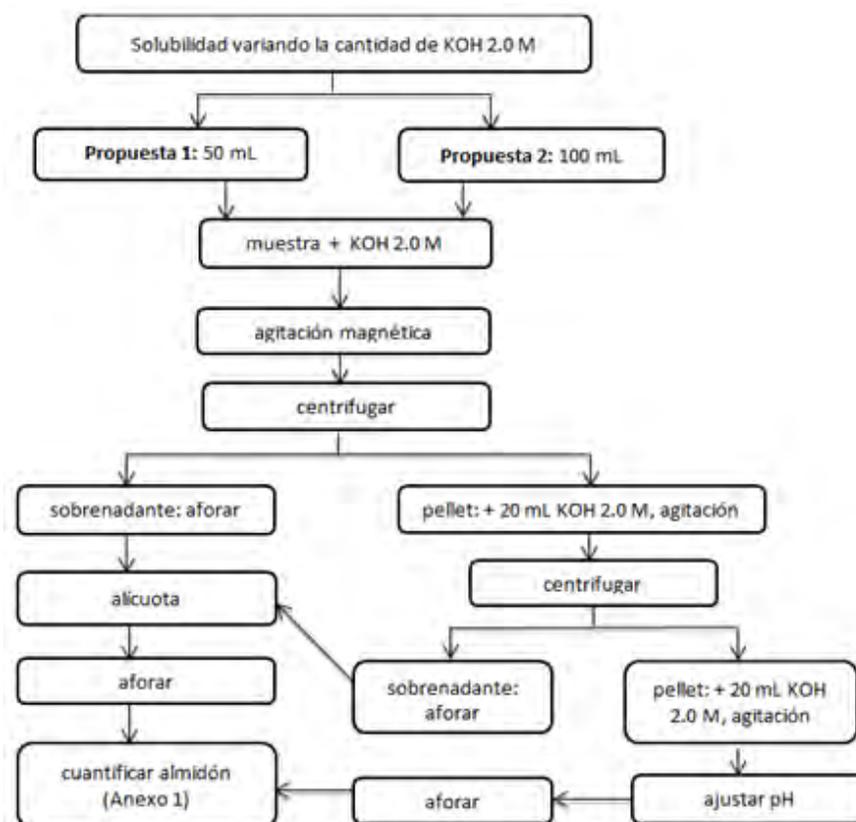


**Figura 9.** Pruebas con diferentes condiciones de almacenamiento para dar seguimiento a la retrogradación de soluciones de almidón.

## 2.2 Implementación del protocolo para determinar almidón en la muestra

Una vez establecidas las condiciones de experimentación que aseguran la cuantificación del almidón soluble y del retrogradado, se trabajó con masa y tortilla; la elaboración de ambas muestras se llevó a cabo en un supermercado (Walmart, ubicado en Av. Copilco #164 Col. Oxtopolco, México D.F.) donde se tienen estandarizadas las condiciones de elaboración desde la materia prima (con la finalidad de reducir la variabilidad por la muestra).

Se realizaron pruebas con 1.0 g de tortilla para fijar el volumen de solvente a emplear y asegurar que se mide completamente el almidón. La figura 10 muestra el esquema del procedimiento empleado para dos propuestas con diferentes volúmenes. La tortilla triturada se homogeneizó en mortero con aproximadamente 5 mL del solvente y con el resto se transfirió cuantitativamente a un vaso de precipitados; las condiciones de agitación, centrifugación, neutralización, etc. se mantuvieron como en los procedimientos anteriores.

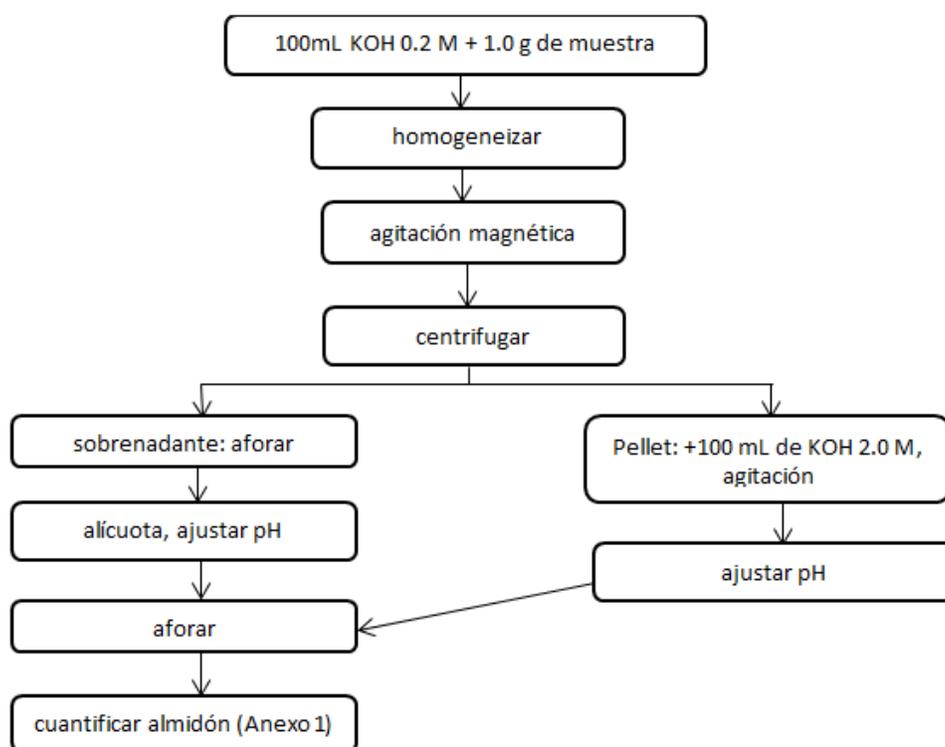


**Figura 10.** Pruebas de proporción solvente/muestra para solubilizar el almidón de tortilla con KOH 2.0 M.

### 2.3 Evaluación de la retrogradación

Se evaluó la retrogradación del almidón de masa y tortilla de maíz a diferentes tiempos: por día se sometían a dos ciclos de congelación/descongelación. Además de la determinación de almidón soluble y retrogradado, se cuantificó la humedad (método AOAC 925.10) de las muestras para calcular los resultados en base seca y poder comparar.

La figura 11 muestra el esquema del procedimiento de solubilización diferencial y complejación con yodo aplicado a las muestras.



**Figura 11.** Protocolo de solubilización diferencial con potasa para determinar almidón gelatinizado y retrogradado por complejación con yodo.

### 2.4 Determinación del contenido de fibra dietética

Se determinó el contenido de fibra dietética (siguiendo el método oficial AOAC 985.29) en ambas muestras variando los tiempos ( $t=0$ , 7 y 15 días para tortilla y 0, 7 y 14 días para masa) con la finalidad de tener las muestras con diferentes grados de retrogradación (promovida por ciclos de congelación/descongelación) y con ello diferente contenido de almidón resistente.

Para la homogeneización, ninguna muestra fue sometida a secado, para evitar formación de almidón resistente por este proceso; el tamaño de partícula se controló pasando la muestra por un tamiz de malla 40 (0.425 mm). En el caso de la tortilla y para masa sólo en  $t=0$ , el contenido de humedad no permitió homogeneizar directamente en mortero y tamizar, por lo que se modificó a *molienda húmeda*, añadiendo el amortiguador requerido en la determinación en el mortero y de igual manera pasándola por el tamiz.

Se tomó en cuenta el contenido de humedad aproximada para tener cerca de 1.0 g en base seca.

Con los resultados se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existía diferencia estadística en el contenido de fibra a los diferentes tiempos y una prueba de rango para diferencias significativas entre los tiempos (ambos con  $\alpha=0.05$ ).

### 3 Resultados y discusión

Los experimentos propuestos en metodología se realizaron para cumplir con los objetivos del trabajo y lograr la determinación analítica cuantitativa del almidón (tanto soluble como retrogradado) y de la fibra dietética.

El desarrollo, prueba en sistemas ideales y adaptación a las muestras del protocolo para cuantificar almidón por complejación con yodo incluyó diversas pruebas para establecer las condiciones de experimentación y seleccionar las óptimas. Se determinó contenido de humedad de los almidones empleados (ver anexo 2) para tener % de almidón en base seca.

La determinación de fibra dietética se realizó apegada al método AOAC 985.29 cambiando únicamente la forma de homogeneización de la muestra, los resultados se presentan en base seca para ser comparables.

#### 3.1 Curva patrón

La solución stock de almidón de papa estándar (Alyt) se preparó con diferentes disolventes: 1) en agua con calentamiento en autoclave (15 min, 120°C) y 2) en KOH 2 M (20 min de agitación). Con los resultados se elaboró la curva patrón (anexo 3) y se obtuvieron las siguientes ecuaciones por regresión lineal:

$$1) y = 5.1034x + 0.0199, \quad r = 0.9960 \quad \text{y} \quad r^2 = 0.9921$$

$$2) y = 5.1043x + 0.0015, \quad r = 0.9983 \quad \text{y} \quad r^2 = 0.9967$$

Las diferencias en las curvas debidas al método de preparación de la solución stock (forma de disolver el almidón) son mínimas, ambas tienen una relación lineal entre concentración y absorbancia, pudiendo utilizar cualquiera de las dos formas de preparación. Sin embargo, para referir los datos de absorbancia de las muestras y determinar el contenido de almidón (aparente debido a que las fuentes botánicas de almidón son diferentes) se consideraron los datos usando KOH 2 M como solvente por tener estadísticamente mayor correlación de los datos y por las condiciones experimentales pues el solvente para las muestras es KOH.

## 3.2 Variables de complejación

### 3.2.1 Solubilidad

La solubilidad/dispersabilidad del almidón es importante para el método colorimétrico (McGrance *et. al.*, 1998), por ello se evaluó la solubilidad de almidón de maíz normal y alto en amilosa en agua y KOH 0.2 M y 2.0 M.

La disolución gradual, es decir, el requerimiento de una concentración de KOH más alta para disolver almidón crudo y/o retrogradado respecto al gelatinizado, se tomó como fundamento para implementar la solubilización diferencial en KOH. Dado que la concentración es importante para solubilizar una u otra fracción, el KOH se empleaba recién preparado para evitar disminución en la concentración por formación de sales.

Debido a que el patrón de referencia es almidón de papa y las muestras de maíz, resulta importante conocer la relación que tienen, es decir, la respuesta.

Los resultados están expresados como:

$$\% \text{ respuesta} = \left( \frac{\text{almidón experimental}}{\text{almidón teórico}} \right) \times 100\%$$

donde almidón experimental es el cuantificado por complejación y teórico el que corresponde al almidón medido gravimétricamente (en base seca). La tabla 4 muestra las comparaciones de solubilidad.

**Tabla 4.** Pruebas de solubilidad de almidón en soluciones al 1% m/v empleando distinto solvente.

Solvente	Agua	KOH 2.0 M	KOH 0.2 M	
Tratamiento	autoclave (120°C, 15 min)	agitación magnética (20 min)		
% Respuesta	<i>Almidón de maíz normal</i>	<b>74.40 ± 0.66</b>	<b>85.13 ± 1.10</b>	<b>ND</b>
	<i>Almidón de maíz alto en amilosa</i>	<b>60.99 ± 1.01</b>	<b>157.12 ± 1.59</b>	<b>13.16 ± 0.22</b>

ND: no determinada.

Valor promedio (de triplicado) ± desviación estándar

Como se puede ver por los resultados de la tabla 4, en la solubilización influyen el tipo de almidón y la forma de disolverlo. Se sabe que al calentar el almidón en agua neutra por encima del punto de ebullición el almidón se solubiliza pero un

estudio reciente (Kim *et. al.*, 2012) indica que la solubilización total de almidones de maíz normal y ceroso es alrededor de 175°C; sin embargo por encima de 155°C se inicia una degradación significativa del almidón y una temperatura mayor a 185°C hidroliza completamente el polímero y a 191°C la solución se torna café.

Por lo tanto, el tratamiento en autoclave a 120°C, aunque evita degradación térmica, es insuficiente para solubilizar completamente el almidón, en especial en el caso del alto en amilosa. La cantidad de almidón normal solubilizado en autoclave varía en menor proporción comparado con KOH 2.0 M. Para ambos tipos de almidón la solubilidad es mayor en KOH 2.0 M

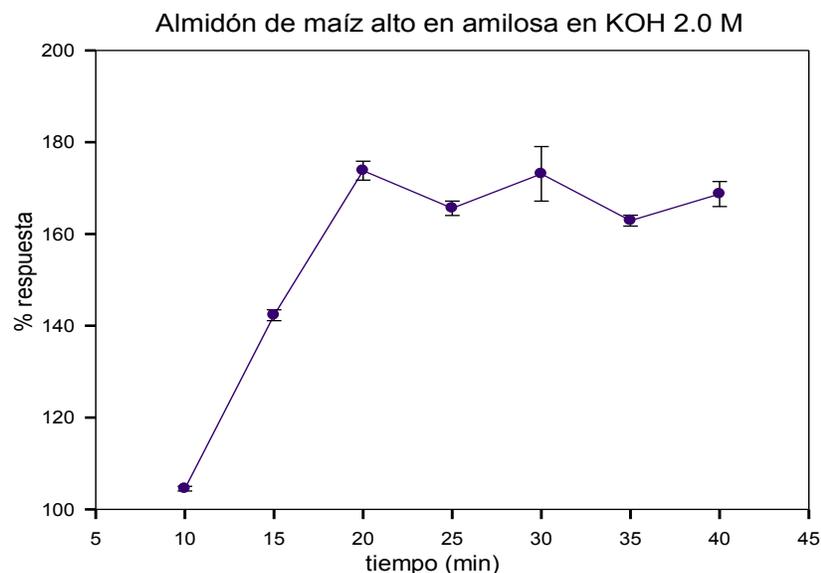
Para almidón de maíz normal, en KOH 0.2 M no se obtuvo respuesta en la reacción con yodo y en el caso del alto en amilosa si, aunque fue muy baja (13.16% de lo esperado), por lo que se puede decir que en el almidón alto en amilosa puede existir una fracción pregelatinizada (ya que a esa concentración de potasa es el tipo de almidón que se solubiliza).

El almidón alto en amilosa se solubiliza mucho mejor en KOH 2 M que en agua con ayuda de calor. En este solvente la respuesta es más del doble respecto a la obtenida en agua y alrededor de diez veces mayor comparado con el uso de KOH 0.2 M. Era de esperarse un resultado por encima del 100% en KOH 2.0 M dado que la curva patrón está referida a un almidón con menor cantidad de amilosa (ver tabla 1) y la longitud de onda a la cual se lee la absorbancia es característica del complejo amilosa-yodo.

### **3.2.2 Tiempo de solubilización para almidón en KOH 2.0 M**

Se prepararon soluciones de almidón de maíz alto en amilosa al 1% m/v; mientras se mantenían en agitación se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para medir la concentración del almidón solubilizado.

Los resultados promedio (por triplicado) para cada tiempo se muestran en la figura 13, la solubilidad se relaciona con % de respuesta, a mayor solubilidad mayor complejación y por lo tanto mayor respuesta al método.



**Figura 13.** Solubilidad de almidón de maíz alto en amilosa en KOH 2.0 M.

En la figura 13 se observó a los 20 minutos el punto de máxima respuesta, por lo que se consideró éste como tiempo suficiente para solubilizar la muestra. Las variaciones posteriores se mantienen dentro de un intervalo (163 a 173%) cercano al punto máximo (174%) por lo que se asocian al método y no a una degradación del almidón, la cual si sucede en ese medio pero no dentro del intervalo de tiempo evaluado. Por tratarse de almidón alto en amilosa es que el porcentaje de respuesta es mayor a 100%.

### 3.2.3 Recobro de almidón en KOH 2.0 M

La prueba de recobro se realizó con almidón de maíz normal, calculado como:

$$\%Recobro = \left[ \frac{(CF - CU)}{CA} \right] X 100$$

donde *CF*: concentración del almidón medida en una solución fortificada, a la cual se adicionan 95.1 mg (bs) de almidón; *CU*: concentración de almidón en la solución sin fortificar y *CA*: almidón adicionado.

El resultado, de la determinación por triplicado, fue  $80.04 \pm 1.03\%$ . Si se considera que para este tipo de almidón la respuesta al método, cuantificada por la prueba de solubilidad en potasa 2.0 M, dio 85.13%, en realidad se tiene un recobro del 94%.

### 3.2.4 Efecto del cloruro de potasio

La sal que se forma al neutralizar con ácido clorhídrico la potasa, que es requerida para solubilizar la parte de almidón, es cloruro de potasio (KCl) por lo que a alícuotas de una solución de almidón de maíz alto en amilosa en agua se añadieron concentraciones conocidas de KCl disuelto en agua.

Los resultados del contenido de almidón aparente en presencia de sales se muestran en la tabla 5, el análisis estadístico muestra diferencia significativa (ANOVA) y la prueba de rangos que la diferencia es entre todos los tratamientos.

**Tabla 5.** Efecto de adición de cloruro de potasio en la cuantificación de almidón alto en amilosa.

Concentración KCl añadido	Concentración KCl final (en la reacción)	% respuesta (almidón)
0.2 M	0.002 M	50.9 <sup>a</sup> ± 0.2
1.0 M	0.01 M	50.0 <sup>b</sup> ± 0.2
2.0 M	0.02 M	49.2 <sup>c</sup> ± 0.2

Valor promedio (de triplicado) ± desviación estándar

Letras diferentes existe diferencia significativa con  $\alpha=0.05$

El porcentaje de respuesta del almidón se encuentra ligeramente por debajo del obtenido en la prueba de solubilidad debido a que la solución tratada en autoclave se filtró para evitar la interferencia de la fracción insoluble (la cual precipita con el yoduro y/o queda como partículas suspendidas). Dada la sensibilidad del método, después del paso de neutralización se debe realizar una o varias diluciones, que se encuentran en el intervalo estudiado.

El análisis muestra que si hay una diferencia significativa influenciada por el contenido de sales con la tendencia de disminuir la respuesta (complejo almidón-yodo) con el incremento de KCl. Esto puede deberse a la interacción de los iones presentes con el yodo o de los iones con el almidón, tal que, disminuyen la complejación y como consecuencia la cantidad de almidón cuantificado.

Este efecto tras las diversas diluciones, inherentes al método por su sensibilidad y la cantidad inicial de almidón que se maneja dada la composición de las muestras, se ve minimizado, siendo mayor en la fracción de almidón cuantificado disolviendo en KOH 2.0 M, que aún con la disminución de almidón aparente por las sales tiene mayor porcentaje de respuesta (mayor contenido de almidón detectado) respecto

a soluciones disueltas en agua. Otra forma de reducir la interferencia de las sales es cuidando el paso de neutralización (para evitar un exceso de formación de sales por imprecisiones).

### 3.3 Condiciones para promover la retrogradación

La recristalización del almidón gelatinizado ocurre como un proceso dependiente del tiempo (Bello et. al., 2003); sin embargo, la temperatura juega un papel importante en la velocidad de retrogradación, las soluciones de almidón fueron sometidas a dos diferentes tipos de almacenamiento: refrigeración (3°C) y ciclos de congelación (-8°C)/descongelación (~20°C).

Se prepararon en autoclave (120°C, 15 min) soluciones al 1% m/v de almidón de maíz normal y alto en amilosa para observar la velocidad y grado de retrogradación por cambios en solubilidad.

Se midió la concentración (en todos los casos por triplicado) en la fracción soluble (con potasa 0.2 M) y en la fracción insoluble (solubilizando con potasa 2 M). La suma de almidón soluble e insoluble se usó como total de almidón cuantificado. El % de almidón de cada fracción se calculó como:

$$\% \text{ almidón } x = \left( \frac{\text{almidón fracción } x \text{ (\% respuesta)}}{\text{almidón total (\% respuesta)}} \right) \times 100$$

#### 3.3.1 Refrigeración

Alícuotas de 10 mL de soluciones al 1% m/v de almidón de maíz normal y almidón de maíz alto en amilosa se evaluaron a diferentes tiempos de almacenamiento en refrigeración.

La tabla 6 muestra los resultados de 2 soluciones de maíz normal, la primera se dividió en alícuotas después del tratamiento en autoclave (solución a) y la segunda (solución b) se filtró después de gelatinizar, con la finalidad de obtener alícuotas más homogéneas dado que durante el enfriamiento de 120°C a temperatura ambiente inicia la retrogradación y formación de un gel que dificulta la toma de alícuotas.

Esto se confirma experimentalmente con los resultados de almidón total que en la solución *a* varió entre 76 y 87%, indicando cambios de concentración de almidón en las alícuotas debida a heterogeneidad, no necesariamente notable a simple vista pues el método detecta concentraciones de 0.02 a 0.2 mg de almidón/mL de solución; en cambio en la solución que se filtró (*b*) el almidón total fue de 69 a 73%, un intervalo menor de variación. El valor total de almidón de la solución *b* es ligeramente menor respecto a la solución *a* por que una parte del almidón queda retenido en el paso de filtración.

**Tabla 6.** Fracciones soluble (en KOH 0.2 M) e insoluble (soluble en KOH 2.0 M) de soluciones de almidón de maíz normal almacenadas en refrigeración.

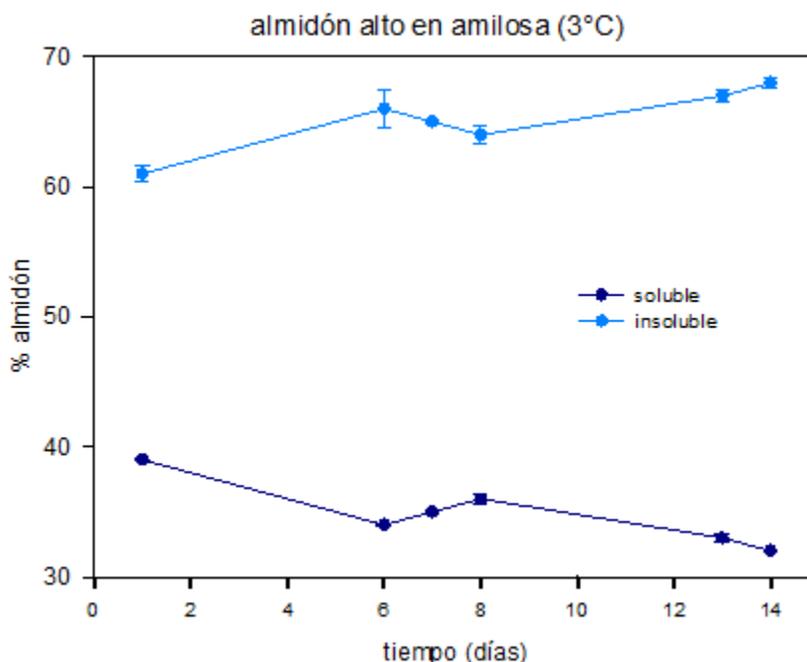
Tiempo (días)		1	2	3	6	7	8
% almidón	Soluble <i>a</i>	60.1 ± 0.4	64.1 ± 0.5	61.1 ± 0.9	51.4 ± 1.1	58.9 ± 0.2	54.3 ± 0.8
	Insoluble <i>a</i>	39.9 ± 0.9	35.9 ± 0.9	38.9 ± 0.5	48.6 ± 0.6	41.1 ± 0.4	45.7 ± 0.4
	Soluble <i>b</i>	69.1 ± 0.6	77.1 ± 0.8	83.1 ± 0.6	80.5 ± 0.2	82.1 ± 0.3	80.2 ± 0.3
	Insoluble <i>b</i>	30.9 ± 0.1	22.9 ± 0.2	16.9 ± 0.2	19.5 ± 0.1	17.9 ± 0.1	19.8 ± 0.2

Valor promedio (de triplicado) ± desviación estándar

Analizando la tabla 6 se puede ver que las soluciones *a* y *b* muestran un comportamiento opuesto, mientras en *a* termina aumentando la fracción insoluble (por la formación de almidón retrogradado), en *b* es la fracción soluble la que incrementa. Esto quiere decir que la eliminación de almidón que forma un gel en la filtración tuvo un efecto importante en la distribución y proporción amilosa/amilopectina de la solución final, porque al ser menor el contenido de almidón disminuye la velocidad de retrogradación y porque permite mayor contacto soluto-solvente; por lo tanto se explica el incremento de solubilidad que se observa en los primeros 3 días y los valores se estabilizan en los días 6 al 8 (soluble 80 a 82% e insoluble 18 a 20%).

En el caso de la solución *a* se observa la tendencia esperada: incremento de almidón insoluble por efecto de la retrogradación. Si bien la refrigeración promueve la retrogradación, en este caso el cambio es muy pequeño, los días 1 a 3 el contenido de almidón insoluble oscila de 36 a 40% y en los días 6 a 8 del 41 al 49%. La variación no es continua pero si muestra tendencia de cambio en la distribución de las fracciones disminuyendo la soluble y por lo tanto aumentando la insoluble.

Para el almidón de maíz alto en amilosa la solución se filtró después de gelatinizar ya que éste tiene baja solubilidad por tratamiento en autoclave y se buscó evitar interferencia del almidón no gelatinizado. Los resultados se muestran en la figura 14 (indicando valor promedio  $\pm$  desviación estándar), la cuantificación como almidón total fue de 111 a 117%.



**Figura 14.** Fracciones soluble (en KOH 0.2 M) e insoluble (solubilizado con KOH 2.0 M) de solución de almidón de maíz alto en amilosa almacenada en refrigeración.

Para las soluciones de almidón alto en amilosa, también hay incremento de la fracción de almidón insoluble por efecto de la retrogradación, la amilosa es conocida por retrogradar rápidamente (respecto a la amilopectina) y esto se hace evidente al comparar las fracciones iniciales: para el almidón normal en el día 1 es mayor la fracción soluble que insoluble y para el almidón alto en amilosa es mayor la fracción insoluble que la soluble. Posteriormente el efecto de retrogradación no es muy marcado debido a que la concentración de almidón es muy baja (la solución se preparó al 1% pero al filtrar esta concentración disminuyó), esto se corrobora en el porcentaje de respuesta (almidón total) que para almidón con alto contenido en amilosa disuelto en KOH 2.0 M es alrededor del 157% y para este experimento fue menor (111 a 117%).

La tendencia en el cambio de la distribución de las fracciones muestra una disminución de la soluble y en consecuencia aumento de la insoluble. El día 1 se tenía 39% de almidón soluble y para el día 14 cambió a 32%, la disminución en solubilidad en potasa 0.2 M se atribuye a las interacciones, como puentes de hidrógeno, que se forman principalmente entre las cadenas de amilosa (por su forma y por ser el componente mayoritario en este tipo de almidón).

### **3.3.2 Ciclos congelación/descongelación**

Alícuotas de 5 mL de soluciones al 1% m/v de almidón de maíz normal y almidón de maíz alto en amilosa se evaluaron a diferentes tiempos de almacenamiento sometidas a ciclos de congelación ( $-8^{\circ}\text{C}$ )/descongelación ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ).

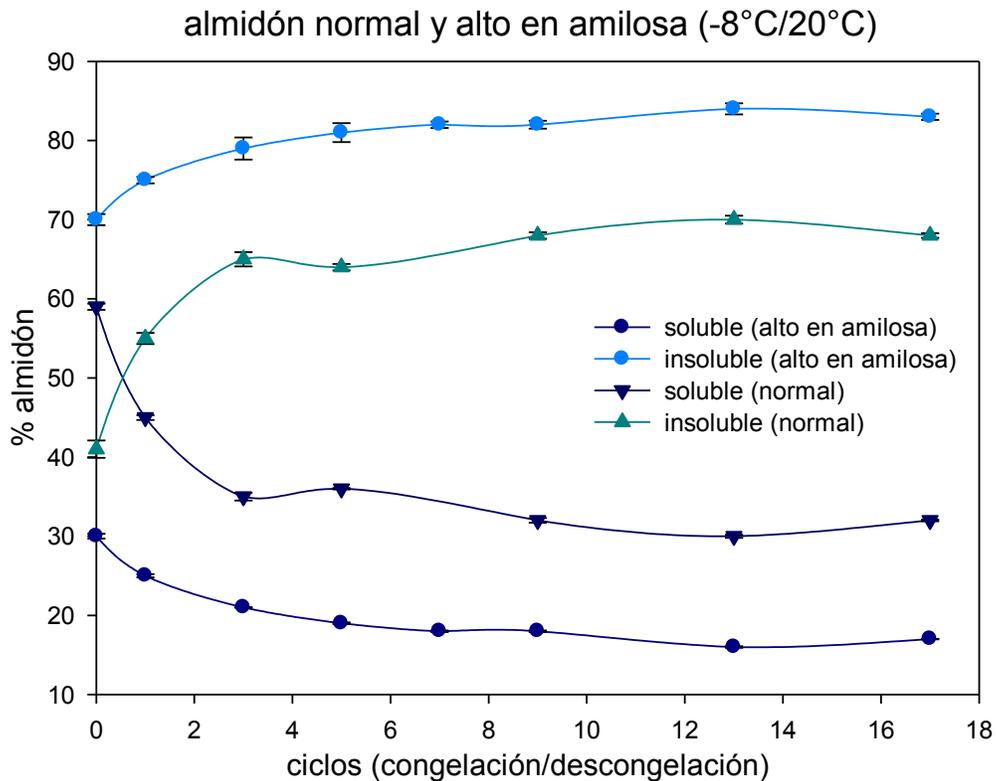
Aunque filtrar las soluciones mejora la homogeneidad de las alícuotas (menor variación en los valores de almidón total), este paso no se realizó con la finalidad de no modificar las proporciones de almidón y sus componentes, ya que el grado de retrogradación es afectado por la concentración de amilosa y amilopectina, tamaño molecular, temperatura, pH y los componentes diferentes al almidón presentes en el medio (Aristizábal, 2007), en este caso los factores que influyen son composición amilosa/amilopectina y temperatura.

Los resultados para ambas soluciones se presentan en la figura 15; el primer día las muestras se sometieron sólo a un ciclo de congelación/descongelación y el resto a dos ciclos (por cada día en que se realizó la determinación las muestras).

Se observa que el almidón de maíz alto en amilosa desde que se obtiene la solución ( $t=0$ ) tiene un alto porcentaje de almidón insoluble, esto era de esperar debido a que las soluciones se prepararon en autoclave (ver tabla 4 que compara la solubilidad de acuerdo al tratamiento) y como consecuencia el resto del almidón se retrograda a menor velocidad respecto al almidón normal.

Los ciclos de temperatura pueden promover un mayor nivel de retrogradación y formación de cristales, inducidos por la asociación de la amilopectina, más homogéneos y con una estabilidad térmica más alta comparado con los cristales formados en un almacenamiento isotérmico (Zhou *et. al.*, 2013); la amilosa

retrogradada tiene la característica de ser muy estable térmicamente. Si se compara también los resultados entre almacenamiento en refrigeración y el de ciclos, se observan diferencias que muestran también mayor nivel de retrogradación en el almacenamiento con ciclos de congelación/descongelación.



**Figura 15.** Fracciones soluble (en KOH 0.2 M) e insoluble (solubilizado con KOH 2.0 M) de soluciones de almidón de maíz normal y alto en amilosa sometidas a ciclos de congelación/descongelación.

El almidón normal, inicialmente tiene alrededor de 59% de almidón soluble que desciende hasta un valor cercano a la mitad, observable a partir de 9 ciclos (día 7), siendo el cambio más notorio los primeros 3 ciclos (cuando disminuyó de 59% a 36%) y estabilizándose, a partir de 9 ciclos, en valores entre 30 y 32%.

Una tendencia similar se observó para el almidón alto en amilosa, que disminuye de 30 a 19% en los primeros 5 ciclos y posteriormente (9 ciclos en adelante) se obtienen valores de 16 a 18%.

Por lo tanto, para ambos almidones, los ciclos de congelación/descongelación presentan las condiciones que promueven mayor retrogradación y que permiten observar los cambios en la solubilidad de los tipos de almidones (gelatinizado y

retrogradado) y debido a esto se empleó para inducir retrogradación en masa y tortilla.

### **3.4 Cuantificación de almidón en masa y tortilla de maíz blanco nixtamalizado**

Dada la importancia de la solubilidad del almidón para su determinación y evitar el uso excesivo de potasa, se realizaron pruebas de solubilidad del almidón de la tortilla utilizando KOH 2.0 M para su solubilización. Los resultados se expresan como: g de almidón/100 g muestra base seca.

La tabla 7 reporta el almidón solubilizado respecto a la cantidad de muestra utilizada, así como el porcentaje en cada fracción (cantidad soluble por fracción considerando la suma de I, II y III como el 100% solubilizado).

La fracción I es el almidón que se solubiliza en el primer paso de adición de KOH 2.0 M y la que interesa porque de ésta se define el volumen de solvente a emplear, dado que para el seguimiento de la retrogradación de la masa y tortilla se requiere solubilizar completamente al almidón contenido en éstas en un solo paso; es decir, asegurarnos que el volumen empleado puede solubilizar todo el almidón contenido en las muestras. Posteriormente, en las fracciones II y III se cuantifica almidón que va quedando como residuo al centrifugar, y cuyo resultado debe ser cercano a 0.

Debido a que esta muestra ya es un sistema complejo porque contiene grasa, proteína y minerales (ver anexo 4, tabla de análisis proximal de masa y tortilla de maíz blanco nixtamalizado) puede resultar en la disminución de la capacidad enlazante con yodo por formación de complejos de inclusión de lípidos con la amilosa (Morrison y Laignelet, 1983), así que nuevamente se refiere a un contenido de almidón aparente.

En la tabla 7, se observa la influencia de la relación solvente/muestra; para la propuesta 1 se obtuvo 86.07% del almidón total en los 50 mL iniciales (fracción I) y un remanente del 12.23% (fracción II) que es muy alto; mientras que, cuando se utilizan 100 mL se solubilizó el 98.13% del total experimental y el almidón

remanente en la fracción II es de sólo 1.17% disminuyendo a 0.71% en la fracción III. Cabe señalar que el total de almidón solubilizado en la propuesta 2 (56.42%) es mayor, por lo tanto se seleccionó esta relación muestra/disolvente.

**Tabla 7.** Solubilidad del almidón de la tortilla utilizando diferentes volúmenes de KOH 2.0 M con 1.0 g de muestra.

Fracción	Propuesta 1 (V <sub>inicial</sub> 50 mL de KOH)		Propuesta 2 (V <sub>inicial</sub> 100 mL de KOH)	
	g almidón/100 g muestra seca	% solubilizado	g almidón/100 g muestra seca	% solubilizado
I	44.88 ± 0.796	86.07	55.36 ± 0.375	98.13
II	6.38 ± 0.043	12.23	0.66 ± 0.007	1.17
III	0.89 ± 0.025	1.70	0.40 ± 0.007	0.71
Total	52.14	100	56.42	100

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

### 3.5 Retrogradación

Con la finalidad de observar los cambios cuantitativos en las fracciones soluble y retrogradada del almidón contenido en masa y tortilla, se dio seguimiento a la retrogradación inducida con ciclos de congelación/descongelación de las muestras, partiendo de 0 ciclos hasta 20 ciclos (en 14 días).

Se determinó al almidón soluble en KOH 0.2 M (almidón gelatinizado) y KOH 2.0 M (almidón insoluble/retrogradado) en diferentes ciclos de congelación/descongelación junto al respectivo control de humedad. Los datos se reportan en porcentaje en muestra base seca, para las fracciones *soluble* (utilizando KOH 0.2 M) y *retrogradado* (pellet disuelto en KOH 2.0 M). Se determinó un control del contenido de almidón total con la muestra solubilizada únicamente en KOH 2.0 M y el contenido de almidón total en las determinaciones es la suma de las fracciones soluble y retrogradado.

De los resultados en mg de almidón/mL, tomando en cuenta las diluciones y la respectiva muestra en base seca, se calculó el contenido de almidón como:

$$\% \text{ almidón} = \left( \frac{g \text{ almidón } (x)}{g \text{ muestra (base seca)}} \right) 100$$

que representa los g de almidón/100 g de muestra seca.

### 3.5.1 Tortilla almacenada en empaque plástico

La primera evaluación de la retrogradación se hizo con tortillas almacenadas en un empaque plástico que no permitía la permeabilidad al agua (empaque Ziploc®). Partiendo de 0 y hasta 20 ciclos de congelación/descongelación, se determinó almidón soluble en KOH 0.2 M y KOH 2.0 M como se muestra en la tabla 8. Se reportan datos para las fracciones de almidón *soluble* y *retrogradado*, así como un control del contenido total al inicio y final de la prueba (0 y 20 ciclos).

Del seguimiento al contenido de humedad los resultados estuvieron dentro del intervalo de 40 a 45%; esto porque aunque si se liberaba agua, por efecto de la retrogradación y se observaba en la formación de hielo, éste quedaba dentro del empaque y al descongelarse era adsorbido por las tortillas.

**Tabla 8.** Monitoreo de retrogradación de tortilla de maíz blanco nixtamalizado almacenada en empaque plástico, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

Tiempo	días	0	1	2	3	4	7	8	9	10	14
	ciclos	0	2	4	6	8	10	12	14	16	20
% almidón	soluble	25.8 ± 0.1	23.6 ± 0.04	20.0 ± 0.1	21.7 ± 0.3	23.0 ± 0.2	22.0 ± 0.1	20.9 ± 0.3	21.7 ± 0.2	21.6 ± 0.2	20.8 ± 0.2
	retrogradado	48.4 ± 0.1	44.6 ± 0.8	45.1 ± 0.7	44.1 ± 0.3	44.3 ± 0.5	46.7 ± 0.3	41.3 ± 0.9	43.9 ± 0.7	43.9 ± 0.3	49.4 ± 0.3

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

Aunque los primeros dos días disminuye el almidón soluble cuantificado, esto no se ve reflejado en un aumento de la fracción insoluble. Los valores se encuentran entre 20 y 26% para almidón soluble y entre 44 y 49% para almidón retrogradado.

Por lo anterior y ya que se esperaba una tendencia a la retrogradación más marcada como en el caso del sistema ideal, se modificaron las condiciones de almacenamiento, en cuanto al empaque, las muestras fueron conservadas en el papel en el que se venden comúnmente las tortillas.

Al comparar los porcentajes de almidón soluble y retrogradado junto con los respectivos controles (tabla 9), se tiene una diferencia en el día 0, donde la cuantificación con el control fue 5% menor a la obtenida por solubilización diferencial, la variación puede ser dada por el método y/o heterogeneidad en la

muestra. La segunda es más probable debido a que la adsorción de agua puede ser el factor de variación ya que no es completamente homogénea dicha adsorción y en general el cambio en composición, respecto a un sistema ideal, interfirió en la velocidad de retrogradación y/o respuesta al método.

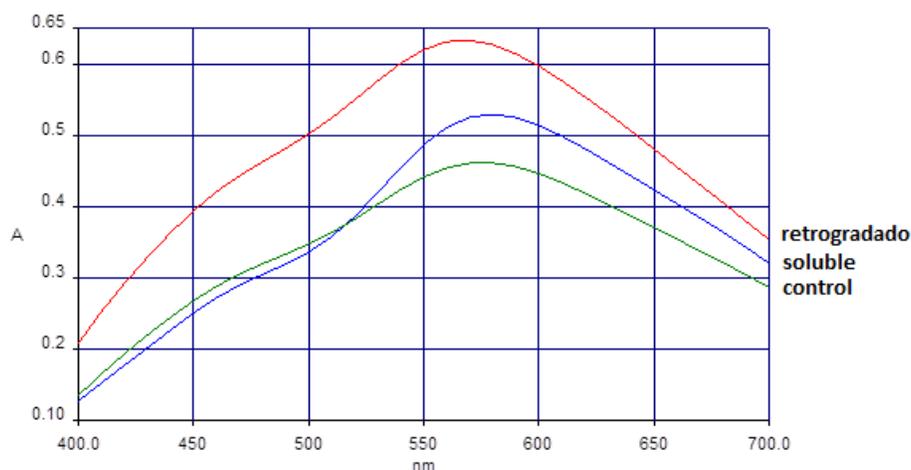
**Tabla 9.** Monitoreo de retrogradación de tortilla de maíz blanco nixtamalizado almacenada en empaque plástico, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

Tiempo	días	0	14
	ciclos	0	20
% almidón	soluble	25.8 ± 0.1	20.8 ± 0.2
	retrogradado	48.4 ± 0.1	49.4 ± 0.3
	<b>Total</b>	<b>74.2</b>	<b>70.2</b>
	<b>Control</b>	<b>69.3 ± 0.6</b>	<b>70.8 ± 0.3</b>

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

Por otra parte, con el propósito de entender lo observado y conociendo que dependiendo de la longitud de onda en la que se encuentra el pico de máxima absorción se puede diferenciar entre amilosa y amilopectina o en su defecto la mezcla de éstas (McGrance *et. al.*, 2003), se determinó el espectro de absorción de dicho complejo a los 20 ciclos de congelación/descongelación (figura 16).

El espectro indicó que en la parte soluble en KOH 0.2 M se tiene más amilosa (ya que el pico máximo se encuentra en 580 nm) y en la retrogradada, solubilizada con KOH 2.0 M después de ser separada por centrifugación, amilopectina (con un máximo en 568 nm). El control corresponde a la mezcla y el pico máximo está en 575 nm, es decir, un valor intermedio.



**Figura 16.** Espectro de absorción del complejo almidón-yodo a los 20 ciclos (14 días) para las fracciones soluble y retrogradada de tortilla almacenada en Ziploc y el control de almidón total con KOH 2.0 M.

Se ha reportado, en el caso del pan, que si el empaque previene la simple pérdida de humedad, el mecanismo de retrogradación que predomina es dependiente del tiempo de la re-cristalización de la amilopectina y a su vez la velocidad y grado de cristalización de la amilopectina dependen de la movilidad de sus ramificaciones exteriores (Gray y Bemiller, 2003); por lo que si el mecanismo es dependiente de la retrogradación de la amilopectina, se puede relacionar una retrogradación lenta con el espectro (figura 16), donde se observa mayor contenido de amilopectina.

### 3.5.2 Tortilla almacenada en papel

El cambio de empaque para almacenar la muestra durante los ciclos de congelación/descongelación permitió una libre pérdida de humedad (tabla 10), pues en el reacomodo de los componentes del almidón (amilosa y amilopectina) se libera agua.

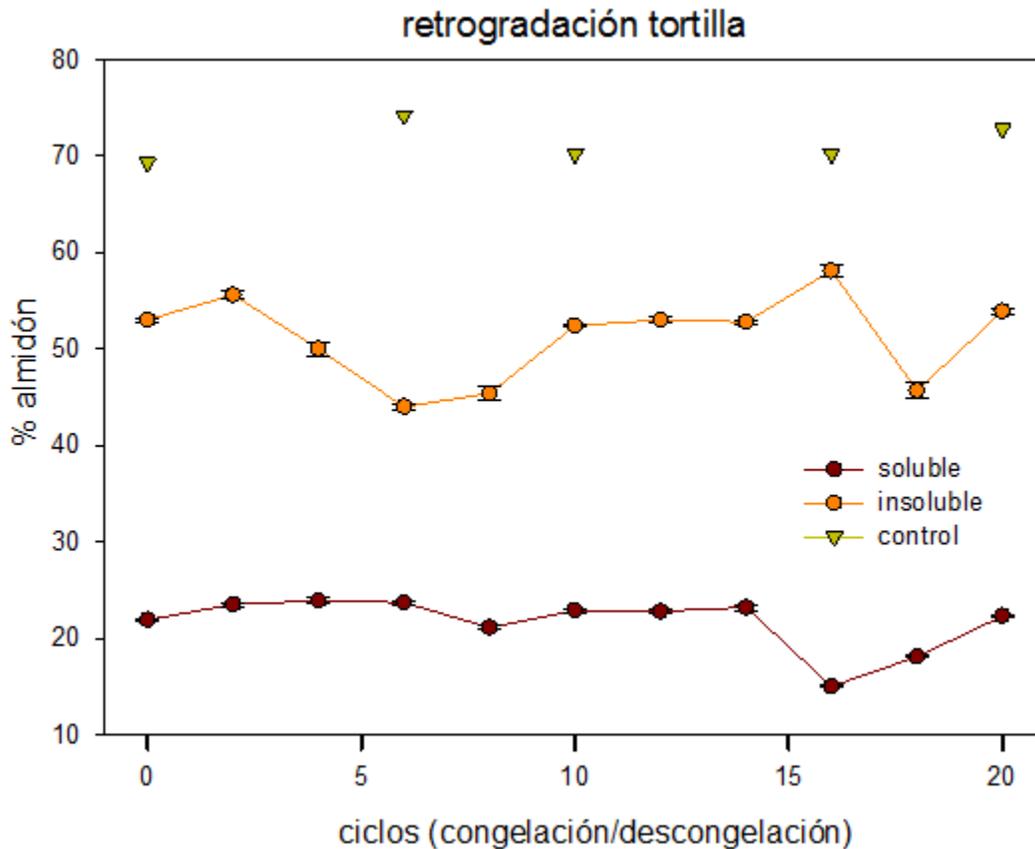
Por lo que, mientras al mantener la tortilla en un empaque plástico la humedad se mantuvo entre 40 y 45%, la tendencia a disminuir al permitir la permeabilidad del agua por el empaque de papel se reflejó en un cambio de 46% (0 ciclos, día 0) a 10% (20 ciclos, 16 días).

**Tabla 10.** Monitoreo de contenido de humedad de tortilla de maíz blanco nixtamalizado almacenada en papel, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

Tiempo		% humedad
días	ciclos	
0	0	46.2 ± 2.3
1	2	43.6 ± 0.3
2	4	39.9 ± 1.3
3	6	36.9 ± 0.7
7	8	31.1 ± 1.3
8	10	29.0 ± 1.9
9	12	27.6 ± 0.7
10	14	19.0 ± 1.5
14	16	15.0 ± 0.4
15	18	13.6 ± 0.4
16	20	10.2 ± 0.2

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

Una vez modificado el tipo de empaque, siguiendo el mismo procedimiento de solubilización y complejación y las mismas condiciones para los ciclos; se determinó el contenido de almidón realizando un par de controles adicionales de almidón en puntos intermedios así como determinaciones del espectro de absorción. La figura 17 representa el seguimiento dado a la retrogradación de la tortilla envuelta en papel.



**Figura 17.** Monitoreo de retrogradación de tortilla de maíz blanco nixtamalizado almacenada en papel, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

En la figura 17 se observa que en los primeros 6 ciclos (3 días) hay un incremento en la fracción soluble, lo cual en parte se debe al desplazamiento del pico de máxima absorción hacia los 600 nm (figura 18), la amilosa predomina en la parte soluble mientras que la amilopectina en la retrogradada y por lo tanto el almidón total (68%, calculado como suma) disminuye comparado con el control (74%) a los 6 ciclos.

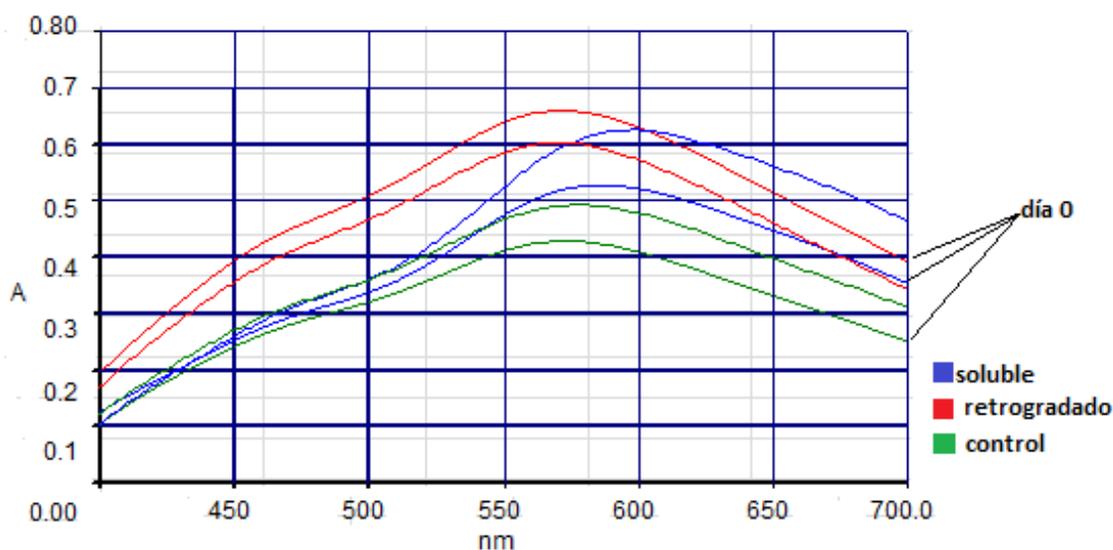
La fracción de almidón retrogradado muestra una gran variabilidad sin que se pueda apreciar una tendencia clara de aumento, en realidad, los primeros ciclos

disminuye (53 a 43%), de 10 a 14 ciclos (días 8 a 10) se mantiene (52 a 53%) y finalmente los ciclos 16 a 20 (días 14 a 16) varía entre 46 y 58%.

En cuanto al control de almidón, los valores van de 69 a 74%; por otra parte el valor correspondiente a la suma de almidón soluble y retrogradado, presenta mayor variación (de 67 a 80%) que puede deberse a la composición de las fracciones soluble y retrogradada, es decir, al cambio en la longitud de onda del pico máximo de absorción del complejo almidón-yodo.

Los valores de los controles junto con sus espectros (anexo 5, espectros de absorción de los controles) mostraron que el almidón no varía en composición a lo largo del experimento, que es de esperarse pues amilosa y amilopectina no se modifican en cantidad sino en su solubilidad de acuerdo a sus interacciones y reorganización.

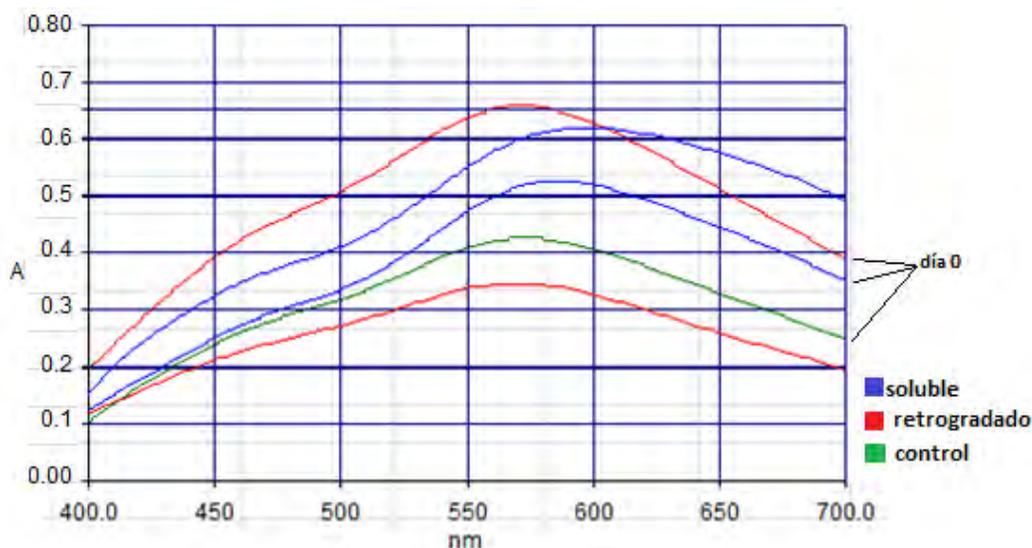
El tipo de empaque influyó en la retrogradación, aunque este efecto no es claro en la diferencia de solubilidad, en los espectros de absorción si se observa un cambio en la composición de las fracciones (figura 18 y 19).



**Figura 18.** Espectro de absorción del complejo almidón-yodo a los 0 y 6 ciclos (0 y 3 días) para las fracciones soluble y retrogradada de tortilla así como el control de almidón total con KOH 2.0 M.

De la figura 19, el pico más cercano a 600 nm indica mayor contenido de amilosa, esto se observa en la fracción soluble a los 18 ciclos; el pico máximo en la fracción

retrogradada en ambos tiempos está alrededor de 570 nm, al ser la longitud de onda más baja corresponde a un mayor contenido de amilopectina.



**Figura 19.** Espectro de absorción del complejo almidón-yodo a los 0 y 18 ciclos (0 y 15 días) para las fracciones soluble y retrogradada de tortilla así como el control de almidón total con KOH 2.0 M.

De los resultados cuantitativos (figura 17) se seleccionaron los tiempos para la determinación de fibra, considerando el cambio observado en la parte soluble; se eligieron tres tiempos: 0, 8 y 18 ciclos (0, 7 y 15 días, respectivamente). Esta elección se complementó con los cambios cualitativos observados en los espectros de absorción.

El ciclo 0 actúa como control (muestra sin retrogradar por ciclos de congelación/descongelación), 8 ciclos es un punto intermedio para el cual ya ocurrieron cambios en la solubilidad del almidón y finalmente 18 ciclos.

El tipo de empaque para almacenar las muestras mientras se promueve la retrogradación tiene un efecto en la reorganización del almidón; los efectos consecuencia de la retrogradación se aprecian mejor y en menor tiempo cuando el empaque permite la permeabilidad del agua.

### 3.5.3 Masa almacenada en papel

Se dio seguimiento a la retrogradación de masa de maíz blanco nixtamalizado, almacenada en forma esférica envuelta en papel, sometida a ciclos de congelación/descongelación. Se realizó muestreo para las pruebas de almidón,

humedad y, cuando era el caso, control de almidón total y al finalizar lo que restaba de masa se congelaba nuevamente en forma de esfera.

Los resultados se muestran en la figura 20, de igual forma se empezó de 0 ciclos (0 días); a los 16 ciclos (día 14) la masa llegó a un punto donde ya no tenía suficiente humedad como para compactarse y congelarse nuevamente y se comportaba nuevamente como harina (la masa fue elaborada a partir de harina de maíz blanco nixtamalizado) y por ello es el último dato que se registra.

El cambio en el contenido de humedad se reporta en la tabla 11; la tendencia en la masa es la pérdida de humedad, que inicialmente tenía 59% (0 ciclos) y pasó a 23% (16 ciclos).

**Tabla 11.** Monitoreo de contenido de humedad de masa de maíz blanco nixtamalizado almacenada en papel, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

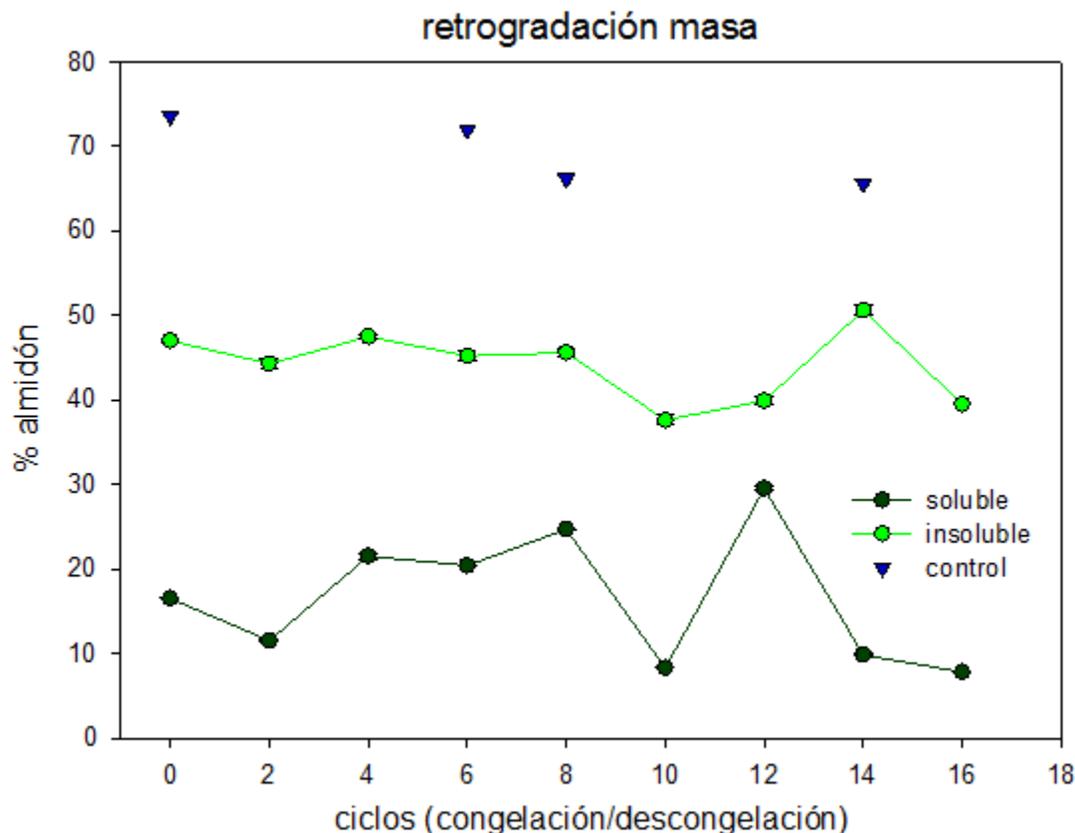
tiempo		% humedad
Días	ciclos	
0	0	58.8 ± 0.4
1	2	54.6 ± 1.3
2	4	53.2 ± 0.4
3	6	51.0 ± 0.2
7	8	46.8 ± 0.6
8	10	40.9 ± 2.4
9	12	33.8 ± 1.0
10	14	29.1 ± 2.0
14	16	22.9 ± 0.4

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

El almidón total cuantificado varió mucho en un intervalo entre 46 y 70% mientras que los controles se mantuvieron entre 66 y 74%. La variación en general de los datos es menor en los primeros 6 ciclos; del 8 en adelante aumenta, esto puede deberse a heterogeneidad formada en la muestra por migración de humedad (la cual se da del centro a la superficie).

En la figura 20 se observa que el comportamiento de la masa es disperso; para la parte soluble no se detecta ninguna tendencia continua y mientras se avanza en tiempo el comportamiento es más irregular. En cuanto a la fracción de almidón retrogradado, los primeros 8 ciclos (7 días) hay cierta estabilidad dentro del

intervalo de 44 a 48% y a partir de los 10 ciclos (día 8) presenta resultados dispersos.



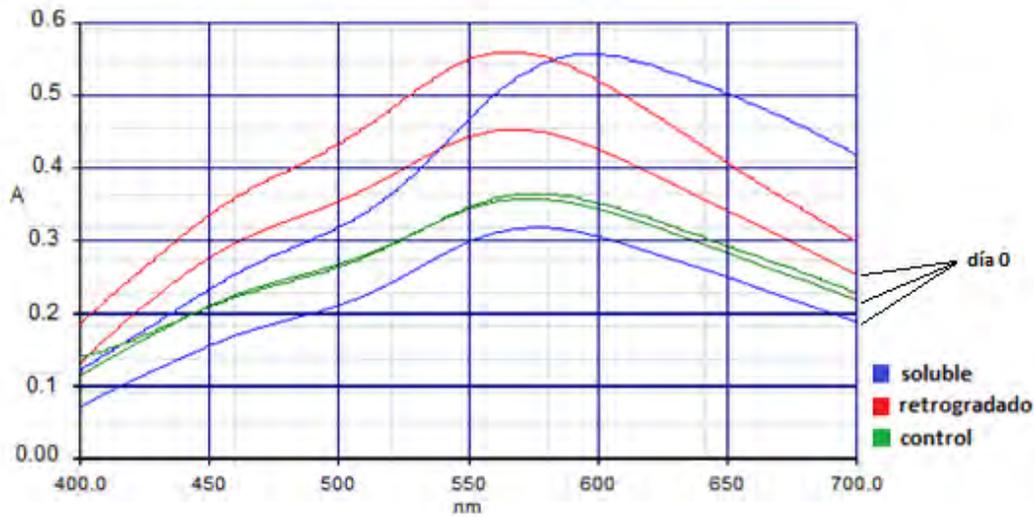
**Figura 20.** Monitoreo de retrogradación de masa de maíz blanco nixtamalizado almacenada en papel, sometida a ciclos de congelación/descongelación.

Relacionando los porcentajes de almidón detectados en las fracciones soluble y retrogradada con los espectros correspondientes, se observa un desplazamiento del pico de máxima absorción en el espectro de la fracción soluble del ciclo 0 al 8, aproximadamente de 575 nm a 595 nm (figura 21). Es decir, cambia la composición amilosa/amilopectina de las fracciones.

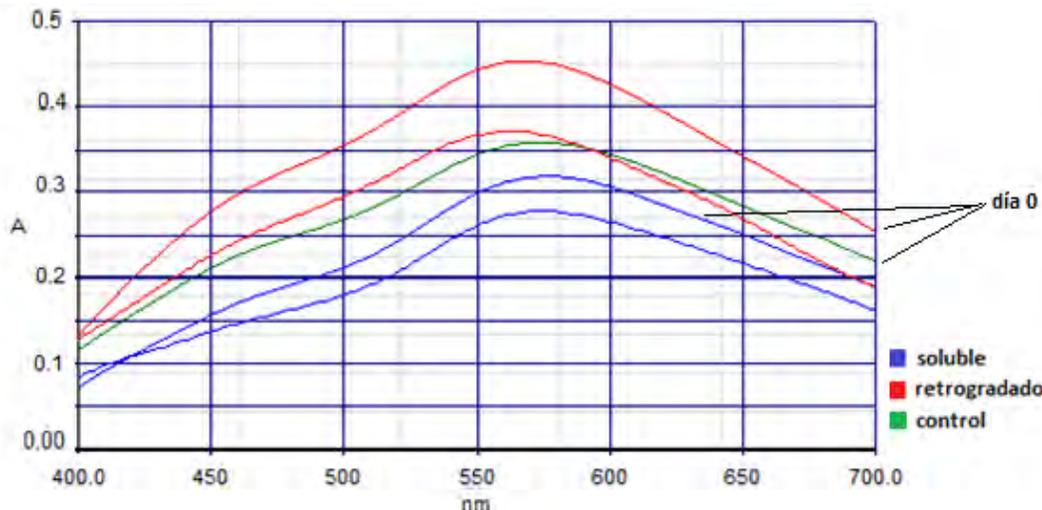
En el caso del espectro a los 16 ciclos (figura 22), la fracción soluble es similar, en cuanto a forma y pico máximo de absorción, con el espectro del día 0. Para la fracción retrogradada el desplazamiento del pico máximo de absorción es alrededor de 570 nm (0 ciclos) a 560 nm (16 ciclos), que puede deberse a un aumento en el contenido de amilopectina.

Los tiempos seleccionados para la determinación de fibra fueron 0 ciclos (0 días) como control; 8 ciclos (7 días), tiempo en el cual, con base en un criterio cualitativo

(figura 21), es evidente el cambio en el pico máximo de absorción de la fracción soluble (de 575 nm a 600 nm, aproximadamente); y 16 ciclos (14 días) que fue el tiempo al cual la muestra, por su baja humedad y comportamiento como harina se espera ya no se retrograde. Establecer un criterio cuantitativo (figura 23) para la selección de tiempos resulta complicado por la irregularidad y dispersión de los resultados.



**Figura 21.** Espectro de absorción del complejo almidón-yodo a los 0 y 8 ciclos (0 y 7 días) para las fracciones soluble y retrogradada de masa así como el control de almidón total con KOH 2.0 M.



**Figura 22.** Espectro de absorción del complejo almidón-yodo a los 0 y 16 ciclos (0 y 14 días) para las fracciones soluble y retrogradada de masa así como el control de almidón total con KOH 2.0 M.

Actualmente, para la determinación de almidón resistente no se ha encontrado ningún método que sea adecuado para todo tipo de alimento (Zhou *et. al.*, 2013); el desarrollo del método de solubilización diferencial en potasa y complejación con

yodo para cuantificar almidón fue adecuado al especificar las condiciones por referencias y/o evaluación experimental de las variables inherentes al método.

Éste es aplicable en un sistema ideal (sólo almidón) y presenta complicaciones en un producto alimentario (por interferencia de otros componentes, como lípidos), pero aporta información cuantitativa y cualitativa útil (simplemente debe ser manejada con cuidado y evitar generalizar, ya que el método depende de la composición amilosa/amilopectina del almidón). La determinación del espectro visible de absorción del complejo almidón-yodo formado fue una herramienta auxiliar para correlacionar los cambios observados cuantitativamente.

### 3.6 Fibra dietética

Para evaluar el efecto de procesamiento térmico y de la retrogradación de almidón (expresadas como formación de almidón resistente) de masa y tortilla, en el contenido de fibra, se realizaron determinaciones de fibra dietética total por el método 985.29 de la AOAC para muestras sometidas a inducción de la retrogradación tanto por efecto térmico de secado como por almacenamiento con ciclos de congelación/descongelación.

#### 3.6.1 En masa y tortilla evaluando efecto térmico

Para evaluar el efecto térmico por cocción se comparó el contenido de fibra en masa y tortilla en el ciclo 0 (día 0). También se determinó para las muestras a los 0 ciclos pero secando la muestra, como lo indica originalmente la metodología oficial (AOAC), y que da un parámetro más de comparación del efecto térmico. Los resultados se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12.** Contenido de fibra dietética total (FDT) por el método AOAC 985.29 en tiempo 0 (sin retrogradar) evaluando el efecto de secado en masa y tortilla de maíz blanco nixtamalizado.

Muestra/Condición		g FDT/ 100 g muestra base seca	Coefficiente de variación (%)
Masa	AOAC	6.36 ± 0.202 <sup>a</sup>	3.18
	0 días/0 ciclos*	7.15 ± 0.404 <sup>b</sup>	5.64
Tortilla	AOAC	9.02 ± 0.061	0.68
	0 días/0 ciclos*	8.11 ± 0.304	3.75

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

\* Muestra homogeneizada por *molienda húmeda*.

De las determinaciones de fibra lo primero que se espera es que el contenido sea mayor en todos los casos en tortilla respecto a masa, por el tratamiento térmico en la cocción, y esto si se cumple (comparar tabla 13 y 14).

En este caso el efecto térmico del secado en la homogeneización de la muestra se observa como un descenso tratándose de la masa y como un incremento tratándose de la tortilla. Este comportamiento contradictorio se puede explicar por la estabilidad térmica de los cristales formados durante la retrogradación (del proceso de nixtamalización, secado para la elaboración de harina y finalmente cocción para pasar de masa a tortilla).

La tortilla se somete a un proceso térmico más, respecto a la masa, y esto lleva a la formación de cristales más estables de amilopectina y por lo tanto mayor contenido de almidón resistente reflejado como un incremento en el contenido de fibra dietética; en el caso de la masa donde el secado para la determinación produce una disminución puede deberse a la fusión, ya sea de los cristales de amilopectina que fusionan fácilmente por cocción normal (por calor húmedo a 60°C) mientras que los cristales de amilosa generalmente permanecen estables (Zhou *et. al.*, 2013) o de complejos amilosa-lípido (al inicio del secado) que se produce de 100 a 120°C con agua en exceso, una temperatura más alta que la de las ramas en doble hélice de amilopectina empaquetada en orden cristalino (Fennema, 2000).

Un cuestionamiento válido sobre por qué un proceso térmico produce efectos contrarios se explica en la diferencia en temperatura y tiempo de éste; la cocción de masa para elaborar tortilla consta de minutos a 97°C, mientras que el secado son horas (hasta obtener peso constante) a 105°C.

Así, la disminución de fibra dietética en masa por efecto del secado se puede asociar a la gelatinización (el contenido de humedad es alrededor del 60% y la nixtamalización es un tratamiento en el cual se da una gelatinización parcial), fusión de complejos con lípidos y/o fusión de complejos de amilopectina; cuando las muestras son analizadas como se consumen, es decir, directamente del almacenamiento y sin tratamiento térmico, algunos estudios reportan que la

amilopectina en muestras de almidón retrogradado reducen la digestibilidad del almidón y estas muestras contienen altas cantidades de almidón resistente (Zhou *et. al.*, 2013), estos estudios, aunque están referidos principalmente a almidón resistente, son compatibles con el resultado de contenido de fibra en masa si consideramos que el almidón resistente tipo 3 se cuantifica en el ensayo de fibra.

Para el caso de la tortilla la explicación es más simple, en la retrogradación por efecto térmico se forman compuestos termoestables consecuencia de la cadena de procesos a los que se ha sometido. Se ha mencionado que la formación de almidón resistente podría favorecerse por la práctica de los consumidores de tortilla que las almacenan bajo condiciones de refrigeración y las someten a un ciclo de calentamiento y enfriamiento hasta que el producto se agota (Paredes *et. al.*, 2009).

### 3.6.2 En masa evaluando efecto de ciclos de temperatura

Los resultados de la determinación en masa sometida a ciclos de congelación/descongelación se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Contenido de fibra dietética total (FDT) por el método AOAC 985.29 a diferentes grados de retrogradación promovida por ciclos de congelación/descongelación en masa de maíz blanco nixtamalizado.

	Muestra/Condición	g FDT/ 100 g muestra base seca
Masa	0 días/0 ciclos*	7.15 ± 0.404 <sup>a</sup>
	7 días/8 ciclos	7.16 ± 0.177 <sup>a</sup>
	14 días/16 ciclos	6.35 ± 0.338 <sup>b</sup>

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

\* Muestra homogeneizada por *molienda húmeda*.

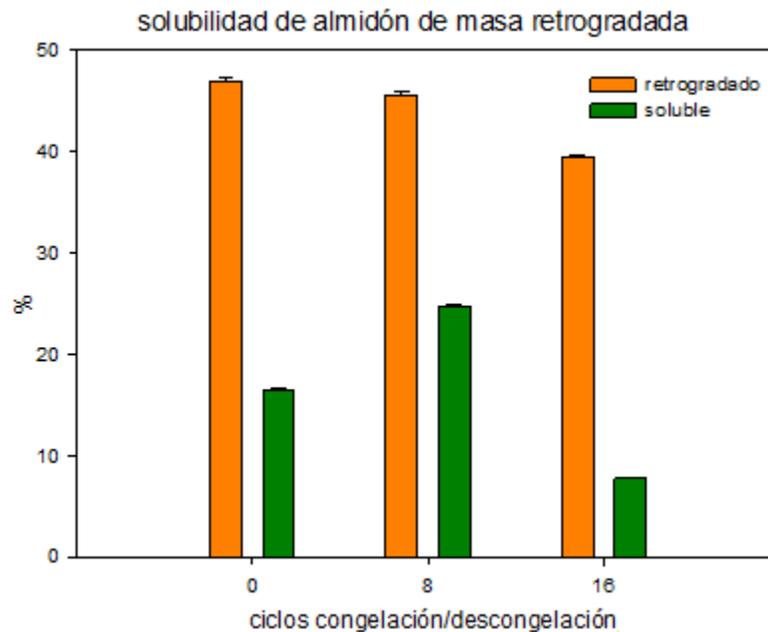
<sup>a-b</sup>Letras iguales no hay diferencia significativa con  $\alpha=0.05$ .

Sólo existe diferencia significativa con la determinación a los 16 ciclos (14 días), donde se obtiene un menor contenido de fibra.

Durante la retrogradación de la masa se observa un cambio cualitativo en las fracciones solubilizadas entre 0 y 8 ciclos (figura 21) y una composición similar a la muestra sin retrogradar (control) para el caso de los 16 ciclos (figura 22). En cuanto a los resultados cuantitativos, la figura 23 resume los resultados de los puntos seleccionados; la fracción detectada como insoluble coincide con los resultados de fibra; es decir, se tiene el mismo % de almidón insoluble a los 0 y 8

ciclos y no existe diferencia significativa en la determinación de fibra entre esos días. Para el ciclo 16, la fracción insoluble disminuye y el contenido de fibra también.

Las fracciones solubles no coinciden con la tendencia debido al desplazamiento del pico de máxima absorción, para 0 y 16 ciclos es similar pero en el caso de 8 ciclos la sobrestimación se debe al desplazamiento del pico a 600 nm.



**Figura 23.** Fracciones soluble (en KOH 0.2 M) e insoluble (soluble en KOH 2.0 M) de masa de maíz blanco nixtamalizado sometida a ciclos de congelación/descongelación para los ciclos 0, 8 y 16.

La disminución del % de almidón cuantificado como retrogradado es parte del fenómeno complejo de retrogradación; las zonas de asociación formadas están influenciadas (ya sea favorecidas o inhibidas) por la presencia de otros ingredientes tales como grasas, proteínas, azúcares y ácidos, así como por la cantidad de agua presente (Fennema, 2000).

Además, la muestra proviene de harina en la cual sus propiedades fisicoquímicas asociadas con funcionalidad (distribución del tamaño de partícula, pH, capacidad de absorción de agua y reología de la masa rehidratada) tienen que ser optimizadas para obtener un producto de calidad (Bello et. al., 2003) y esto cambia el comportamiento de las moléculas de almidón.

### 3.6.3 En tortilla evaluando efecto de ciclos de temperatura

Los resultados de la determinación en tortilla sometida a ciclos de congelación/descongelación se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Contenido de fibra dietética total (FDT) por el método AOAC 985.29 a diferentes grados de retrogradación promovida por ciclos de congelación/descongelación en tortilla de maíz blanco nixtamalizado.

Muestra/Condición		g FDT/ 100 g muestra base seca
Tortilla	0 días/0 ciclos*	8.11 ± 0.304 <sup>a</sup>
	7 días/8 ciclos*	9.02 ± 0.753 <sup>b</sup>
	15 días/18 ciclos*	8.81 ± 0.752 <sup>b</sup>

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

\* Muestra homogeneizada por *molienda húmeda*.

<sup>a-b</sup>Letras iguales no hay diferencia significativa con  $\alpha=0.05$ .

Entre los valores de contenido de fibra en tortilla, existe diferencia significativa con la determinación a los 0 ciclos, donde se obtiene un menor contenido de fibra.

En la retrogradación de la tortilla el cambio evaluado por los resultados cualitativos, es similar para los ciclos 8 y 18, en los que se tiene mayor contenido de amilosa en la fracción soluble (con base en los espectros de absorción). La diferencia de proporción amilosa/amilopectina para tiempo 0 y 6 ciclos se observa en la figura 18 (no se determinó el espectro a los 8 ciclos, pero los anexos 6 y 7 muestran los de las determinaciones previa y posterior a ese punto e indican la misma tendencia), la comparación de espectros entre 0 y 18 ciclos se hizo en la figura 19. Por lo tanto, cualitativamente, por la composición de las fracciones soluble y retrogradada las diferencias están entre 0 y 8 ciclos y 0 y 18 ciclos. Se puede decir que a partir del ciclo 8 se tiene el máximo grado de retrogradación pues ya no hay cambio significativo entre 8 y 18 ciclos.

Cuantitativamente, el desplazamiento de los picos de máxima absorción provoca que se sobreestime el contenido de almidón (cuando se acerca a 600 nm) o se subestime (cuando tiende a 550 nm).

Para la tortilla, al predominar en la fracción insoluble la amilopectina, los efectos de complejación pueden ser intramoleculares, asociaciones entre las ramificaciones exteriores, o intermoleculares, agregación de polímeros (Gray y Bemiller, 2003).

## Conclusiones

- ◆ Se estableció el protocolo en un sistema ideal para la cuantificación de almidón por solubilización diferencial con las siguientes condiciones de variables en la determinación:
  - Solvente (KOH 0.2 M para almidón soluble y 2.0 M para almidón total).
  - Tiempo de solubilización (20 min)
  - Efecto de KCl en la cuantificación del complejo almidón-yodo (disminuye la respuesta con el incremento de la concentración de KCl).
  - Longitud de onda de absorbancia del complejo almidón-yodo (600 nm).
  - Concentración inicial de las soluciones (1% de almidón)
- ◆ Al implementar el protocolo en un sistema alimentario (masa y tortilla de maíz nixtamalizado), presentó complicaciones, posiblemente por interferencia de los otros componentes como lípidos.
- ◆ No se encontró una relación directa entre el almidón cuantificado, en masa y tortilla, por solubilización diferencial y su retrogradación inducida por ciclos de congelación/descongelación; sin embargo, los espectros de absorción muestran cambios en la presencia de amilosa/amilopectina de las fracciones (soluble y retrogradada), que permitieron la selección de los diferentes grados de retrogradación.
- ◆ En la tortilla, el contenido de fibra aumenta significativamente después de 8 ciclos de congelación/descongelación sin modificarse a los 18 ciclos. En contraste, en la masa, no existe diferencia significativa en el contenido de fibra medida en los primeros ciclos de congelación/descongelación (0 y 8) y disminuye en la última determinación (14 ciclos).
- ◆ El proceso de cocción (de masa a tortilla) mostró un aumento significativo en el contenido de fibra (método AOAC 985.49).
- ◆ La relación entre la retrogradación del almidón y el contenido de fibra dietética es compleja, depende de las condiciones de formación de almidón resistente inherentes a la muestra (como procesamiento) y la composición química.

## Bibliografía

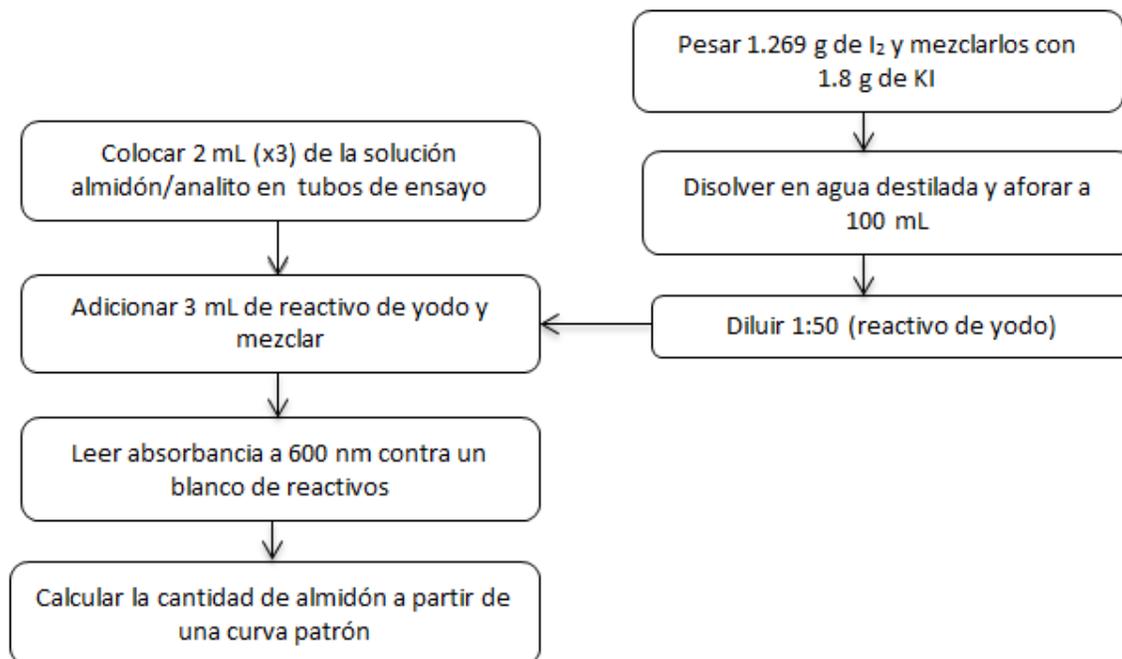
1. Anchondo, L., 1998. Estudio sobre la retrogradación del almidón de tortilla de maíz mediante calorimetría diferencial de barrido, México: UNAM. Tesis para obtener el grado de química de alimentos.
2. AOAC, 1997. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16a edición, volumen II, Virginia: AOAC.
3. AOAC, 2003. Resistant Starch in Starch and Plant Materials. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17a edición, sección 45.4.15, método 2002.02. Gaithersburg: AOAC.
4. Aristizábal, J., Sánchez, T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, Boletín de servicios agrícolas de la FAO, Italia.
5. Asp, N-G., (1987). Dietary fibre-Definition, chemistry and analytical determination. *Molecular Aspects of Medicine*, 9, pp. 17-29.
6. Baks, T., Ngene, I., J.G. van Soest, J., Janssen, A., Boom, R. (2007). Comparison of methods to determine the degree of gelatinization for both high and low starch concentrations. *Carbohydrate Polymers*, 67, pp. 481-490.
7. Bayram, M. (2006). Determination of the cooking degree for bulgur production using amylose/iodine, centre cutting and light scattering methods. *Food control*, 17, pp. 331-335.
8. Bello, L., Osorio, P., Agama, E., Solorza, J., Toro, J., Paredes, O. (2003). Chemical and physicochemical properties of dried wet masa and dry masa flour, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, pp. 408-412.
9. Bourges, H. (2001). Orientación Alimentaria: Glosario de términos. *Cuadernos de nutrición*, 24 (1), pp. 13, 21, 33.
10. Codex Alimentarius. 2008. Guidelines for the use of nutrition claims: Draft table of conditions for nutrient contents (Part B containing provisions on dietary fibre). [En línea].  
Disponibile en:  
[ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCNFSDU/ccnfsdu30/nf30\\_03e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCNFSDU/ccnfsdu30/nf30_03e.pdf) [Último acceso el 26 de octubre de 2013]
11. Escalona, S., 2009. *Contenido de Fibra Dietética Total y Almidón Resistente en tres cereales de alto consumo en México [Arroz (O. sativa), Trigo (T. aestivum) y Avena (A. sativa)]*, México: UNAM. Tesis para obtener el grado de química de alimentos.
12. Fennema, O. 2000. Carbohidratos. En: J. BeMiller y R. Whustler eds. *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, pp: 228-245, 262-264.
13. Fitzgerald, M., Bergman C., et. al. (2009). Addressing the Dilemmas of Measuring Amylose in Rice. *Cereal Chemistry*, 86(5), pp.492-498.

14. Gaytán, M., Figueroa, J., Vázquez, P., Morales, E., Martínez, H., Reyes, M. (2012). Caracterización fisicoquímica, funcional y química de harinas nixtamalizadas de maíz obtenidas por calentamiento óhmico y proceso tradicional, *CyTA-Journal of Food*, 10 (3), pp. 182-195.
15. Gray, J. y Bemiller, J., (2003). Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp. 1-21.
16. Guraya, H. y Toledo, R. (1993), Determining gelatinized starch in a dry starchy product. *Journal of Food Science*, 58 (4), pp. 888-890.
17. Hollmann, J., Themeier, H., Neese, U., Lindhauer, M. (2013). Dietary fibre fractions in cereal foods measured by a new integrated AOAC method. *Food Chemistry*, 140 (3), pp 586-589.
18. Iturbe, F.A., Sandoval B.J., 2013. *Análisis de alimentos. Fundamentos y técnicas*. México: UNAM.
19. Kim, S., Biswas, A., Singh, M., Peterson, S., Liu, Sean. (2012). Thermal dissolution of maize starches in aqueous medium. *Journal of Cereal Science*, 56, pp. 720-725.
20. Mahmood, T., Turner, M., Stoddard, F. (2007). Comparison of methods for colorimetric amylose determination in cereal grains. *Starch/Stärke*, 59, pp. 357-365.
21. McCleary, B., (2003). Dietary fibre analysis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, pp. 3-9.
22. McCleary, B. (2011). The evolution of Dietary Fiber Definitions and methods and the Role of AACC Internacional, *Cereal Foods*, 56 (3), pp. 103.
23. McCleary, B. Rossiter, P. (2004). Measurement of Novel Dietary Fibers. *Journal of AOAC International*, 87 (3), pp. 707-717.
24. McCleary, B., De Vries, J., Rader, J., Cohen, G., Prosky, *et. al.* (2011). Collaborative Study Report: Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber (Codex Definition) by an Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography. *Cereal Foods World*, 56 (6), pp. 238-247.
25. McGrance, S. Cornell, H., Melbourne R. (1998). A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch/Stärke*, 50 (4), pp. 158-163.
26. Morrison, W., Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches, *Journal of Cereal Science*, 1, pp. 9-20.
27. Nava, A., 2008. *Cuantificación de Fibra Dietética Total y Almidón Resistente en tres leguminosas en estado fresco y seco, crudas y cocidas*, México: UNAM. Tesis para obtener el grado de química de alimentos.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.

29. Núñez, L., 2009. Importancia del Almidón (aspectos fisicoquímicos, usos y aplicaciones), México: UNAM. Trabajo monográfico de actualización para obtener el grado de química de alimentos.
30. Padilla, E., 2009. *Cuantificación de fibra dietética total y almidón resistente en cinco tubérculos en forma cruda y cocida*, México: UNAM. Tesis para obtención del grado de química de alimentos.
31. Pak, N., 1997. *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Análisis de fibra dietética*. [En línea]. Disponible en:  
<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S18.htm> [Último acceso el 20 de mayo de 2013].
32. Paredes, O., Guevara, F., Bello, L. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92-93, pp. 60-70.
33. Perera, A., Meda, V., Tyler, R.T., (2010). A review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*, 43, pp. 1959-1974.
34. Ramos, M., 2008. *Contenido de fibra dietética total y almidón resistente en diferentes variedades de maíz crudos y cocidos*, México: UNAM. Tesis para obtener el grado de química de alimentos.
35. Shi, M., Chen, Y., Yu, S., Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase, *Food Hydrocolloids*, 33, pp. 19-25.
36. Vilaplana, F., Hasjim, J., Gilbert, R. (2012). Amylose content in starches: Toward optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydrate Polymers*, 88, pp. 103-111.
37. 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, pp. 113-117.

## Apéndice

**Anexo 1.** Método para determinar almidón por complejos de inclusión con yodo.

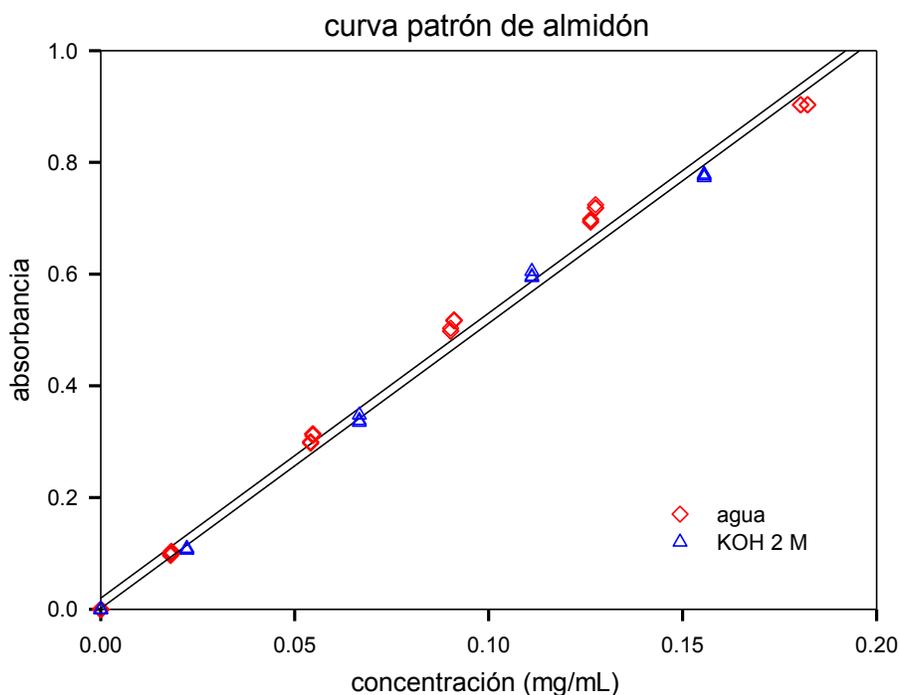


**Anexo 2.** Contenido de humedad en los almidones empleados.

Muestra	% Humedad
Almidón estándar de papa (marca Alyt)	12.39 ± 0.04
Fécula de maíz (marca Maizena)	9.65 ± 0.07
Fécula de maíz alta en amilosa (marca Arancia)	10.74 ± 0.12

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se reporta promedio ± desviación estándar.

**Anexo 3.** Gráfica de obtención de curva patrón: concentración de almidón estándar de papa disuelto en agua (calentando en autoclave para gelatinizar) y disuelto en KOH 2 M:

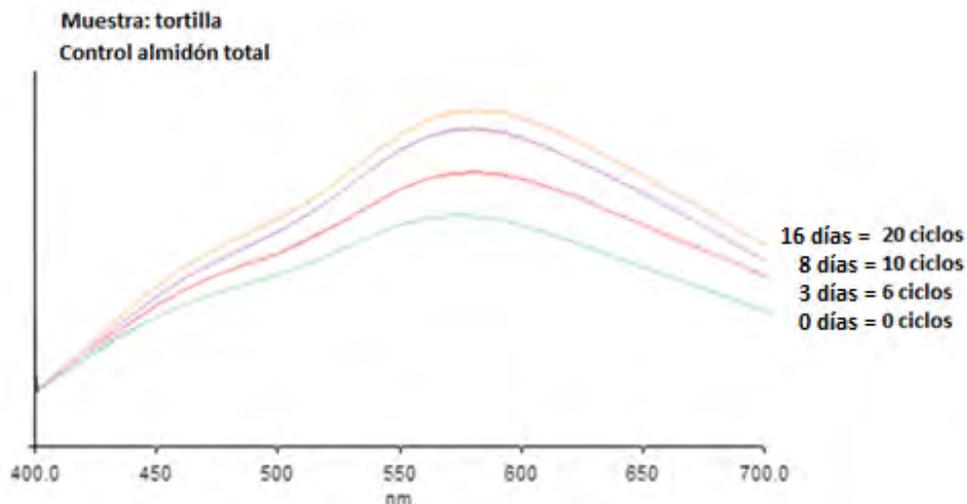


**Anexo 4.** Análisis proximal para masa y tortillas de maíz blanco nixtamalizado.

	<b>Masa de maíz blanco nixtamalizado</b>		<b>Tortilla de maíz blanco nixtamalizado</b>	
	g/100 g muestra	g/100 g muestra seca	g/100 g muestra	g/100 g muestra seca
<b>Humedad</b>	58.84 ± 0.218	-	43.96 ± 0.420	-
<b>Cenizas</b>	0.54 ± 0.019	1.32 ± 0.047	1.06 ± 0.012	2.04 ± 0.023
<b>Grasa</b>	0.58 ± 0.005	1.40 ± 0.013	1.50 ± 0.231	2.89 ± 0.445
<b>Proteína</b>	2.76 ± 0.116	6.71 ± 0.283	3.50 ± 0.299	6.74 ± 0.575
<b>Fibra dietética total</b>	2.62 ± 0.083	6.36 ± 0.202	4.68 ± 0.032	9.02 ± 0.061
<b>Carbohidratos (hidratos de carbono)</b>	34.00	82.60	45.30	79.31

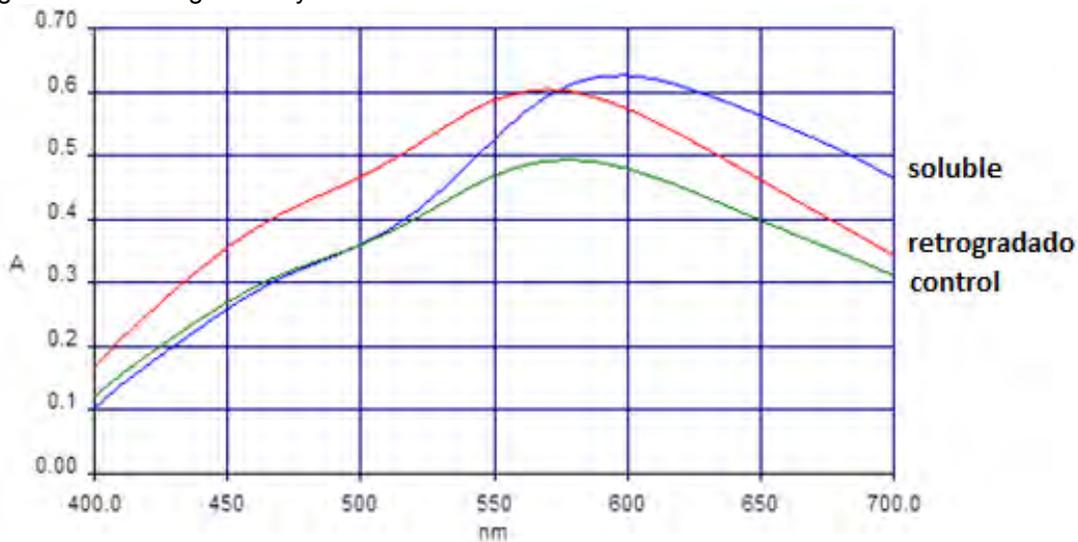
Las determinaciones se realizaron por triplicado, de acuerdo a los métodos oficiales (AOAC), se reporta promedio ± desviación estándar. Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

**Anexo 5.** Espectros de absorción: determinación *control de almidón* en tortilla almacenada en papel y sometida a ciclos de congelación/descongelación.



La figura se interpreta cualitativamente, es un gráfico para representar los picos de máxima absorción y en general la forma del espectro de las especies que se complejan con yodo, se puede ver que a diferentes ciclos se sigue solubilizando la misma composición de almidón (amilosa/amilopectina).

**Anexo 6.** Espectros de absorción de la fracciones soluble (KOH 0.2 M) e insoluble (solubilizada con KOH 2.0 M) de tortilla (almacenada en papel) a los 6 ciclos (3 días), sometida a ciclos de congelación/descongelación y determinación *control de almidón*.



**Anexo 7.** Espectros de absorción de la fracciones soluble (KOH 0.2 M) e insoluble (solubilizada con KOH 2.0 M) de tortilla (almacenada en papel) a los 10 ciclos (8 días), sometida a ciclos de congelación/descongelación y determinación *control de almidón*.

