

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

## **DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral:

## PANIFICADOS CON ALMIDÓN RESISTENTE APTOS PARA REGÍMENES ESPECIALES: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, SENSORIAL Y NUTRICIONAL

<u>Tesista</u>: Lic. Carlos Gabriel Arp

Directora: Dra. Cristina Ferrero

Codirectora: Dra. María Jimena Correa

<u>Año</u>: 2019



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS** 

## Trabajo de Tesis Doctoral:

PANIFICADOS CON ALMIDÓN RESISTENTE APTOS PARA REGÍMENES ESPECIALES: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, SENSORIAL Y NUTRICIONAL

Tesista: Lic. Carlos Gabriel Arp

Directora: Dra. Cristina Ferrero

Codirectora: Dra. María Jimena Correa

<u>Año</u>: 2019

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CIC-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Cristina Ferrero y la codirección de la Dra. María Jimena Correa. El mismo se desarrolló con fondos otorgados por la UNLP, la ANPCyT y el CONICET.

# A partir de los resultados obtenidos de este trabajo de tesis doctoral se publicaron los siguientes artículos en:

#### Actas de congresos:

Arp CG, Correa MJ, Ferrero C. (2016). "Análisis térmico de almidones retrogradados pensados para formulaciones de panificados funcionales". *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016: libro de actas, resúmenes.* Eds. León AE, Rosati V, Robledo CW. 1ª Ed. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba. Córdoba, Argentina. pp. 78. ISBN: 978-987-45380-0-0.

Arp CG, Correa MJ, Ferrero C. (2016). "Análisis reológico de masas panarias elaboradas con almidón resistente". *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016: libro de actas, resúmenes.* Eds. León AE, Rosati V, Robledo CW. 1ª Ed. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba. Córdoba, Argentina. pp. 308. ISBN: 978-987-45380-0-0.

Arp CG, Correa MJ, Ferrero C. (2018). "Calidad tecnológica de panificados elaborados con niveles elevados de almidón resistente". *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2018: Memorias.* Eds. Ordoñez AL, Barrera MB, Flores CA. 1ª Ed. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, Mendoza, Argentina. pp. 85. ISBN: 978-987-46333-1-6.

#### Revistas científicas internacionales:

Arp CG, Correa MJ, Ferrero C. (2018). "Rheological and microstructural characterization of wheat dough formulated with high levels of resistant starch". *Food and Bioprocess Technology*, 11 (6), 1149-63. DOI: 10.1007/s11947-018-2083-8.

Arp CG, Correa MJ, Ferrero C. (2018). "High-amylose resistant starch as a functional ingredient in breads: a technological and microstructural approach". *Food and Bioprocess Technology*, 11 (12), 2182-93. DOI: 10.1007/s11947-018-2168-4.

Dedico esta tesis a mis padres, por su amor y apoyo incondicionales; y a Francisco, por su cariño, contención y compañía antes y durante la elaboración de este trabajo

## Agradecimientos:

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas e instituciones que, de una forma u otra, contribuyeron a transitar esta etapa de la mejor manera posible:

A mi directora, Cristina Ferrero, por su calidez, comprensión y sensibilidad en todas las etapas de este proyecto, y por haber fomentado siempre mi vocación científica con sus conocimientos y experiencia, brindándome libertad, apoyo y confianza.

A mi codirectora, María Jimena Correa, por su guía y sostén en las distintas tareas que me han llevado a finalizar este trabajo, y por sus perspicaces contribuciones para la ejecución de los ensayos y la interpretación de los datos.

A quienes componen el Laboratorio de Investigación de Alimentos Farináceos Saludables (LIAFaS), Cecilia Puppo, Cecilia Lupano, y en particular a quienes compartieron conmigo la mayor parte del tiempo durante los trabajos experimentales: Marie, Facu, Feli, Lucho, Juan, Nati, Pau, Vicky, Leo y Angie.

A Ingredion (Baradero) y, particularmente a Claudio Segato, por su generosa donación del almidón resistente que facilitó el comienzo de este trabajo y permitió realizar la mayoría de los ensayos experimentales.

A Darío Cabezas, por sus contribuciones en la interpretación de las distribuciones de tamaño de partícula, y por su ayuda y consideración en distintos aspectos a lo largo de este trayecto.

A Molinos Río de La Plata S.A., y particularmente a Fernando Roudil, Sofía Santarcieri y Luciano López Jáuregui, por permitirme realizar los ensayos farinográficos y viscoamilográficos, por su atención y amabilidad.

A mis colegas de oficina en la mayor parte de este trayecto: Martín, Luciana, Silvana, Micaela y Vanesa, por los buenos momentos, los mates compartidos, el grandioso ambiente de trabajo, las risas y las incontables ayudas recibidas.

A mis colegas de oficina en esta última etapa: Claudia, Karen, Estefanía, Belén, Natalia, Juliana, Andrea, Luciano, Victoria y Natalia, por el ambiente sereno y agradable, y por su compañía y ayuda durante la escritura de este trabajo.

Javier Lecot y Daniel Russo, por sus consejos y su paciencia durante los ensayos de DSC.

A Verónica Ferraresi, por su asesoramiento y disposición para la realización de los ensayos de difractometría de rayos-X.

A Enrique Portiansky, por compartir sus conocimientos sobre análisis de imagen y, particularmente, por sus servicios para la obtención de micrografías en el CSLM del LAI-FCV.

A Kyung Won Kang, por su valiosa contribución en la obtención de imágenes en el ESEM del LIMF-FI, y a Patricia Sarmiento, por sus servicios en el SEM de la FCNyM.

A la Universidad Nacional de La Plata, la Facultad de Ciencias Exactas y el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por haber posibilitado mi formación doctoral.

Al CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral que habilitó la realización de esta tesis, por los fondos que permitieron el desarrollo de la misma, y por el otorgamiento de la beca posdoctoral para continuar con mis investigaciones.

A la ANPCyT, por los subsidios que permitieron la realización de proyectos de investigación vinculados a esta tesis.

A todo el personal del CIDCA, por su colaboración con los ensayos sensoriales, y por el ambiente de trabajo ameno y cálido que sostienen.

A JCP-La Plata y ATE-CONICET, por su compromiso en la lucha por el reconocimiento de los derechos laborales de quienes realizamos la labor científica a través de becas.

A Alexandra Elbakyan, por permitirme el acceso al conocimiento científico sin fronteras.

A mis amigos y amigas, por la compañía, la complicidad y el apoyo que siempre me brindaron.

A mi familia, por el amor que me brindan, y por su presencia constante a pesar de la distancia.

A Francisco, por el cariño, la paciencia y la compañía que me ofrece cada día, por la ayuda brindada en múltiples formas y, sobre todo, por su amor.

#### Resumen:

El almidón resistente tipo II es un polisacárido resistente a la digestión enzimática que provee la mitad de las calorías que un almidón convencional, y hasta un 60% de fibra dietaria total. En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la incorporación de almidón resistente tipo II de maíz (HM) sobre las características de la masa panaria, la calidad del pan fresco y el proceso de envejecimiento del pan, con el objetivo de obtener productos de menor índice glucémico (*IG*) y elevado contenido de fibra.

La incorporación de HM se realizó mediante reemplazos de harina de trigo por HM en niveles del 10, 20 y 30%. La incorporación de cantidades crecientes de HM en la formulación aumentó progresivamente la absorción farinográfica y la capacidad de retención de agua, y disminuyó el contenido de gluten, la capacidad de retención de ácido láctico, el tiempo de desarrollo y la estabilidad farinográficas. Las premezclas presentaron una distribución de tamaño de partícula desplazada a tamaños menores y propiedades de empaste disminuidas. Las masas elaboradas a partir de las premezclas con 2% de NaCl vieron incrementado su comportamiento elástico, especialmente al mayor nivel de reemplazo. Esto se reflejó en los ensayos reológicos de pequeña (reometría oscilatoria) y gran deformación (relajación y TPA). La presencia de HM produjo cambios en las poblaciones de los protones en la masa, determinada por RMN-<sup>1</sup>H, asociados a una redistribución de agua en la matriz. El análisis microestructural por SEM, ESEM y CSLM reveló un aumento de la cantidad de gránulos de almidón de menor tamaño a concentraciones de HM crecientes, y una red de gluten pobremente formada en la formulación con mayor nivel de reemplazo. El HM no presentó transiciones térmicas en el rango de temperatura de cocción de la masa. Su incorporación redujo la entalpía de gelatinización de la masa por efecto de dilución del almidón gelatinizable (de la harina de trigo), sin afectar la capacidad de gelatinización de este último.

El HM disminuyó la capacidad de expansión de la masa con 3% de levadura durante la fermentación y produjo un descenso en la velocidad de aumento de volumen, extendiendo los tiempos de leudado. La humedad de la miga aumentó progresivamente con el nivel de reemplazo, mientras que el color de la corteza se tornó menos pardo. El volumen específico de pan y los parámetros texturales y alveolares de la miga no se vieron afectados en forma considerable por la incorporación de HM a niveles del 10 y 20%, mientras que reemplazos del 30% afectaron negativamente estos parámetros. La microestructura de la miga, observada por ESEM, reveló la presencia de numerosos gránulos de almidón pequeños protruyendo de la matriz a medida que se incrementó el contenido de HM. La composición nutricional mostró un descenso progresivo en el contenido proteico, acompañado de un importante incremento en la cantidad de fibra y una disminución marcada de los carbohidratos digeribles. La digestibilidad in-vitro con  $\alpha$ -amilasa indicó una disminución en la velocidad de hidrólisis del almidón en presencia de HM, y una disminución progresiva del *IG* estimado desde 100% (control) hasta 66,5% (formulación con 30% de reemplazo). La comparación sensorial indicó que los consumidores son capaces de percibir diferencias entre los panificados con HM y el control, aunque esto no afectó la aceptabilidad del pan con 20% de reemplazo

La presencia de HM afectó la pérdida de agua de la miga durante el almacenamiento (11 días), disminuyendo su velocidad particularmente durante los primeros días. La amilopectina gelatinizada tuvo mayor capacidad de retrogradación en los panes con HM, aunque esta progresó más lentamente. Al final del almacenamiento, todas las formulaciones presentaron patrones de difracción de rayos-X con picos más intensos respecto a los correspondientes panes frescos. La dureza de la miga de panes con 10 y 20% de reemplazo progreso de forma similar al control. El aumento de la dureza del pan con 30% de reemplazo procedió más lentamente, pero alcanzó valores mucho más pronunciados.

El perfil nutricional de la muestra con 30% de reemplazo, relacionado a su alto contenido de fibra y baja disponibilidad de carbohidratos motivó la realización de ensayos para mejorar las características de calidad del pan. Se incorporaron hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y carboximetilcelulosa (CMC) a esta formulación en niveles de 1 y 1,5%, como aditivos. Su empleo aumentó la absorción de agua de las premezclas, extendió sus tiempos de desarrollo y mejoró ligeramente su estabilidad. En general, no se observaron cambios en el perfil viscoamilográfico con el empleo de las

celulosas modificadas. La reología de las masas obtenidas reveló una disminución importante en la componente elástica de la masa, obteniéndose un perfil viscoelástico más balanceado. En general, el efecto de las celulosas modificadas fue más marcado a mayor nivel de adición. La presencia de las celulosas mejoró el desarrollo de la red de gluten, la cual se observó bien distribuida y entrecruzada en todos los casos a través de CSLM. La expansión de la masa durante el leudado fue mayor con la incorporación de 1,5% de celulosas modificadas, siendo la velocidad de expansión más rápida en todos los casos. Los panificados mostraron una mejora notable en su volumen específico, y en sus características texturales (menor firmeza) y alveolares (distribución de tamaño de poros desplazada hacia valores de área mayores). Los efectos positivos fueron mayores al utilizarse las celulosas al 1,5%. En general, el tipo de celulosa utilizada no tuvo influencia en los parámetros analizados. La incorporación de las celulosas al 1% tendió a producir una mayor pérdida de agua durante el almacenamiento (4 días), siendo esta más lenta. El efecto contrario se observó con la incorporación a un nivel de 1,5%. El empleo de las celulosas disminuyó marcadamente el aumento de la dureza durante el envejecimiento respecto a la formulación sin aditivos en todos los casos.

Con el objetivo de producir almidón resistente en el laboratorio, se elaboraron distintos protocolos para obtener almidón retrogradado mediante modificaciones térmicas y/o térmico-enzimáticas. El tratamiento térmico consistió en someter a una suspensión de concentración 10 o 20% p/p de almidón de trigo en agua destilada a un calentamiento a 80 – 85 °C durante 30 min con agitación interna para formar una pasta gelatinizada, y posteriormente aplicar calentamiento (121 °C – 30 min) y refrigeración (0 o 4 °C – 24 hs) en forma cíclica (4 ciclos). Este tratamiento fue realizado solo, o en combinación con un tratamiento enzimático desramificante. Este consistió en incubar la pasta gelatinizada con pululanasa (40 o 20 ASPU/g de almidón) durante 8 o 6 hs con agitación orbital a 50 o 59 °C, respectivamente, con o sin un período de reposo a 4 °C durante 16 hs previo a la aplicación de los 4 ciclos de calentamiento y refrigeración.

Los resultados indicaron que las condiciones más eficaces para la obtención de almidón retrogradado resistente a la digestión enzimática con  $\alpha$ -amilasa fueron la gelatinización de una suspensión 10% p/p a 85 °C por 30 min, seguido de una

incubación con pululanasa con una concentración de 20 ASPU/g de almidón durante 6 hs a 59 °C y un posterior tratamiento térmico de 4 ciclos de calentamiento a 121 °C y refrigeración a 0 o 4 °C. Los almidones retrogradados obtenidos con este proceso presentaron entalpías de retrogradación más elevadas en ensayos de DSC, una microestructura compacta observada por ESEM, patrones de difracción de rayos-X con picos intensos, ausencia de efecto espesante en ensayos de RVA y digestibilidades invitro con  $\alpha$ -amilasa lentas y de baja extensión, dando lugar a *IG* estimados de 34% respecto al almidón de trigo sin modificaciones.

# Índice general

Índice general	XIII
Índice de figuras	XXI
Índice de tablas	XXVII
Índice de ecuaciones	XXXI
Capítulo 1:Introducción	1
1.1. Panificados	1
1.1.1. Harina de trigo	1
1.1.1.1. Composición de la harina de trigo	3
1.1.1.1.1. Características de las proteínas de la harina de trigo	3
1.1.1.1.2. Características del almidón de trigo	9
1.1.1.1.2.1. Estructura del gránulo de almidón	9
1.1.1.1.2.2. Transiciones térmicas del almidón	13
1.1.2. Panificación	15
1.1.2.1. Fenómenos asociados a las distintas etapas del proceso de panificación	16
1.1.2.1.1. Amasado	16
1.1.2.1.2. Fermentación	
1.1.2.1.3. Cocción	18
1.2. Nutrición y panificados	
1.2.1. Rol de los panificados en la nutrición humana	19
1.2.2. Índice glucémico y carga glucémica	22
1.3. Alimentos funcionales y salud	
1.3.1. Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)	24
1.3.2. Alimentos funcionales	25
1.3.3. Ingredientes funcionales	27
1.3.4. Almidón resistente	
1.3.4.1. Almidón resistente tipo II	
1.3.4.2. Almidón resistente tipo III	
1.4. Panificados saludables	
1.4.1. Panificados con ingredientes funcionales	
1.4.2. Almidón resistente como ingrediente funcional en panificados	
1.4.2.1. Consecuencias tecnológicas de la incorporación de ingredientes funcionales	34

1.4.2.2. Hidrocoloides	36
1.4.2.2.1. Celulosas modificadas	37
Objetivos:	41
Objetivo general:	
Objetivos específicos:	
Capítulo 2:Materiales y métodos	45
2.1. Materiales	45
2.1.1. Materias primas	45
2.1.2. Formulación de las premezclas	46
2.1.3. Caracterización de materiales y premezclas	46
2.1.3.1. Ensayos farinográficos	46
2.1.3.2. Capacidad de retención de solventes (SRC)	
2.1.3.3. Determinación del contenido de gluten de la harina de trigo	
2.1.3.4. Medida del tamaño de los gránulos de almidón por difracción láser	50
2.1.3.5. Ensayos con viscoamilógrafo rápido (RVA)	52
2.1.3.6. Transiciones térmicas de las materias primas	54
2.1.3.7. Composición proximal	56
2.1.3.7.1. Contenido de proteínas	56
2.1.3.7.2. Contenido de lípidos	57
2.1.3.7.3. Humedad	58
2.1.3.7.4. Cenizas	59
2.1.3.7.5. Contenido de fibra dietaria total	59
2.1.3.7.6. Contenido de carbohidratos	60
2.2. Formulación y estudio de las masas panarias	61
2.2.1. Preparación de las muestras de masa	61
2.2.2. Determinación del contenido de gluten de las premezclas	61
2.2.3. Contenido de humedad	62
2.2.4. Medidas de actividad acuosa (a <sub>w</sub> )	62
2.2.5. Determinación del pH de las masas	62
2.2.6. Ensayos de reología fundamental	62
2.2.6.1. Ensayos oscilatorios de pequeña amplitud	63
2.2.7. Ensayos de reología empírica	68
2.2.7.1. Ensayos de relajación	68
2.2.7.2. Análisis del perfil de textura (TPA)	71

2.2.8.	Medidas de tiempo de relajación por resonancia magnética nuclear de protones	; (RMN-1H)
		73
2.2.9.	Transiciones térmicas de la masa por DSC	76
2.2.10.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	76
2.2.10	0.1. Preparación de la muestra	76
2.2.10	0.2. Observación microscópica	77
2.2.11.	Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)	77
2.2.12.	Microscopía confocal láser de barrido (CSLM)	77
2.2.12	2.1. Preparación de la muestra	79
2.2.12	2.2. Observación de la muestra	79
2.3. Ca	alidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón resis	tente 80
2.3.1.	Ensayos de fermentación	80
2.3.2.	Proceso de panificación	81
2.3.3.	Calidad del pan fresco	
2.3.3.	1. Volumen específico de pan	
2.3.3.	2. Análisis del perfil de textura (TPA) de la miga	
2.3.3.	3. Porosidad de la miga	
2.3.3.	4. Humedad de la miga	
2.3.3.	5. Actividad acuosa (a <sub>w</sub> ) de la miga	
2.3.3.	6. Color de la corteza y de la miga	
2.3.4.	Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de los productos frescos .	
2.3.5.	Valor nutricional y digestibilidad in-vitro del almidón	
2.3.5.	1. Composición proximal	
2.3.5.	2. Digestibilidad in-vitro de almidón e índice glicémico estimado	
2.3.6.	Análisis sensorial y percepción nutricional de los productos	90
2.3.6.	1. Preparación de las muestras	90
2.3.6.	2. Prueba de diferencia con un control	91
2.3.6.	3. Análisis de aceptabilidad por escalas hedónicas	92
2.4. Es	studio del proceso de envejecimiento en panificados elaborados con	almidón
resistente		
2.4.1.	Almacenamiento del pan	92
2.4.2.	Cuantificación de la retrogradación de la amilopectina por DSC	93
2.4.3.	Cristalinidad de la miga panaria por difractometría de rayos-X	93
2.4.4.	Cinética de envejecimiento mediante modelado de Avrami	96

2.5. Uso de hidrocoloides como mejoradores en la panificación de p	roductos con
alto contenido de almidón resistente	
2.5.1. Formulaciones	
2.5.2. Ensayos sobre las premezclas	
2.5.3. Ensayos sobre las masas panarias	
2.5.4. Ensayos sobre los panificados con hidrocoloides	
2.5.4.1. Evaluación de los panificados frescos	
2.5.4.2. Almacenamiento	
2.6. Obtención y caracterización de almidón resistente tipo 3 por re	trogradación
de almidón de trigo	
2.6.1. Materiales	
2.6.2. Puesta a punto y preparación	
2.6.3. Caracterización fisicoquímica	
2.6.3.1. Transiciones térmicas	
2.6.3.1.1. Seguimiento del proceso de obtención	
2.6.3.1.2. Caracterización térmica	
2.6.3.2. Ensayos con viscoamilógrafo rápido (RVA)	
2.6.3.3. Cristalinidad por difractometría de rayos-X	
2.6.4. Caracterización microscópica por SEM de bajo vacío	
2.6.5. Caracterización nutricional	
2.6.5.1. Determinación de fibra dietaria	
2.6.5.2. Digestibilidad in-vitro de almidón	
2.7. Análisis estadístico	
Capítulo 3:Formulación y estudio de las masas panarias	107
3.1. Caracterización de las materias primas	
3.1.1. Composición de la harina y el almidón resistente	
3.1.2. Contenido de gluten de la harina	
3.1.3. Perfil del tamaño de partículas	
3.1.4. Capacidad de retención de solventes (SRC) de la harina	
3.1.5. Propiedades farinográficas de la harina	
3.1.6. Perfil viscoamilográfico de las materias primas	
3.1.7. Caracterización térmica de las materias primas	
3.2. Caracterización de las premezclas	
3.2.1. Contenido de gluten de las premezclas	

3.2.2.	Distribución de tamaños de partícula de las premezclas	
3.2.3.	Capacidad de retención de solventes de las premezclas	
3.2.4.	Ensayos farinográficos sobre las premezclas	
3.2.5.	Perfil viscoamilográfico de las premezclas	124
3.3. R	eología de masas panarias	
3.3.1.	Reometría oscilatoria de pequeña amplitud	
3.3.2.	Relajación de la masa	
3.3.3.	Análisis del perfil de textura	
3.4. P	ropiedades fisicoquímicas de las masas	
3.4.1.	Humedad	
3.4.2.	Actividad acuosa	
3.4.3.	pH de las masas	
3.4.4.	Movilidad molecular por RMN- <sup>1</sup> H	
3.5. T	ransiciones térmicas de la masa	
3.6. A	nálisis microestructural	
3.6.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	
3.6.2.	Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)	
3.6.3.	Microscopía confocal láser de barrido (CSLM)	155
3.7. C	onclusiones parciales	159
Capítulo	4:Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de	almidón
resistent	e	163
4.1. E	nsayos de fermentación	
4.2. C	alidad de panes frescos	
4.2.1.	Volumen específico de pan	
4.2.2.	Textura de la miga	
4.2.3.	Porosidad de la miga	
4.2.4.	Humedad y actividad acuosa de la miga de pan	
4.2.5.	Color de la corteza y la miga	
4.3. A	nálisis microestructural por ESEM	
4.4. A	nálisis nutricional y digestibilidad de almidón	
4.4.1.	Composición nutricional	
4.4.2.	Digestibilidad in-vitro del almidón e índice glucémico estimado	

4.5. Evaluación sensorial y percepción nutricional	183
4.5.1. Ensayo de discriminación: prueba de diferencias con un testigo	
4.5.2. Ensayo de aceptabilidad y percepción nutricional: prueba con escalas hedónio	cas 185
4.6. Conclusiones parciales	
Capítulo 5:Estudio del proceso de envejecimiento en panificados elabo	orados con
almidón resistente	193
5.1. Humedad y $a_w$ de la miga	193
5.1.1. Análisis cinético de la pérdida de humedad de la miga	
5.2. Retrogradación de amilopectina	198
5.2.1. Patrones de difracción de rayos-X y cristalinidad de la miga	
5.2.2. Análisis cinético de la retrogradación de la amilopectina	
5.3. Textura de la miga en el envejecimiento del pan	207
5.4. Conclusiones parciales	214
Canítulo 6:Uso de hidrocoloides como meioradores de nanificación en	
productos con alto contenido de almidón resistente	
6.1. Formulación y constantación de los momorelos	210
6.1. Formulación y caracterización de las premezcias	
6.1.1. Formulaciones	
6.1.2. Ensayos farinograficos	
6.1.3. Ensayos viscoamilográficos	
6.2. Análisis de las masas panarias elaboradas con hidrocoloides	225
6.2.1. Ensayos reológicos	
6.2.1.1. Reología oscilatoria de pequeña deformación	225
6.2.1.2. Ensayo de relajación	231
	222
6.2.1.3. TPA	
<ul><li>6.2.1.3. TPA</li><li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li></ul>	
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> </ul>	232 
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> <li>6.2.3.1. CSLM</li> </ul>	232 
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> <li>6.2.3.1. CSLM</li> <li>6.3. Ensayos sobre los productos panificados</li> </ul>	232 
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> <li>6.2.3.1. CSLM</li> <li>6.3.1. Ensayos sobre los productos panificados</li> <li>6.3.1. Ensayos de fermentación</li> </ul>	232 233 234 234 237 237
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> <li>6.2.3.1. CSLM</li> <li>6.3.1. Ensayos sobre los productos panificados</li> <li>6.3.1. Ensayos de fermentación</li> <li>6.3.2. Evaluación de la calidad de panificados frescos</li> </ul>	
<ul> <li>6.2.1.3. TPA</li> <li>6.2.2. Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</li> <li>6.2.3. Caracterización microestructural</li> <li>6.2.3.1. CSLM</li> <li>6.3.2. Ensayos sobre los productos panificados frescos</li> <li>6.3.2. Evaluación de la calidad de panificados frescos</li></ul>	

6.3.2.3. Porosidad de la miga	
6.3.2.4. Humedad y aw de la miga	
6.3.2.5. Color de la corteza y la miga	247
6.3.3. Ensayos de almacenamiento	
6.3.3.1. Humedad y aw de la miga en el almacenamiento	
6.3.3.1.1. Estudio cinético de la pérdida de humedad en la miga	
6.3.3.2. Textura de la miga en el almacenamiento	250
6.4. Conclusiones parciales	252
Capítulo 7:Obtención y caracterización de almidón resistente tipo III a	partir de
almidón de trigo nativo	257
7.1. Antecedentes	257
7.2. Obtención de almidón retrogradado	259
7.2.1. Ensayos preliminares	259
7.2.1.1. Observación preliminar en microscopio óptico con luz polarizada	
7.2.1.2. Seguimiento del proceso de retrogradación a través de DSC	
7.2.1.3. Determinación de fibra dietaria	
7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a	través de
7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones	través de 263
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> </ul>	través de 263
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> </ul>	través de 263 263 264
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li></ul>	través de 263 263 264 265
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> </ul>	través de 263 263 264 265 266
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almidon de almacenamiento en la obtención de almidon de</li></ul>	través de 263 264 264 265 266 midones
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> </ul>	través de 263 263 264 265 266 midones 268
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos</li> </ul>	través de 263 264 265 266 midones 268 268
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li></ul>	través de 263 264 264 265 266 midones 268 270 270
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos</li> <li>7.3.2.1.1. Transiciones térmicas por DSC</li> <li>7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA</li> </ul>	través de 263 264 265 266 midones 268 270 270 270
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li></ul>	través de 263 263 264 265 266 midones 268 270 270 274 278
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos</li> <li>7.3.2.1.1. Transiciones térmicas por DSC</li> <li>7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA</li> <li>7.3.2.1.3. Caracterización microestructural por SEM</li> <li>7.3.2.1.4. Cristalinidad por rayos-X</li> </ul>	través de 263 263 264 265 266 midones 268 270 270 270 278 278 278
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos</li> <li>7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA</li> <li>7.3.2.1.3. Caracterización microestructural por SEM</li> <li>7.3.2.1.4. Cristalinidad por rayos-X</li> <li>7.3.2.1.5. Evaluación nutricional: digestibilidad in-vitro del almidón</li> </ul>	través de 263 264 265 266 midones 268 270 270 270 274 274 278 282
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos</li> <li>7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA</li> <li>7.3.2.1.3. Caracterización microestructural por SEM</li> <li>7.3.2.1.4. Cristalinidad por rayos-X</li> <li>7.3.2.1.5. Evaluación nutricional: digestibilidad in-vitro del almidón</li> </ul>	través de 263 263 264 265 266 midones 268 270 270 278 282 285 288
<ul> <li>7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a diferentes condiciones</li> <li>7.3.1. Puesta a punto</li> <li>7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria</li> <li>7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro</li> <li>7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido</li> <li>7.3.2. Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de almetrogradados</li> <li>7.3.2.1.1. Transiciones térmicas por DSC</li> <li>7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA</li> <li>7.3.2.1.3. Caracterización microestructural por SEM</li> <li>7.3.2.1.4. Cristalinidad por rayos-X</li> <li>7.3.2.1.5. Evaluación nutricional: digestibilidad in-vitro del almidón</li> </ul>	través de 263 264 265 266 midones 270 270 274 278 282 288 288

Capítulo 10	Anexos	
Glosario		

# Índice de figuras

Figura 1.1. Subunidad de gluteninas de alto peso molecular (Adaptada de Shewry et al., 2001)8
Figura 1.2. Modelo estructural propuesto para el gluten (Adaptada de Shewry et al., 2001)8
Figura 1.3. Representación del arreglo semicristalino de un gránulo de almidón. a) Gránulo entero. b) Detalle de las regiones amorfas y cristalinas alternadas. c) Detalle de las regiones amorfa y cristalina (adaptada de Tester et al., 2004)
Figura 1.4. Organización y estructura de la amilopectina. a) Corte transversal de un gránulo de almidón. b) Arreglo en clusters de la amilopectina. c) Doble hélice formada por ramificaciones de la amilopectina. d) Punto de ramificación. e) Corte transversal de la región cristalina de una molécula de amilopectina (adaptado de Damager et al., 2010)
Figura 1.5. Arreglo cristalino de la amilopectina. a) Corte transversal de la zona cristalina de un clúster. b) Arreglo cristalino tipo A. c) Arreglo cristalino tipo B. Los puntos rojos representan moléculas de agua (adaptado de Damager et al., 2010)
Figura 1.6. Gelatinización de gránulos de almidón. a) Gránulos nativos, b) gránulos hinchados, c) gránulos durante la gelatinización, d) gránulos gelatinizados (Diseño: Arp)
Figura 1.7. a) Representación de la celda unitaria de un cristal de celulosa I para un arreglo en paralelo. b) Esquema de la situación de las cadenas de glucosa (adaptado de Holtzapple, 2003). 
Figura 2.1. Farinograma y parámetros farinográficos (diseño: Arp)
Figura 2.2. Esquema de funcionamiento de un difractómetro láser (Diseño: Arp, adaptada de McClements, 1999)
Figura 2.3. Esquema de los patrones de difracción generados por partículas de diferente tamaño (adaptada de McClements, 1999)
Figura 2.4. Ejemplo de una distribución de tamaño de partículas expresado como %Volumen (rojo) y como %Acumulado (azul) (diseño: Arp)
Figura 2.5. Ejemplo del perfil viscoamilográfico con indicación de los parámetros y rampa de calentamiento-enfriamiento utilizada (diseño: Arp)
Figura 2.6. Representación de un termograma con un pico y un valle, y sus respectivos parámetros térmicos (diseño: Arp)
Figura 2.7. Interpretación del ángulo de fase ( $\delta$ ) entre el esfuerzo de corte aplicado ( $\sigma$ ) y la deformación producida ( $\gamma$ ) en a) un sólido ideal y b) un líquido ideal (diseño: Arp)
Figura 2.8. Ejemplo de un barrido de esfuerzos para la obtención del RVL (diseño: Arp)
Figura 2.9. Espectros mecánicos típicos de a) soluciones diluidas de hidrocoloides, b) soluciones concentradas de hidrocoloides y c) geles autoportantes (adaptada de Steffe, 1996)
Figura 2.10. a) Reómetro RheoStress RS600, b) sondas de tipo platos paralelos rugosos de 30 mm y c) sistema ensamblado
Figura 2.11. Ejemplo de perfiles de relajación para materiales de diferente comportamiento

Figura 2.12. Modelos de relajación de a) Maxwell y b) Kelvin (adaptada de Steffe, 1996)
Figura 2.13. Ejemplo esquemático de un perfil de textura típico para masas panarias (diseño: Arp) 72
Figura 2.14. Explicación esquemática de la RMN-1H (diseño: Arp)
Figura 2.15. Esquema del funcionamiento de un CSLM (adaptada de Claxton et al., 2006)
Figura 2.16. Diferencia entre la iluminación de campo amplio y la iluminación láser de un CSLM (adaptada de Claxton et al., 2006)
Figura 2.17. Esquema del proceso de panificación: a) peso de los ingredientes, b) mezcla de ingredientes secos, c) amasado, d) reposo, e) laminado, f) reposo de la masa laminada, g) división de las porciones, h) bollado, i) reposo previo al armado, j) piezas armadas, k) fermentación, l) piezas fermentadas, m) horneado, n-o) piezas obtenidas y p) corte del producto
Figura 2.18. Volumenómetro de semillas para pan
Figura 2.19. Ilustración de un perfil de textura típico para migas panarias (diseño: Arp)
Figura 2.20. Ejemplo del proceso de recorte, procesamiento, segmentación y cuantificación de imágenes de la miga para el análisis del alveolado (diseño: Arp)
Figura 2.21. Representación del espacio de color CIE 1976 L*a*b* (fuente: Korn et al., 2014) 87
Figura 2.22. Representación esquemática de tasas de hidrólisis para una referencia y una muestra con sus respectivas áreas bajo la curva (diseño: Arp)
Figura 2.23. a) Difractómetro de rayos-X y b) esquema de funcionamiento (diseño: Arp)
Figura 2.24. Esquema de interferencia constructiva para la difracción según la Ley de Bragg (diseño: Arp)
Figura 2.25. Ejemplos de patrones de difracción para muestras a) monocristalinas y b) policristalinas (adaptada de www.slideshare.net/bharathpharmacist)
Figura 2.26. Esquema de las metodologías a) térmica y b) enzimático-térmica para la preparación de almidones resistentes tipo 3101
Figura 3.1. Distribución en %volumen del tamaño de partículas del almidón de HT y del almidón HM109
Figura 3.2. Farinograma representativo de la harina de trigo113
Figura 3.3. Perfiles viscoamilográficos representativos de la harina de trigo (HT) y el almidón resistente (HM, superpuesto con el eje x)
Figura 3.4. Termogramas representativos del almidón de la harina (HT) y del almidón resistente (HM). G y A-L indican los procesos de gelatinización y disociación del complejo amilosa-lípido, respectivamente
Figura 3.5. Distribución teórica de los tamaños de partícula para las premezclas. Las flechas señalan la progresión de las distribuciones a mayor contenido de HM
Figura 3.6. Farinogramas representativos de mezclas a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30 
Figura 3.7. Perfiles viscoamilográficos de las premezclas124

Figura 3.8. Barridos de esfuerzo representativos para la obtención del RVL126
Figura 3.9. Espectros mecánicos de las masas127
Figura 3.10. Gráfico de los valores de tan $\delta$ en función de $\omega$ 128
Figura 3.11. Gráfico de valores de G' en función de G''130
Figura 3.12. Esquema del modelo de relajación de una masa133
Figura 3.13. Curva de relajación representativa ajustada al modelo de Maxwell
Figura 3.14. TPA típico de las masas panarias analizadas136
Figura 3.15. Ajuste de los datos obtenidos por RMN- <sup>1</sup> H para la masa HM30 al modelo propuesto (Ecuación 3.2)
Figura 3.16. Termogramas representativos de masas a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30. P1 y P2 indican los picos relacionados al proceso de gelatinización y A-L a la disociación de los complejos amilosa-lípido
Figura 3.17. Imágenes de SEM de masa a) control a 300× y b) 600×, y c) HM10 a 300× y d) 600×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten149
Figura 3.18. Imágenes de SEM de masa a) HM20 a 300× y b) 600×, y c) HM30 a 300× y d) 600×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten
Figura 3.19. Micrografías SEM en modo bajo vacío de a) harina de trigo y b) almidón resistente Hi- Maize 260. PP = partículas proteicas; PPA = partículas proteicas con gránulos; GAL = gránulos de almidón libres. Flechas rojas señalan huecos dejados por gránulos de almidón151
Figura 3.20. Imágenes de ESEM de masa a) control a 600×, b) 1000× y c) 2000×, y d) HM10 a 600×, e) 1000× y f) 2000×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten
Figura 3.21. Imágenes de ESEM de masa a) HM20 a 600×, b) 1000× y c) 2000×, y d) HM30 a 600×, e) 1000× y f) 2000×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten
Figura 3.22. Imágenes de CSLM a 10× de masas a y b) control, c y d) HM10, e y f) HM20, y g y h) HM30, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha) 
Figura 3.23. Imágenes de CSLM a 0× de masas a y b) control, c y d) HM10, e y f) HM20, y g y h) HM30, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha) 
Figura 4.1. Ajuste de los datos de fermentación para HM10, indicando el TFO163
Figura 4.2. Ajustes de los ensayos de fermentación para a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30 
Figura 4.3. Volumen específico de pan. Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 12; $p < 0.05$ )
Figura 4.4. Perfil de textura representativo de la miga del pan167
Figura 4.5. Parámetros texturales de la miga de pan. Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 16; $p < 0,05$ )

Figura 4.6. Histogramas de la distribución del área alveolar y curvas de frecuencia acumulada de la miga de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30, con imágenes representativas del corte transversal de las piezas
Figura 4.7. Micrografías obtenidas por ESEM de miga de pan a) control a 500×, b) control a 1500×, c) HM10 a 500× y d) HM10 a 1500×. El rectángulo blanco indica la zona de magnificación176
Figura 4.8. Micrografías obtenidas por ESEM de miga de pan a) HM20 a 500×, b) HM20 a 1500×, c) HM30 a 500× y d) HM30 a 1500×. El rectángulo blanco indica la zona de magnificación
Figura 4.9. Digestibilidad in-vitro del almidón en los panificados (promedio ± error estándar, n = 4)180
Figura 4.10. Ajuste de los resultados de digestibilidad de los panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30
Figura 4.11. Puntajes de la prueba de diferencia con un testigo en relación a a) diferencias globales, b) color de la corteza y c) grado de cocción (promedio ± error estándar). Letras diferentes entre las columnas de cada gráfico indican diferencias significativas ( <i>p</i> < 0,05; n = 20)
Figura 4.12. Histogramas de los puntajes en la prueba de escalas hedónicas realizada sin o con información nutricional para los atributos a) apariencia, b) textura, c) sabor, d) color y e) aceptabilidad general
Figura 5.1. Ejemplo del modelo empleado para el ajuste de los datos de humedad de la miga durante el almacenamiento
Figura 5.2. Ajustes realizados sobre los datos experimentales de humedad de la miga durante el almacenamiento de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30
Figura 5.3. Patrones de difracción de rayos-X de a) harina de trigo, b) almidón resistente (HM) y c) almidón extraído de la harina de trigo199
Figura 5.4. Patrones de difracción de rayos-X al inicio (línea negra) y luego de 11 días de almacenamiento (línea azul) de migas a-b) control, c-d) HM10, e-f) HM20 y g-h) HM30. Las líneas punteadas indican la posición de los picos analizados
Figura 5.5. Evolución de las temperaturas características a) T <sub>i</sub> , b) T <sub>p</sub> y c) T <sub>f</sub> de la miga durante el almacenamiento (promedio ± error estándar)204
Figura 5.6. Ajustes al modelo de Avrami realizados sobre los valores de entalpía durante el almacenamiento de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30
Figura 5.7. Ajustes al modelo de Avrami de los datos de dureza de miga de pan a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30 durante el almacenamiento209
Figura 5.8. Modelo representativo de las características estructurales, composicionales y mecánicas de la miga de pan a) sin almidón resistente y b) con elevado contenido de almidón resistente tipo II
Figura 5.9. Modelo representativo de la migración del agua durante el envejecimiento de miga a) sin almidón resistente y b) con almidón resistente tipo II. Flechas enteras indican migración rápida de agua. Flechas punteadas indican migración lenta de agua
Figura 6.1. Nomenclatura utilizada para identificar las formulaciones con aditivos

Figura 6.2. Farinogramas de las premezclas a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C220
Figura 6.3. Perfiles viscoamilográficos representativos de las premezclas de la formulación HM30 sin y con hidrocoloides con el perfil de temperatura223
Figura 6.4. Barridos de esfuerzo para determinación del RVL de las masas con hidrocoloides 225
Figura 6.5. Espectros mecánicos de las masas sin y con hidrocoloides227
Figura 6.6. Ángulos de fase de las masas sin y con hidrocoloides en función de $\omega$ 228
Figura 6.7. Representación de los valores de G' vs. G'' de las masas sin y con hidrocoloides230
Figura 6.8. Imágenes de CSLM de masas HM30 a 20× en los canales para FITC y rodamina B (izquierda), y rodamina B (derecha)235
Figura 6.9. Imágenes de CSLM a 20× de masas a y b) HM30-1H, c y d) HM30-1,5H, e y f) HM30-1C, y g y h) HM30-1,5C, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha)
Figura 6.10. Ajuste de los $\Delta V$ durante la fermentación al modelo de Chapman de 3 parámetros para las masas a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C
Figura 6.11. Volumen específico de pan sin y con hidrocoloides. Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; n = 12)240
Figura 6.12. Parámetros texturales de la miga de pan sin y con hidrocoloides. Promedio $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; n = 16)241
Figura 6.13. Histogramas de la distribución del área alveolar para la miga de panes a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C, con imágenes representativas del corte transversal de las piezas
Figura 7.1. a) Material amiláceo obtenido luego del secado en estufa de las pastas retrogradadas, b) material molido
Figura 7.2. Termogramas del seguimiento por DSC del protocolo térmico para la obtención de almidón retrogradado
Figura 7.3. Apariencia de las pastas de almidón sin pululanasa (a y b) y con pululanasa (c y d) al finalizar la refrigeración del cuarto ciclo
Figura 7.4. Digestibilidad in-vitro de los almidones retrogradados obtenidos y del almidón de partida. ARsp = almidón retrogradado sin pululanasa; ARcp = almidón retrogradado con pululanasa (promedio ± error estándar, n = 4)
Figura 7.5. Termogramas representativos de los almidones retrogradados sin (ARsp) y con tratamiento enzimático (ARcp)
Figura 7.6. Esquema empleado para la obtención de los almidones retrogradados a través de a) tratamiento térmico y b) tratamiento enzimático-térmico
Figura 7.8. Termogramas obtenidos de las suspensiones 1:3 en agua destilada de a) ARsp0, b) ARsp4, c) ARcp0 y d) ARcp4270

Figura 7.9. Perfiles viscoamilográficos representativos del almidón de trigo y los almidones retrogradados obtenidos a partir de él en a) escala completa y en b) y c) escalas magnificadas

### 

# <u>Índice de tablas</u>

Tabla 1.1. Características de las gliadinas	5
Tabla 1.2. Características de las gluteninas	6
Tabla 1.3. Proceso de panificación	
Tabla 1.4. Ingredientes funcionales y potencial actividad biológica	
Tabla 1.5. Ingredientes funcionales utilizados en panificados en la República Argentin	a 32
Tabla 1.6. Efectos fisiológicos asociados al consumo de almidón resistente	
Tabla 2.1. Características alveográficas de la harina de trigo	45
Tabla 2.2. Codificación de muestras en la prueba de diferencias con un testigo	91
Tabla 3.1. Composición proximal de la harina de trigo y el almidón resistente	
Tabla 3.2. Características del gluten de la harina de trigo	
Tabla 3.3. Parámetros de la distribución de tamaños de partícula del almidón de la ha trigo y el almidón HM	rina de 110
Tabla 3.4. Parámetros de la <i>SRC</i> de la harina de trigo	111
Tabla 3.5. Parámetros farinográficos de la harina de trigo	113
Tabla 3.6. Parámetros viscoamilográficos de la harina de trigo	115
Tabla 3.7. Parámetros térmicos del almidón de la harina de trigo	117
Tabla 3.8. Características del gluten de las premezclas	
Tabla 3.9. Parámetros de la distribución de tamaños de partícula de las premezclas	119
Tabla 3.10. Capacidad de retención de solventes de las premezclas	120
Tabla 3.11. Parámetros farinográficos de las premezclas	122
Tabla 3.12. Parámetros de empaste de las premezclas	125
Tabla 3.13. Esfuerzos de corte críticos del RVL de las masas	126
Tabla 3.14. Parámetros del modelado de los espectros mecánicos	129
Tabla 3.15. Parámetros del ajuste de las curvas G' vs. G'' a un modelo lineal	131
Tabla 3.16. Parámetros de relajación de las masas	135
Tabla 3.17. Parámetros texturales de las masas panarias	137
Tabla 3.18. Contenido de humedad de las masas panarias	139
Tabla 3.19. Actividad acuosa de las masas panarias	140
Tabla 3.20. pH de las masas	141
Tabla 3.21. Parámetros del ajuste de los datos de RMN- <sup>1</sup> H al modelo exponencial	143
Tabla 3.22. Parámetros térmicos de masas obtenidos por DSC	147

Tabla 3.23. Valores de la dimensión fractal de la red de gluten de las masas observadas en CSLM 
Tabla 4.1. Parámetros de ajuste de las curvas de fermentación y tiempos de fermentación óptimos
Tabla 4.2. Parámetros de la porosidad de la miga
Tabla 4.3. Parámetros de la distribución de tamaño alveolar171
Tabla 4.4. Valores de humedad y $a_w$ de la miga
Tabla 4.5. Parámetros de color de la corteza y la miga de los panes
Tabla 4.6. Composición nutricional de los panificados179
Tabla 4.7. Parámetros del ajuste de los resultados de digestibilidad e índices glucémicos estimados
Tabla 4.8. Puntaje promedio de las muestras evaluadas sin y con información nutricional186
Tabla 5.1. Valores de humedad y $a_w$ de la miga durante el almacenamiento
Tabla 5.2. Parámetros del ajuste de los datos de humedad al modelo exponencial197
Tabla 5.3. Parámetros adicionales derivados del ajuste197
Tabla 5.4. Temperaturas características de la miga de pan a lo largo del almacenamiento203
Tabla 5.5. Parámetros del ajuste al modelo de Avrami de las entalpías asociadas a la retrogradación
Tabla 5.6. Parámetros del ajuste al modelo de Avrami de los datos de dureza durante el almacenamiento
Tabla 6.2. Parámetros farinográficos de las premezclas sin y con hidrocoloides221
Tabla 6.3. Parámetros viscoamilográficos de las premezclas de HM30 formuladas sin y con hidrocoloides
Tabla 6.4. Esfuerzos de corte críticos del RVL de las masas sin y con hidrocoloides226
Tabla 6.5. Parámetros del ajuste de los espectros mecánicos a la ley de la potencia
Tabla 6.6. Parámetros del ajuste de las curvas de G' vs. G'' a la ley de la potencia
Tabla 6.7. Parámetros del ajuste de las curvas de relajación de las masas sin y con hidrocoloides al modelo exponencial231
Tabla 6.8. Parámetros texturales de las masas sin y con hidrocoloides
Tabla 6.9. Humedad de las masas elaboradas con hidrocoloides
Tabla 6.10. Valores de la dimensión fractal de la red de gluten de masas sin y con hidrocoloides observadas en CSLM235
Tabla 6.11. Parámetros del ajuste de los datos de fermentación y tiempos de fermentación óptimos obtenidos
Tabla 6.12. Parámetros de la porosidad de la miga de panificados sin y con hidrocoloides243

Tabla 6.14. Valores de humedad y actividad acuosa de las migas de panes sin y con hidrocoloides
Tabla 6.13. Parámetros de la distribución de tamaños alveolares
Tabla 6.15. Parámetros de colorimétricos de la corteza y la miga de panes sin y con hidrocoloides
Tabla 6.16. Valores de humedad y <i>a</i> <sup>w</sup> durante el almacenamiento de los panes con hidrocoloides 
Tabla 6.17. Parámetros del ajuste de los valores de humedad de la miga de panes sin y con hidrocoloides
Tabla 6.18. Parámetros cinéticos calculados a partir del ajuste
Tabla 6.19. Parámetros del ajuste al modelo de Avrami de los datos de dureza de la miga de panes sin y con hidrocoloides durante el almacenamiento251
Tabla 7.1. Parámetros asociados a las transiciones térmicas de los almidones retrogradados obtenidos
Tabla 7.2. Parámetros viscoamilográficos del almidón de trigo y los almidones retrogradados
Tabla 7.3. Parámetros del ajuste de los valores de digestibilidad al modelo de Goñi

# Índice de ecuaciones

Ecuación 1.1. Índice glucémico	
Ecuación 1.2. Carga glucémica	23
Ecuación 2.1. Capacidad de retención de solventes	49
Ecuación 2.2. Índice de desempeño del gluten	
Ecuación 2.3. Gluten húmedo	50
Ecuación 2.4. Gluten seco	50
Ecuación 2.5. Gluten index	50
Ecuación 2.6. Contenido de proteína bruta	57
Ecuación 2.7. Contenido de lípidos	58
Ecuación 2.8. Humedad	58
Ecuación 2.9. Cenizas	59
Ecuación 2.10. Contenido de fibra dietaria total	60
Ecuación 2.11. Contenido de carbohidratos distintos de fibra, por diferencia	60
Ecuación 2.12. Módulo elástico o de almacenamiento	63
Ecuación 2.13. Módulo viscoso o de pérdida	63
Ecuación 2.14. Módulo complejo	63
Ecuación 2.15. Ángulo de fase	63
Ecuación 2.16. Ley de la potencia logarítmicamente linealizada para $G'$	
Ecuación 2.17. Ley de la potencia logarítmicamente linealizada para $G''$	68
Ecuación 2.18. Modelo exponencial de Maxwell	70
Ecuación 2.19. Ley de Hooke	71
Ecuación 2.20. Ley de Newton	71
Ecuación 2.21. Modelo exponencial para el decaimiento de <sup>1</sup> H	75
Ecuación 2.22. Dimensión Fractal	80
Ecuación 2.23. Índice de pardeamiento o <i>browning index</i>	
Ecuación 2.24. Parámetro X para el cálculo de browning index	
Ecuación 2.25. Ley de Bragg	
Ecuación 2.27. Modelo de Avrami	
Ecuación 2.28. Fracción volumétrica relativa de cristalización potencial	
Ecuación 2.29. Modelo de Avrami adaptado	
Ecuación 3.1. Modelo de Maxwell con dos elementos	133

Ecuación 3.2. Modelo exponencial de decaimiento para dos poblaciones de <sup>1</sup> H141
Ecuación 4.1. Ecuación de Chapman de 3 parámetros163
Ecuación 4.2. Modelo exponencial de Goñi et al. (1997) para la digestibilidad in-vitro de almidón 
Ecuación 5.1. Modelo de decaimiento exponencial para la pérdida de humedad en la miga de pan durante el almacenamiento194
Ecuación 5.2. Humedad de la miga al tiempo de vida media196
Ecuación 5.3. Tiempo de vida media para la pérdida de humedad de la miga
Ecuación 5.4. Modelo de Avrami adaptado para entalpías de retrogradación de amilopectina en miga de pan205
Ecuación 5.5. Entalpía de retrogradación de la amilopectina en función del tiempo según el modelo de Avrami
Ecuación 5.6. Tiempo de vida media para la retrogradación de la amilopectina según el modelo de Avrami
Ecuación 5.7. Índice de retrogradación de la amilopectina207
Ecuación 5.8. Modelo de Avrami adaptado para la dureza de la miga durante el almacenamiento 
Ecuación 5.9. Incremento de la dureza de la miga en función del tiempo según el modelo de Avrami
Ecuación 5.10. Modelo de Attenburrow et al. (1989) para las propiedades mecánicas de alimentos porosos
## 1.1. Panificados

Los productos panificados cuentan con una extensa historia de desarrollo, siendo considerados como unos de los primeros alimentos procesados elaborados por la humanidad. Si bien existen registros arqueológicos relacionados a procesos de panificación que datan de hace alrededor de 23000 años, fueron los egipcios, hace unos 5000 años, quienes emplearon levaduras para la obtención de panificados leudados por primera vez, según los registros hallados hasta el momento (Zhou, 2014). Luego, con el devenir de la agricultura y la tecnología industrial, el pan se convirtió rápidamente en un alimento de gran popularidad. No sólo provee una gran cantidad de energía, proteínas, vitaminas del grupo B y minerales, sino que además goza de un perfil organoléptico ampliamente aceptado. Es así que el pan blanco presenta aromas y sabores suaves, y una textura esponjosa y fácil de deglutir, posicionándose como un alimento con amplia aceptabilidad en numerosas culturas.

## 1.1.1. <u>Harina de trigo</u>

El trigo en Argentina es uno de los productos básicos de mayor importancia. Tanto es así, que se ubica entre los primeros 5 productos en los rankings respecto al volumen y valor neto de producción, así como en volumen y valor de exportación.

Gran parte del volumen de producción del trigo se destina a la exportación como grano y a la molienda para obtención de la harina. El transporte de trigo en forma de grano resulta mucho más conveniente y eficiente debido a que la importación de los granos tiene menor carga tributaria que en la forma de harina, y además cuando el grano se encuentra estructuralmente íntegro y protegido por sus componentes naturales ve menos comprometida su calidad durante el transporte. Por esto, el mayor volumen de exportación se realiza entonces antes de la molienda (Ministerio de Agroindustria, 2016). La mayor parte del volumen de producción no exportado es molturada para la obtención de harina de trigo, de la cual el 90% se emplea para el consumo interno, siendo el 10% restante destinado a la exportación.

Es importante notar que, del total de la harina de trigo reservada para consumo interno, el 70% es empleado para panificación artesanal en panaderías pequeñas y medianas. Apenas un 10% es empleado para consumo doméstico en empaques de 1 kg, mientras que el 20% restante se distribuye para la elaboración de pastas, galletitas, bizcochos y pan industrializado (Eyhérabide, Giorda, Livore, Nisi, y Tomaso, 2009; Lezcano, 2016, 2017; Miguens, 2017).

Respecto al comercio global, Argentina se encuentra históricamente entre los primeros 10 exportadores principales de harina de trigo. Si bien se han observados algunas disminuciones en los volúmenes exportados como resultado de cambios en políticas de retenciones (por ejemplo, en el año 2013), Argentina ha sabido recuperar posiciones rápidamente. Para el año 2016 se posicionó como el 4º exportador mundial con 575 mil toneladas de harina, sólo por debajo de Turquía (3.533 mil toneladas), Kazajistán (2.391 mil toneladas) y Alemania (827 mil toneladas) (Lezcano, 2017).

En cuanto al destino de las exportaciones argentinas, Brasil se ubica como el principal destino de la harina de trigo argentina, seguido por Bolivia. Otros grandes consumidores de harina de trigo argentina son Chile, Angola, Uruguay, Venezuela, Paraguay y Ecuador, entre otros (Lezcano, 2016, 2017; Ministerio de Agroindustria, 2016).

Como se puede ver, Argentina se presenta entonces como la principal proveedora de harina de trigo para toda la región sudamericana, quedando de manifiesto la importancia de esta producción tanto a nivel regional y como para la economía interna nacional.

Cuando se amplía el campo de estudio hacia las exportaciones generales de alimentos y bebidas, se puede ver que en el año 2017 el volumen de exportación de la harina de trigo alcanzó el 6º lugar, por debajo de los aceites de soja y girasol, sus subproductos y residuos, y los salvados y residuos de cereales (Subsecretaría de Alimentos y Bebidas, n.d.).

El análisis de estos datos permite comprender la importancia que tiene para la economía nacional la producción de harina de trigo. Asimismo, dado el elevado

2

consumo interno de este producto, empleado principalmente para la elaboración de pan artesanal, sería pertinente innovar en los diversos aspectos de la panificación, ya sea tecnológica o nutricionalmente, de manera de obtener productos con alto valor agregado.

## 1.1.1.1. Composición de la harina de trigo

Los componentes mayoritarios de la harina son los responsables de que sea posible obtener la red esponjosa, suave y elástica característica del pan. Fundamentalmente, la harina está compuesta, en promedio, por entre un 70 a 75% de carbohidratos en la forma de almidón, y proteínas en un rango entre 9 y 12%, siendo el valor final de ambos componentes dependiente del grado de refinación de la harina. Además, contiene minerales (cenizas) en un 0,5% y una humedad estandarizada alrededor del 14%. La cantidad de fibra presente en las harinas de uso panadero o doméstico no suele ser muy elevada (< 3%) debido al proceso de extracción en el cual se separa el endospermo almidonoso y el embrión, los cuales formarán parte de la harina, del salvado (fibra). A mayor grado de refinación se elimina mayor proporción de salvado, por lo que harinas más refinadas aportan menos fibra dietaria.

## 1.1.1.1.1. <u>Características de las proteínas de la harina de trigo</u>

Las proteínas de la harina de trigo se diferencian tradicionalmente a través de la clasificación de Osborne para cereales en albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Las albúminas y las globulinas son proteínas hidrosolubles que constan principalmente de proteínas estructurales, enzimas, inhibidores enzimáticos, etc. y no forman parte del conjunto de proteínas que se conocen como gluten. En general, revisten de poca importancia en el proceso de panificación, con excepción de la  $\alpha$ -amilasa. Por el contrario, sólo se consideran como proteínas del gluten a las proteínas de reserva del cereal, constituidas por los dos últimos grupos: gliadinas y gluteninas. Estas proteínas insolubles en agua representan entre el 80 y el 85% de las proteínas totales, y son las responsables de la formación de la red viscoelástica necesaria para la elaboración del pan: la red de gluten. Según la clasificación de Osborne, la cual diferencia a las fracciones proteicas en base a su solubilidad en diferentes medios, las gliadinas pertenecerían al

conjunto de proteínas solubles en soluciones hidroalcohólicas llamadas prolaminas y las gluteninas serían parte del grupo de las glutelinas, proteínas solubles en soluciones diluidas de ácido o álcali, detergentes o mezclas hidroalcohólicas con agentes reductores (como ditiotreitol o 2-mercaptoetanol). Sin embargo, actualmente se conoce que las gluteninas están constituidas por agregados de alto peso molecular formados por subunidades estabilizadas por enlaces disulfuro intercatenarios. Esta forma de agregación es la responsable de las diferencias de solubilidad observadas en las gluteninas respecto a las gliadinas. Así, es posible desagregar estos polímeros mediante reducción de los enlaces disulfuro, obteniendo subunidades con propiedades de solubilidad similares a la fracción de las gliadinas. Por lo tanto, actualmente se considera que estas subunidades de gluteninas pertenecen, junto con las gliadinas, a la categoría de las prolaminas (Tatham y Shewry, 2012).

En la Tabla 1.1 y la Tabla 1.2 se expone un breve detalle de las proteínas del gluten, gliadinas y gluteninas, respectivamente.

La función de las proteínas del gluten en la panificación es bien conocida a nivel empírico. En general, los aspectos clave para la adquisición de una harina adecuada son el contenido y la calidad de las gluteninas y el conocimiento de la relación entre gliadinas y gluteninas (Cauvain, 2012). Una mayor cantidad de gluteninas suele estar asociada a una mayor capacidad para formar una buena red de gluten. Sin embargo, es la calidad de estas proteínas lo que determinará que la formación de la red sea satisfactoria. Dado que las proteínas de reserva del trigo son sumamente polimórficas, tanto las variedades de trigo seleccionadas y como las condiciones de cultivo empleadas influirán en el tipo de gluteninas que la planta sintetizará. Las diferencias en composición aminoacídica y el grado de polimerización de las variantes polimórficas determinarán la extensión y el tipo de interacciones que puedan ocurrir durante el desarrollo del gluten, dando como resultado harinas más adecuadas para la obtención de un producto u otro. Ensayos como los alveográficos, la capacidad de retención de solventes (SRC) y los valores de gluten index derivados de la determinación de gluten permiten verificar la calidad de las gluteninas de las harinas que se busca adquirir (Khalil Khan y Shewry, 2009). Por otra parte, la obtención de masas más viscosas o más

tenaces estará determinada por la relación entre las gliadinas y las gluteninas. Una mayor proporción de gliadinas en la harina dará como resultado una masa más viscosa y extensible, mientras que si se aumenta el contenido de gluteninas se obtendrá una masa más elástica y tenaz (Barak, Mudgil, y Khatkar, 2013). Por esta razón, a la hora adquirir una harina para emplearla en la elaboración de un producto específico los panaderos se basan en caracterizaciones reológicas empíricas de las masas obtenidas con diferentes harinas (alveogramas, extensogramas, farinogramas) que permiten establecer una correlación entre sus propiedades viscoelásticas y la relación gliadina/glutenina. Así, los panaderos pueden verificar que la materia prima a adquirir será adecuada para el uso deseado.

	Tipo (PM)	Características	
G L I A I N A S	α/β (30-34 kD)1	Dominio N-terminal de 5 residuos <sup>1</sup> Dominio central repetitivo de entre 110-130 residuos rico en Gln, Pro, Phe y Tyr <sup>1</sup> Dominio C-terminal no repetitivo de entre 140-160 residuos, con una región rica en Cys (4 residuos), una región extensible rica en Gln y otra región con 2 residuos Cys <sup>1,2</sup> Capacidad para formar 3 puentes S-S intracatenarios <sup>1,3</sup> Dos regiones extensibles: dominio central repetitivo próximo al extremo C-terminal y región repetitiva del dominio C- terminal <sup>1</sup>	
	γ (26-36 kD)1	Dominio N-terminal pequeño de 12 residuos <sup>1</sup> Dominio central repetitivo de entre 80-160 residuos rico en Gln, Pro y Phe <sup>1,4</sup> Dominio C-terminal no repetitivo de entre 140-150 residuos, con una región rica en Cys (6 residuos), una región extensible rica en Gln y otra región con 2 residuos Cys <sup>1,5,6</sup> Capacidad para formar 4 puentes S-S intracatenarios <sup>1,5,6</sup>	
	ω (35-43 kD) <sup>7</sup>	Dominio N-terminal pequeño de 11 residuos <sup>1</sup> Dominio central repetitivo de ~238 residuos rico en Gln, Pro y Phe <sup>1</sup> Dominio C-terminal de 12 residuos sin Cys <sup>1</sup>	

Tabla 1.1. Características de las gliadinas

1 Urade, 2017; 2 Khan y Shewry, 2009; 3 Müller y Wieser, 1995; 4 Hsia y Anderson, 2001; 5 Müller y Wieser, 1997; 6 P. R. Shewry y Tatham, 1997; 7 Tatham y Shewry, 2012

	РМ	Tipo	Características	Subunidad	Características de la subunidad
G L U T E N I N A S	5x10 <sup>6</sup> a 1x10 <sup>7</sup> Da (Grandes agregados unidos por puentes S-S) <sup>1</sup>	HMW-GS (33,3%)	Dominio central repetitivo con giros $\beta$ Dominios N y C- terminales globulares Puentes S-S intracatenarios e intercatenarios	х	83 – 88 kDa C-terminal: 1 Cys N-terminal: 3 Cys
				Y	67 – 74 kDa C-terminal: 1 Cys N-terminal: 5 Cys
		LMW-GS (66,7%)	Puentes S-S intracatenarios e intercatenarios con el macropolímero de gluteninas	В	Número par de Cys Extendedora de cadena <sup>2</sup>
				С	Algunas tienen número impar de Cys Terminadora de cadena <sup>2</sup>
				D	

Tabla 1.2. Características de las gluteninas

1 Wieser, 2007; 2 Lindsay y Skerritt, 1999

El conocimiento de las correlaciones entre la calidad de las gluteninas y la relación gliadinas/gluteninas con las características viscoelásticas de las masas y la calidad del producto final están bien establecidas empíricamente. Sin embargo, el entendimiento de las características fundamentales de estas proteínas (composición, estructura, conformación) y, sobre todo, el mecanismo de formación del macropolímero de glutenina (estructura, interacciones, rol de cada fracción proteica) no están del todo dilucidados. Su estudio ha sido abordado desde diversos enfoques a lo largo del tiempo, dando lugar a la aparición de diversos modelos que han ido mejorando a medida que el conocimiento de los aspectos básicos de las proteínas fue avanzando (Lindsay y Skerritt, 1999). El modelo del macropolímero de glutenina pasó de ser concebido como un arreglo lineal de moléculas formado por enlaces disulfuros intercatenarios a pensarse como diferentes modelos agregativos cuyas variaciones se centraban en los tipos de interacciones y enlaces involucrados (covalentes, no covalentes o ambos) (Ewart, 1972a, 1972b; Kasarda, 1989; Kasarda, Bernardin, y Nimmo, 1976; K. Khan y Bushuk, 1977, 1979a, 1979b). El conocimiento acerca del número y la posición de los

residuos de cisteína en las moléculas permitió avanzar hacia modelos donde un esqueleto estructural formado por los diferentes tipos de proteínas de gluten permitía la incorporación de ramificaciones (Gao, Ng, y Bushuk, 1992; Graveland et al., 1985; Lindsay y Skerritt, 1999). Estos modelos fueron mejorados al obtenerse más precisión acerca de qué tipos de proteínas forman parte del esqueleto del macropolímero y cuáles se unen de forma no covalente a éste.

Si bien tanto las gliadinas como las gluteninas exhiben puentes disulfuro intracatenarios estabilizando su conformación, la capacidad de formación de puentes intercatenarios es exclusiva de las gluteninas. Por ello, en uno de los modelos más aceptados, Shewry, Popineau, Lafiandra, y Belton (2001) proponen que el esqueleto estructural está formado exclusivamente por subunidades HMW-GS (Figura 1.1) unidas por enlaces covalentes (S-S) intercatenarios "cabeza a cola" en forma lineal y ramificada, y que las subunidades LMW-GS se unirían covalentemente a esta estructura (Figura 1.2). Las subunidades LMW-GS pueden extender la cadena, mediante incorporación de más LMW-GS, o terminarla en función de si el contenido de residuos de cisteínas es par o impar, respectivamente. Esta estructura formada en base a uniones disulfuro sería la responsable de otorgar elasticidad a la red de gluten, ya que las moléculas de HMW-GS formadoras del esqueleto contienen dominios centrales con abundantes giros- $\beta$  capaces de extenderse por desestabilización de su estructura secundaria ante un esfuerzo aplicado, mientras que las LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (Cornish, Békés, Allen, y Martin, 2001; Metakovsky, Wrigley, Bekes, y Gupta, 1990). Por otro lado, las gliadinas interactuarían con este macropolímero mediante asociaciones no covalentes de las diferentes fracciones ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ ) a los dominios centrales de las HMW-GS, oponiendo resistencia a la extensibilidad de los giros-β mencionados y aportando principalmente viscosidad a la red. Estas interacciones son muy importantes porque contribuyen a la viscoelasticidad de la masa aportando plasticidad y viscosidad (Belton, 1999; Ewart, 1989).



Figura 1.1. Subunidad de gluteninas de alto peso molecular (Adaptada de Shewry et al., 2001).

El modelo estructural propuesto para el gluten según Shewry et al. (2001) se muestra en la Figura 1.1. En este esquema las gliadinas interaccionan a través de fuerzas no covalentes, probablemente a través de puentes de hidrógeno, con el dominio central de las HMW-GS.

Durante el amasado, el gluten es capaz de hidratarse absorbiendo una gran cantidad de agua. Además, puede interactuar con los demás componentes de la harina, sean estos almidón, polisacáridos no almidonosos y/o lípidos (Bettge y Morris, 2000; Carr, Daniels, y Frazier, 1992; Lee, Swanson, y Baik, 2001).



Figura 1.2. Modelo estructural propuesto para el gluten (Adaptada de Shewry et al., 2001).

## 1.1.1.1.2. Características del almidón de trigo

El almidón de trigo es una sustancia que acarrea una extensa historia. Tanto es así que el almidón de este origen es reconocido como el primero en ser aislado, estando presente en las civilizaciones del antiguo Egipto y Grecia. Fue a partir de estas culturas que el almidón de trigo se expandió hacia otras partes del mundo, como Inglaterra, donde su uso se popularizó dando comienzo a su producción a nivel industrial. Sin embargo, su popularidad no estuvo siempre relegada al uso como ingrediente alimentario, sino que también fue ampliamente utilizado por industrias tan diversas como la textil y la industria del papel (BeMiller y Whistler, 2009).

Desde el punto de vista botánico, el almidón es el polisacárido de reserva del grano de trigo y se encuentra en las células del endosperma organizado en forma de estructuras denominadas gránulos. Estos comprenden entre el 54 y el 72% del peso seco de las semillas de trigo, dependiendo de la variedad y las condiciones de cultivo, y pueden diferir en tamaño de gránulo, contenido aparente de amilosa, solubilidad, comportamiento térmico y propiedades funcionales. En general, un alto contenido de almidón correlaciona con un buen rendimiento del cultivo, aunque esto implica un menor rendimiento en proteína.

Durante el proceso de molienda, los gránulos de almidón son susceptibles de experimentar fracturas, generándose grietas o fisuras. Esto aumenta su capacidad de absorción de agua hasta 4 veces más que la de los gránulos intactos (Cauvain, 2003). Al almidón con estas características se lo denomina almidón dañado, y en la harina de trigo puede representar hasta un 15% de la misma.

1.1.1.1.2.1. Estructura del gránulo de almidón

Los gránulos de almidón de trigo existen en dos formas características: los gránulos tipo A y los gránulos tipo B. Los primeros son grandes, con tamaños mayores a los 10  $\mu$ m, y de forma lenticular. En cambio, los gránulos tipo B son pequeños (tamaño menor a 10  $\mu$ m) y de forma más esférica. Estos últimos comprenden el 30% del peso total del almidón en el trigo, aunque este porcentaje puede variar dependiendo de la línea genética cultivada. Los gránulos tipo A se caracterizan por ser menos susceptibles a la

hidrólisis por  $\alpha$ -amilasas, presentar menor poder de absorción de agua y menor área superficial específica que los de tipo B (BeMiller y Whistler, 2009).

En otro aspecto, ambos tipos de gránulo están compuestos por dos polisacáridos diferentes: la amilosa (aproximadamente 25%) y la amilopectina (aproximadamente 75%). En ambos casos los monómeros constituyentes son unidades de  $\alpha$ -D-glucosa. Los enlaces entre unidades de glucosa en las cadenas de amilosa son de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), y por ende no presenta ramificaciones en cantidad significativa (0,2-0,8% de los enlaces). El grado de polimerización de la amilosa puede encontrarse entre los 800 y los 1600 residuos de glucosa, aunque resulta muy difícil informar valores precisos dado la enorme heterogeneidad que existe entre almidones obtenidos de diferentes variedades o a través de distintas condiciones de cultivo. Las cadenas de amilosa presentan una conformación helicoidal con grupos hidroxilo orientados hacia afuera. El interior de la hélice constituye un entorno no polar que puede alojar moléculas hidrofóbicas tales como los ácidos grasos o I<sub>2</sub> (Sjöö y Nilsson, 2018).

Por su parte, la amilopectina es un polímero altamente ramificado (4-6% de los enlaces), presentando uniones glucosídicas de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) en las regiones lineales (las cuales pueden formar dobles hélices), y de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) en las ramificaciones. Su conformación es arborescente, con un grado de polimerización entre 9600 y 15900 residuos de glucosa, aunque al igual que con la amilosa nuevamente resulta problemático establecer un valor preciso (Sjöö y Nilsson, 2018; Tester, Karkalas, y Qi, 2004). Sin embargo, está relativamente bien establecido que cada una de las ramificaciones presenta, en general, entre 12 – 119, unidades de glucosa dependiendo el nivel de ramificación que ocupe dentro de la molécula. Dentro del gránulo, las moléculas de amilopectina se organizan radialmente formando "clusters". En éstos, las ramificaciones más externas se denominan cadenas A. En general, estas ramificaciones contienen entre 12 y 16 moléculas de glucosa y están unidas mediante un enlace glucosídico  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) a las cadenas llamadas B, las cuales se clasifican en diferentes niveles dependiendo del número de clusters asociados a ellas. Estas cadenas pueden contener entre 20 – 24, 42 – 48, 69 – 75 y 101 – 119 residuos de glucosa dependiendo del número de clusters contenidos (Tester et al., 2004).

## Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Se ha propuesto que las zonas donde se ubican los enlaces  $\alpha$  (1→6) que dan lugar a las ramificaciones se presentan como regiones amorfas, mientas que en aquellas zonas donde las ramificaciones se superponen linealmente se producen ordenamientos entre las diferentes cadenas que dan lugar a dobles hélices paralelas orientadas a izquierdas, dando lugar a un arreglo cristalino. De esta forma los gránulos de almidón presentan una estructura semicristalina (Figura 1.3a), consistente en zonas amorfas y cristalinas alternadas (Figura 1.3b), donde las zonas amorfas son menos densas y están conformadas principalmente por la amilosa y los puntos de ramificación de la amilopectina, mientras que las zonas cristalinas están formadas principalmente por dobles hélices de amilopectina (Figura 1.3c). Así, la cristalinidad de los gránulos de almidón ronda entre el 20 y el 40%. Al observarlos con un microscopio de luz polarizada exhiben birrefringencia con forma de cruz de Malta, que indica un arreglo radial de las moléculas de amilosa y amilopectina en el gránulo alrededor del hilium, el centro biosintético (Tomasik, 2003).



Figura 1.3. Representación del arreglo semicristalino de un gránulo de almidón. a) Gránulo entero. b) Detalle de las regiones amorfas y cristalinas alternadas. c) Detalle de las regiones amorfa y cristalina (adaptada de Tester et al., 2004)

En la Figura 1.4 se muestra el corte transversal de un gránulo de almidón de trigo observado por microscopía confocal láser de barrido (Figura 1.4a), junto con una representación del arreglo de la amilopectina en forma de clúster (Figura 1.4b). En detalle puede observarse la representación de la estructura de doble hélice paralela formada entre las regiones lineales de dos cadenas de amilopectina (Figura 1.4c) y el punto donde una unión glucosídica  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) da lugar a una ramificación (Figura 1.4d). El corte transversal de la región cristalina de estos clusters permite observar el arreglo de las dobles hélices en el espacio (Figura 1.4e).



Figura 1.4. Organización y estructura de la amilopectina. a) Corte transversal de un gránulo de almidón. b) Arreglo en clusters de la amilopectina. c) Doble hélice formada por ramificaciones de la amilopectina. d) Punto de ramificación. e) Corte transversal de la región cristalina de una molécula de amilopectina (adaptado de Damager et al., 2010)

La estructura cristalina del almidón se presenta en distintas variantes polimórficas dependiendo del patrón de difracción de rayos-X que éste exhiba. Estas variantes son llamadas tipo A y tipo B. La primera es el arreglo predominante en almidones de cereales, mientras que la segunda es característica de almidones provenientes de tubérculos. Asimismo, en raíces, legumbres y algunas frutas y tallos se han encontrado almidones que presentan patrones mezclados entre ambas variantes polimórficas, dando lugar al patrón de tipo C. Por otro lado, también se ha clasificado como patrón

tipo V al exhibido por los complejos formados entre la amilosa y los lípidos (Tester et al., 2004).

Las dobles hélices que conforman los clusters se organizan hexagonalmente en dos tipos de variantes polimórficas (Figura 1.5). Los arreglos tipo A consisten en una red monoclínica compacta que da lugar a cristales con muy bajo contenido de agua (ca. 4%) (Figura 1.5b), mientras que los cristales de tipo B son más abiertos y capaces de alojar varias moléculas de agua (ca. 25%) (Figura 1.5c) (Damager, Engelsen, Blennow, Lindberg Møller, y Motawia, 2010).



Figura 1.5. Arreglo cristalino de la amilopectina. a) Corte transversal de la zona cristalina de un clúster. b) Arreglo cristalino tipo A. c) Arreglo cristalino tipo B. Los puntos rojos representan moléculas de agua (adaptado de Damager et al., 2010)

## 1.1.1.1.2.2. Transiciones térmicas del almidón

Los gránulos de almidón descriptos en los párrafos anteriores son susceptibles a sufrir transformaciones cuando se calientan en exceso de agua. Al conjunto de cambios que tiene lugar durante este proceso se lo denomina gelatinización. Los gránulos tipo A y B difieren en su comportamiento térmico. Así, si bien los gránulos de tipo A presentan una mayor entalpía de gelatinización que los de tipo B, estos últimos requieren una mayor aplicación de energía para la disociación de los complejos amilosa-lípido debido principalmente a su mayor contenido lipídico.

Si se prepara una suspensión de almidón nativo (Figura 1.6a) en exceso de agua a temperatura ambiente lo primero que ocurrirá es que los gránulos comenzarán a hincharse (Figura 1.6b), esto es, absorber parte del agua incrementando su tamaño. Dependiendo la temperatura, el origen y la variedad del almidón, sus gránulos pueden incrementar su tamaño hasta 50 veces (BeMiller y Whistler, 2009). Hasta este punto los gránulos de almidón mantienen su arreglo semicristalino concéntrico. Pero, al calentar esta suspensión, ocurre un fenómeno irreversible que implica un aumento mayor del volumen por absorción de agua y la pérdida del orden molecular y por lo tanto, de la birrefringencia (Figura 1.6c y Figura 1.6d). Esta es la gelatinización propiamente dicha. La gelatinización se inicia en las zonas amorfas donde los enlaces de hidrógeno son más lábiles permitiendo la entrada de agua al gránulo. Luego, ocurre la disociación de la doble hélice de moléculas de amilopectina, la fusión de las zonas cristalinas y la salida de moléculas de amilosa lo que ocasiona un incremento de la viscosidad de la suspensión.



Figura 1.6. Gelatinización de gránulos de almidón. a) Gránulos nativos, b) gránulos hinchados, c) gránulos durante la gelatinización, d) gránulos gelatinizados (Diseño: Arp).

La gelatinización de almidón de trigo en exceso de agua analizada por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se presenta como una única endoterma entre 50 y 80 °C. Cuando el agua es limitante se observa un corrimiento del rango de temperatura de gelatinización a valores mayores y un desdoblamiento de la endoterma (Ghiasi, Hoseney, y Varriano-Martson, 1982). Si se continúa incrementando la temperatura o se realiza un esfuerzo de cizalla la estructura remanente del gránulo sigue dañándose y permitiendo la salida de más amilosa.

Cuando la pasta se enfría ocurre la gelación de la amilosa, la cual se da por la formación de estructuras de doble hélice entre las distintas moléculas. El resultado es una matriz continua de amilosa donde se encuentran insertos gránulos de almidón gelatinizados y/o sus fragmentos, que contienen principalmente amilopectina. Este sistema se domina gel de almidón.

Al prolongarse el almacenamiento del gel, la amilosa y la amilopectina pueden recristalizar, fenómeno que se conoce como retrogradación del almidón. Este proceso ocurre en el lapso de algunas horas en el caso de la amilosa, aunque puede demorar varios días o semanas en el caso de la amilopectina. La retrogradación de la amilopectina ocurre dentro de los gránulos gelatinizados o sus remanentes.

#### 1.1.2. Panificación

El Código Alimentario Argentino (CAA), en el artículo 725 del Capítulo IX, define al pan como: "el producto obtenido por la cocción en hornos y a temperatura conveniente de una masa fermentada o no, hecha con harina y agua potable, con o sin el agregado de levadura, con o sin la adición de sal, con o sin la adición de otras substancias permitidas para esta clase de productos alimenticios". Y en el artículo 726 define como Pan, Pan blanco, Pan francés, o Pan tipo francés, al "producto obtenido por la cocción de una masa hecha con harina, agua potable y sal en cantidad suficiente, amasada en forma mecánica y fermentada por el agregado de masa agria y/o levaduras". Además, establece que el pan debe presentar miga porosa, elástica y homogénea y corteza de color uniforme amarillo-dorado. Asimismo, debe ser de olor y sabor agradables y no debe contener más de 3,25% de cenizas totales calculadas sobre sustancia seca.

La harina de trigo debe su capacidad para formar una masa viscoelástica a las proteínas de reserva del grano y son éstas las que permiten la obtención del pan. Las diferencias principales entre las distintas formas de panificación se encuentran en la mezcla, amasado, incorporación de aire, formación y desarrollo del gluten. La subdivisión de la masa y las etapas del proceso que afectan a las piezas individuales modifican la calidad del producto, aunque dicha calidad se genere durante el desarrollo de la masa, dando lugar a un amplio abanico de productos que difieren en forma, tamaño, textura, sabor, etc.

Los cambios deseables resultantes de un desarrollo óptimo de la masa están asociados a la capacidad de la misma de retener burbujas de gas (CO<sub>2</sub>) y permitir, durante las fases de fermentación y horneado, la expansión uniforme de la pieza. Para mejorar la retención de gas es deseable obtener masas extensibles. Además, la reducción de la resistencia y elasticidad son importantes en la modificación de la estructura de las burbujas durante el proceso.

#### 1.1.2.1. Fenómenos asociados a las distintas etapas del proceso de panificación

En la Tabla 1.3 se resumen los principales fenómenos que ocurren durante el proceso de panificación. Se desarrollarán en profundidad aquellos procesos que revisten mayor importancia para el presente trabajo.

#### 1.1.2.1.1. <u>Amasado</u>

En el comienzo del amasado ocurre la dispersión uniforme de los ingredientes seguida por la disolución y la hidratación de la harina, en particular de las proteínas y del almidón dañado.

El proceso más importante que sucede durante el amasado, gracias al aporte de energía mecánica, es el desarrollo de la red de gluten, una matriz cohesiva y viscoelástica. Durante el amasado el almidón absorbe cerca del 40% del agua (Cauvain, 2015) y actuaría como relleno en la matriz de la masa contribuyendo a aumentar su viscoelasticidad. Se ha propuesto que en la masa el almidón y las proteínas del gluten se encontrarían formando fases diferentes (Tolstoguzov, 1997).

Proceso	Objetivo y/o fenómenos asociados		
Tamizado de la harina	Eliminación de partículas extrañas		
Mezclado de los ingredientes y amasado 10 – 20 minutos	Absorción de agua Desarrollo de elasticidad y extensibilidad del gluten -SH + HS- ↔ -S-S- Interacción proteínas – glicolípidos – almidón		
Corte y moldeado	Aproximación de tamaño y forma de las piezas		
Fermentación $T = 23 - 28 \degree C$ 2 - 3 hs Humedad relativa controlada $( \ge 75\%)$	Dilatación de la masa Evaporación de agua Dilatación del aire Generación de CO <sub>2</sub> por acción de levaduras o leudantes químicos		
Cocción en horno T externa ≈ 230 °C T interna < 100 °C T superficie ≈ 195 °C	En corteza: Desecación Pardeamiento no enzimático (Maillard) Formación de maltol (flavor) En miga: Gelatinización parcial del almidón Pérdida de vitamina B <sub>1</sub> Muerte de levaduras Inactivación de amilasas Coagulación de proteínas (albúminas y globulinas) Pérdida de agua (contenido final del 45%)		
Enfriamiento T = 21 °C Humedad relativa (80%)	Evitar cambios de textura por migración de agua Evitar pérdida de peso		
Envejecimiento del pan	Retrogradación de amilosa y amilopectina Pérdida de humedad		

Tabla 1.3. Proceso de panificación

Por otro lado, el amasado permite la incorporación de aire a la masa. El O<sub>2</sub> proveniente del aire es consumido por las levaduras y el N<sub>2</sub> proporciona el núcleo de la burbuja a cuyo interior puede difundir el CO<sub>2</sub> formado durante la fermentación. Al finalizar el amasado, la masa panaria presenta las características viscoelásticas óptimas para el procesado posterior (Cauvain, 2003). La obtención de un pan de buena calidad se encuentra determinada por las características de la masa formada durante la etapa de amasado, siendo éste un paso crítico de la panificación. Del mismo depende la capacidad de la masa para retener el gas generado durante la fermentación y el

adecuado balance entre el flujo viscoso y la fuerza elástica, el cual depende también de las características del gluten.

#### 1.1.2.1.2. <u>Fermentación</u>

En esta etapa la pieza ya moldeada se relaja. Se produce una expansión de la masa debido a la producción de  $CO_2$  por las levaduras, obteniéndose una pieza aireada y esponjosa. El grado en que las levaduras puedan acceder a los azúcares para llevar adelante la fermentación está determinado por dos factores principales: la concentración de almidón dañado y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. En esta etapa se determinan en gran medida la forma y el volumen requeridos para el momento del horneado. En la fermentación también se producen cambios en la composición de la matriz por los productos formados durante la misma como etanol y  $CO_2$ , y por la acción de las proteasas de la harina, contribuyendo a la aparición de las propiedades organolépticas características.

#### 1.1.2.1.3. <u>Cocción</u>

Durante esta etapa la masa sufre una serie de importantes modificaciones debido a la exposición a altas temperaturas, las cuales conducen a la obtención del pan. Ocurre una rápida expansión del gas en la masa, eliminación de agua, gelatinización del almidón y coagulación de las proteínas. Debido a que diferentes zonas del pan se exponen a diferentes temperaturas, las reacciones también ocurren en forma diversa en cada zona. Así es como se desarrolla la corteza en la superficie donde la evaporación del agua es intensa (temperaturas de 160 °C), mientras que, en el interior de la pieza donde la pérdida de humedad es menor, se conserva la esponjosidad (temperaturas de 96 °C).

Durante los primeros minutos de horneado, previos a la muerte de las levaduras, se genera la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> por lo que la masa continúa expandiéndose. La masa debe tener la capacidad de retener el gas que se está formando, lo cual sólo puede lograrse si se ha formado una adecuada estructura del gluten durante el amasado (Maloney y Foy, 2003).

## Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Por otro lado, durante el horneado, el almidón gelatiniza, fijando la estructura alveolar de la miga y determinando el volumen alcanzado por el pan (Kalentunc y Breslauer, 2003). Asimismo, contribuye al desarrollo del color de la corteza, uno de los primeros parámetros de calidad percibidos por el consumidor, debido a que comprende la apariencia externa del producto. El color característico de un pan horneado se genera por pardeamiento no enzimático producto de reacciones de Maillard, una serie de complejas reacciones que involucran a hidratos de carbono reductores, tales como glucosa y otras dextrinas derivadas de la hidrólisis del almidón, y a proteínas que presentan aminoácidos con restos nitrogenados en sus cadenas laterales, como la lisina. Las reacciones de Maillard se ven notablemente favorecidas a temperaturas cercanas a los 160 °C y a bajas actividades acuosas, condiciones que se generan en la superficie de la masa durante el horneado debido al frente de deshidratación provocado por la acción directa del calor. Por esta razón la corteza exhibe su característico color pardo mientras que la miga, al no alcanzar temperaturas tan altas debido a su mayor contenido de agua, conserva el color de la masa (Edwards, 2007).

## 1.2. Nutrición y panificados

#### 1.2.1. Rol de los panificados en la nutrición humana

La composición nutricional básica del pan no se ha modificado demasiado desde que comenzó su elaboración, un hecho notable dado que este alimento ronda los 6000 años de historia con presencia en todo el mundo. Su amplia distribución se debe a que su elaboración requiere ingredientes tan accesibles como agua, sal, levadura y, por supuesto, harina de trigo, siendo el cultivo de este grano fácilmente adaptable a diversos climas y suelos. A su vez, esta es una fuente proteica más rica que las harinas de otros granos comunes como maíz o arroz, por lo que el pan ha cumplido un rol fundamental en las dietas de innumerables civilizaciones, tanto por su aporte proteico como energético (Zhou, 2014).

En un principio, el elevado aporte energético que el pan hacía a la dieta resultaba ventajoso para las sociedades que requerían realizar de una gran cantidad de labores

físicas como cultivar, cazar y construir viviendas, entre otras actividades, en un contexto de escasez de alimentos. Sin embargo, con el tiempo las sociedades fueron capaces de desarrollar nuevas tecnologías que facilitaron sus tareas y el acceso a una amplia variedad de alimentos. Así, fue posible garantizar la producción masiva de alimentos vegetales y animales para satisfacer las necesidades nutricionales de gran parte de la población. En estas circunstancias de mayor sedentarismo y mejor acceso a los nutrientes, el rol nutricional del pan en la alimentación humana comenzó a ser menos requerido. No obstante, llegado a este punto, el pan ya estaba fuertemente arraigado en el acervo cultural alimentario de la humanidad, por lo que continuó teniendo un lugar privilegiado en la dieta humana.

En el pan blanco, los carbohidratos totales presentes como almidón y otros azúcares pueden fácilmente superar el 70% del peso seco de este alimento. Los procesos culinarios y tecnológicos que se aplican durante la elaboración del pan destruyen parcialmente los gránulos en que se presenta el almidón nativo, dando lugar a la aparición de almidón gelatinizado. Cuando este es consumido las amilasas digestivas lo degradan, y sus productos son rápidamente absorbidos en el intestino. Este proceso conlleva la elevación brusca y rápida de la glucemia, con el consecuente aumento de los niveles de insulina. Adicionalmente, las particulares características de esta matriz, como la porosidad de la miga, facilitan su disgregación durante la masticación y favorecen aún más la acción hidrolítica de las enzimas digestivas, dando lugar a una extensa liberación de azúcares fácilmente asimilables (Fardet, Leenhardt, Lioger, Scalbert, y Rémésy, 2006; W. Zhou, 2014). Los azúcares pueden entonces ser absorbidos por la mucosa intestinal, pasando al torrente sanguíneo y elevando rápidamente la glucemia y la respuesta insulínica. Estas características ubican al pan como uno de los alimentos de mayor índice glucémico en la dieta.

Diversas investigaciones realizadas a través del seguimiento de sujetos de prueba sanos a lo largo de varios años han concluido que las dietas con alta carga glucémica, elevada concentración de carbohidratos de rápida absorción y con bajo contenido de fibra de cereales aumentan el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, en la medida que se repiten a lo largo de la vida (Augustin, Franceschi, Jenkins, Kendall, y La Vecchia, 2002; Brand-Miller, 2003; Hodge, English, O'Dea, y Giles, 2004; Salmerón et al., 1997; Schulze et al., 2004).

Tanto la diabetes mellitus tipo 2 como la obesidad son trastornos metabólicos que parten de un desbalance energético. En el caso de la diabetes, está particularmente relacionado al metabolismo de los azúcares. Por su parte, la obesidad es considerada, junto con el sedentarismo, como el factor de riesgo más importante al momento de desarrollar diabetes en individuos genéticamente predispuestos, siendo esta patología crónica multifactorial e incluyendo alteraciones a nivel hormonal e inmunológico. La diabetes se caracteriza por una deficiencia en la producción de insulina por parte de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, y/o por una insuficiente respuesta en las células blanco, la que puede deberse a alteraciones en el receptor de la hormona o a alteraciones en la señalización post-recepción.

En general, la diabetes comienza con un fenómeno tisular de resistencia a la insulina. Esta hormona cumple la función de disminuir la concentración de glucosa en sangre permitiendo su ingreso hacia los tejidos capaces de metabolizarla adecuadamente, ya sea a través de su uso como fuente de energía o para la síntesis de glucógeno en los músculos, o para la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo. En condiciones de resistencia a la insulina estos tejidos pierden la capacidad de responder a la presencia de la hormona, siendo necesaria una mayor concentración de ésta para producir el mismo efecto. Con el paso del tiempo la resistencia a la insulina de los tejidos adiposo y muscular se intensifica, por lo que pueden ocurrir eventos de hiperglucemia postprandial. Por último, se ha propuesto que el sostenimiento en el tiempo de esta situación de resistencia, la superproducción de insulina por parte de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y las circunstancias de gluco y/o lipotoxicidad acaban por desencadenar la apoptosis de las células  $\beta$ , disminuyendo la producción de insulina y dando lugar a eventos de hiperglucemia en ayunas. En estas circunstancias se considera completo el cuadro de diabetes mellitus tipo 2 (Pérez Bravo, 2009).

#### 1.2.2. <u>Índice glucémico y carga glucémica</u>

Diversos conceptos fueron definidos para entender, clasificar y estudiar a los alimentos con elevado contenido de carbohidratos y al impacto que su ingesta produce en la salud humana. El más importante y más ampliamente utilizado es el índice glucémico (*IG*), ideado por Jenkins et al. en 1981. Para su realización, estos autores reclutaron voluntarios saludables, a los cuales les solicitaron ingerir un alimento en condiciones estandarizadas, tras lo cual realizaron el seguimiento de su glucemia en el tiempo. Estos resultados fueron comparados con valores control obtenidos de un procedimiento similar, pero administrando un contenido equivalente de carbohidratos de rápida absorción.

Esta determinación del *IG* se realiza in-vivo, a través de medidas de la concentración de glucosa en sangre en función del tiempo (en general, a lo largo de 2 hs) luego del consumo de 50 g de carbohidratos del alimento estudiado. La curva obtenida es comparada con la respuesta producida por el consumo de 50 g de carbohidratos de un alimento de referencia. Se calcula como la relación entre el área bajo la curva del alimento problema y la de referencia, expresándose como porcentaje. Como patrones pueden empelarse glucosa y pan blanco debido a que ambos producen curvas glucémicas elevadas y amplias. Se considera que ambos presentan valores de *IG* = 100 (Hare-Bruun, Flint, y Heitmann, 2006; Venn, Kataoka, y Mann, 2014).

El *IG* se definió entonces como el área bajo la curva de respuesta glucémica que produce el alimento expresada como porcentaje del área bajo la curva correspondiente a la misma cantidad de carbohidratos ingeridos como glucosa (Ecuación 1.1).

$$IG (\%) = \frac{ABC_a}{ABC_c} \times 100$$
 Ecuación 1.1

donde *ABC*<sup>*a*</sup> es el área bajo la curva de respuesta glucémica de 2 hs producida por el alimento y *ABC*<sup>*c*</sup> es el área bajo la curva de respuesta glucémica de 2 hs producida por el control.

Adicionalmente fue definido otro parámetro derivado del *IG*, la carga glucémica (*CG*) de un alimento, el cual tiene en cuenta no sólo el índice glucémico del alimento sino también la ingesta de carbohidratos que implica su consumo. Así, la *CG* se calcula según la Ecuación 1.2.

$$CG = IG \times \% HC$$
 Ecuación 1.2

donde *%HC* es el porcentaje de hidratos de carbono que contiene el alimento en cuestión.

De esta forma, una unidad de *CG* equivale aproximadamente a la respuesta glucémica producida por 1 g de glucosa (Simin Liu et al., 2000).

El desarrollo de estos conceptos permitió establecer mejores predicciones que las disponibles hasta el momento, las cuales empleaban tablas de contenido de carbohidratos basadas en métodos de análisis químicos, de la respuesta glucémica que un alimento produce en el organismo tras ser ingerido. El surgimiento de estos parámetros dio lugar a la clasificación de los alimentos en función de su *IG* y permitió a los pacientes diabéticos realizar un mejor control glucémico (Willett, Manson, y Liu, 2002a).

Entre los cereales y sus derivados, se pueden distinguir aquellos con efecto glicémico bajo (menor a 45%, considerado saludable) como la avena y las pastas cocidas al dente y los de efecto glicémico alto (mayor a 70%, considerado poco saludable) como el pan blanco, pan francés, pan de molde, etc. (Foster-Powell, Holt, y Brand-Miller, 2002; Levitan, Mittleman, Håkansson, y Wolk, 2007; Wolever, 2003). Los alimentos de alto *IG* representan un riesgo para el desarrollo de obesidad y diabetes y, de manera indirecta, para las enfermedades cardiovasculares (Ebbeling et al., 2005; Pi-Sunyer, 2002; Qi y Hu, 2007; Sheard et al., 2004).

Tal ha sido el impacto que las definiciones de *IG* y *CG* han producido en la forma de entender la respuesta glucémica, que algunos investigadores han recomendado reducir el *IG* y el contenido de almidón digerible, incluso aunque la ingesta de carbohidratos

siga siendo elevada (Hodge et al., 2004). A modo de ejemplo, las dietas promedio de la población adulta australiana han disminuido su *IG* y su *CG* hasta un 5% y un 12%, respectivamente, desde el uso de estos conceptos en 1995, hasta 2012 (Kusnadi, Barclay, Brand-Miller, y Louie, 2017).

Sin embargo, debido a la complejidad experimental que conlleva la determinación del *IG* in-vivo, se han desarrollado también métodos in-vitro que permiten estimar el *IG* de un alimento. Estos métodos incluyen la hidrólisis de un alimento adecuadamente procesado empleando enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasas, pepsina, amiloglucosidasas, entre otras) en condiciones fisiológicas. Así, si se cuantifican los azúcares liberados por la hidrólisis a lo largo del tiempo es posible obtener curvas que representan la tasa de digestibilidad del alimento. De este modo, es posible contar con procedimientos más rápidos y que pueden ser realizados en la mayoría de los laboratorios, siendo de particular importancia para aquellos casos donde el estudio se encuentra centrado en el desarrollo de un producto (Araya, Contreras, Alviña, Vera, y Pak, 2002; K. N. Englyst, Englyst, Hudson, Cole, y Cummings, 1999; Goñi, Garcia-Alonso, y Saura-Calixto, 1997).

Tanto es así que las tablas internacionales de clasificación de alimentos en base a su *IG* colocan al pan blanco con valores por encima de los de azúcares como la sacarosa (Atkinson, Foster-Powell, y Brand-Miller, 2008). Si a esta situación se le agrega el bajo contenido de fibra dietaria presente en el pan, este pasa a considerarse como uno de los principales alimentos a reducir en la dieta cuando existe riesgo de desarrollar o ya se padece diabetes tipo 2.

#### **1.3.** Alimentos funcionales y salud

#### 1.3.1. <u>Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)</u>

En América, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son la principal causa de mortalidad prematura. Enfermedades como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, respiratorias, síndrome metabólico e incluso cáncer, son patologías cuya prevalencia ha aumentado considerablemente tanto en adultos como en jóvenes. La incidencia de estas enfermedades podría disminuir si se modifican los hábitos de vida y se disminuye la exposición a factores de riesgo. Es

conocido que el sedentarismo, el tabaquismo, el consumo de alcohol y las dietas bajas en fibra, pero altas en carbohidratos y/o lípidos, son factores de riesgo importantes para el desarrollo de ECNT. Esto significa que un cambio hacia hábitos más saludables, como la ejercitación física y la mejora de la dieta, podría efectivamente disminuir el riesgo de contraer estas patologías (Ministerio de Salud de la Nación, 2017; OMS, 2018).

En Argentina, el 77,89% de la mortalidad se produce por ECNT, contra un 15,18% de muerte por enfermedades transmisibles, maternales, perinatales y nutricionales, y un 6,94% debido a accidentes o heridas graves. Esto sitúa a las ECNT como la principal causa de mortalidad por un amplio margen. La mayor parte de esta mortalidad se produce debido a enfermedades cardiovasculares (40,28%), cáncer (25,87%), enfermedades respiratorias (12,03%), digestivas (6,01%), genitourinarias (4,77%) y diabetes mellitus (3,44%), entre otras. Esta situación indica que deben plantearse estrategias para reducir la incidencia de ECNT de manera urgente. Por ejemplo, un enfoque centrado en modificar los hábitos alimentarios y el estilo de vida sería adecuado para disminuir la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes mellitus (Leal, Guagliano, y Sanchez Rico, 2016).

## 1.3.2. <u>Alimentos funcionales</u>

En las últimas décadas, el desarrollo de alimentos que no solo cumplan con los requerimientos nutricionales, sino que además promuevan beneficios para la salud, ha sido uno de los grandes objetivos en la investigación en el campo de los alimentos para el desarrollo de nuevos productos. Estos alimentos, llamados funcionales, pueden contener en su formulación ingredientes que ejerzan una actividad biológica beneficiosa para el organismo que los consuma, como bacterias probióticas y/o carbohidratos no digeribles con efecto prebiótico, algunos tipos de péptidos, minerales como calcio, hierro, magnesio o zinc, ácidos grasos poliinsaturados, isoflavonas y fitoesteroles, entre otros. Se consideran funcionales también aquellos alimentos que han sido modificados en su composición para disminuir la presencia de componentes presentes naturalmente en ellos que podrían perjudicar a la salud (bajos en sodio, bajos en grasas saturadas y/o azúcares) ya sea por eliminación o por sustitución con otros

componentes no perjudiciales. En el sentido contrario, también son funcionales aquellos alimentos modificados para aumentar la concentración o la biodisponibilidad de algún componente natural ya presente en el alimento que tenga demostrados beneficios para la salud, como la fibra dietaria o ciertos minerales, incluyéndose también los alimentos enriquecidos o fortificados (Alimentos Argentinos, 2013; Cámpora, 2016).

Teniendo en cuenta todas estas posibilidades y sus combinaciones, la gama de desarrollos factibles en relación a alimentos funcionales es amplia y con un gran potencial de comercialización y consumo. Sin embargo, los alimentos funcionales pueden ser considerados como tales siempre y cuando sean capaces de incorporarse a una dieta cotidiana y sus efectos hayan sido probados in-vivo. En países donde el marco normativo lo permite, estos efectos pueden ser informados como declaraciones de salud del producto, siendo posible encontrar alimentos que "producen una baja respuesta glucémica", "mejoran la función intestinal", "aumentan las defensas" y "reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares", entre otros (Martirosyan y Singharaj, 2016). En tanto, en nuestro país, a través de la Disposición 7730/2011, se dispone la adopción para la evaluación y autorización de declaraciones de propiedades saludables en alimentos la "Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos", y se dispone a través de la Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011 y la Resolución Conjunta 229/2011 y 731/2011, la incorporación de los artículos 1389 y 1390 al CAA, respectivamente, los cuales versan sobre las definiciones y normativas respecto a dos tipos de ingredientes funcionales, los probióticos (Art. 1389) y prebióticos (Art. 1390). Cada declaración de salud debe estar respaldada por investigaciones científicas, por lo que el desarrollo de este tipo de alimentos ha estado en la mira de la investigación dado el gran problema de salud pública que implica el consumo de alimentos poco saludables. La búsqueda de nuevos ingredientes y su efectiva aplicación en los alimentos puede ser un desafío ya que las modificaciones realizadas producen cambios a nivel tecnológico, dificultando la producción o elevando los costos, y a nivel sensorial, muchas veces limitando la aceptabilidad del alimento por parte del consumidor.

## Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Sin embargo, el esfuerzo para concientizar a la población acerca del consumo de alimentos más saludables ha logrado que los consumidores tengan un mayor conocimiento de los problemas asociados al sobrepeso y el consumo de alimentos con alto contenido en azúcar y grasas, aumentando su preocupación por mejorar su salud y su imagen. Esto produjo que, desde hace varios años, la tendencia sea que los consumidores demanden mayor variedad y accesibilidad a este tipo de productos. Así, actualmente es posible encontrar una gran variedad de productos en góndola cuyo envase declare contener ingredientes saludables. Dado que la causa principal de los problemas de sobrepeso es la ingesta excesiva de calorías, la posibilidad de adquirir alimentos bajos en calorías, similares a los habituales, podría ayudar a mantener dietas hipocalóricas y por lo tanto contribuiría a reducir los problemas de sobrepeso (Ribotta y Tadini, 2009).

### 1.3.3. Ingredientes funcionales

Si bien son los alimentos los que se deben considerar como funcionales, existen ingredientes que ejercen efectos específicos sobre la salud al ser incorporados en un alimento, convirtiéndolo en funcional. Estos ingredientes son conocidos como ingredientes funcionales. El desarrollo de alimentos funcionales suele realizarse, en una primera etapa, demostrando la capacidad de un ingrediente de ejercer una cierta actividad que se espera se mantenga una vez incorporado al alimento. En una segunda etapa se evalúa entonces que el alimento formulado siga manteniendo la actividad en niveles suficientes para promover la salud del consumidor.

Los ingredientes a los cuales se les atribuye funcionalidad son variados en su naturaleza y actividad biológica. En la Tabla 1.4 se expone un resumen de los ingredientes funcionales mejor conocidos y su potencial actividad biológica.

La fibra alimentaria reviste una particular importancia debido a la gran variedad de componentes que quedan englobados dentro de su definición. La fibra dietaria incluye carbohidratos no digeribles tan diversos como polisacáridos no almidonosos y oligosacáridos resistentes, como celulosa, hemicelulosa, polifructosas, galactooligosacáridos, gomas, mucílagos y pectinas; los llamados carbohidratos análogos, que incluyen a las dextrinas resistentes, carbohidratos sintéticos como polidextrosa, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, entre otros, y almidones resistentes. También se incluyen compuestos diferentes de carbohidratos, como la lignina y sustancias asociadas a polisacáridos, complejos no almidonosos y a lignina, como ceras, fitatos, cutina, taninos, etc. (Fuentes-Zaragoza, Riquelme-Navarrete, Sánchez-Zapata, y Pérez-Álvarez, 2010; Prosky, 2008).

mgreatente	neurrau protogica		
Péptidos bioactivos	Efecto beneficioso frente a la hipertensión		
Isoflavonas (soja)	Disminución del riesgo de ciertos tipos de cáncer Reducción de síntomas de la menopausia		
Minerales	Retraso en la osteoporosis		
Ácidos grasos poliinsaturados	Reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares		
Esteroles de plantas	Inhibición de la absorción de colesterol		
Flavonoides, carotenoides, vitaminas antioxidantes (A, E, C)	Protección frente a ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares		
Probióticos/prebióticos	Mejora de la microbiota intestinal y del estado inmunológico		
Fibra dietaria	Regulación de funciones intestinales y colesterolemia		

Tabla 1.4. Ingredientes funcionales y potencial actividad biológicaIngredienteActividad biológica

Adaptada de Juárez Iglesias y Perote Alejandre (2010).

La fibra dietaria aporta múltiples beneficios para la salud de los consumidores cuando se incorpora en la dieta regular. Entre sus efectos más conocidos se encuentran la disminución del colesterol sérico, regulación de la glucemia, mejora en la motilidad intestinal, aumento de la saciedad, mejora en la respuesta inmune y regulación de la microbiota beneficiosa (efecto prebiótico). El empleo de fibra en la elaboración de alimentos podría entonces contribuir a disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como las enfermedades coronarias (S. Liu et al., 1999), diabetes (Montonen, Knekt, Järvinen, Aromaa, y Reunanen, 2003), accidentes cerebrovasculares (Steffen et al., 2003), obesidad y constipación (Anderson et al., 2009).

## 1.3.4. <u>Almidón resistente</u>

Los almidones contienen habitualmente una fracción que resiste la hidrólisis enzimática en el intestino, a la que se le ha denominado almidón resistente. La presencia de estos almidones en concentraciones considerables disminuye la cantidad de hidratos de carbono factibles de ser hidrolizados y absorbidos, de manera que se tiene una menor respuesta glucémica e insulínica.

Asp (1992) definió al almidón resistente como la suma del almidón y productos de degradación del mismo que resisten la digestión en el intestino delgado de individuos sanos. Esto significa que los componentes almidonosos de estos almidones son capaces de resistir el ataque enzimático de las  $\alpha$ -amilasas y recorrer el intestino delgado sin ser digeridos ni absorbidos. Adicionalmente, en general, presentan un tamaño de partícula muy pequeño, lo cual podría minimizar el efecto sobre la textura de los productos. Además, son de color blanco y no aportan sabor, por lo que la calidad sensorial suele ser igualmente aceptable que la de los alimentos análogos elaborados sin almidón resistente (Aravind, Sissons, Fellows, Blazek, y Gilbert, 2013; Baixauli, Sanz, Salvador, y Fiszman, 2008; Hedayati, Majzoobi, y Farahnaky, 2018; Tsatsaragkou, Papantoniou, y Mandala, 2015).

Los almidones resistentes se han clasificado en varias categorías de acuerdo a los mecanismos que les confieren la resistencia enzimática (McClearly y Brown, 2004; Nugent, 2005). Los almidones resistentes tipo I son almidones cuya resistencia se debe a la protección que diferentes componentes vegetales (como las paredes celulares de las plantas u otros componentes estructurales) le brindan ante el ataque enzimático. Los de tipo II, en cambio, son almidones nativos naturalmente resistentes debido al elevado grado de cristalinidad que presentan sus gránulos. Así, estos almidones son muy compactos y las amilasas no son capaces de acceder a su estructura para hidrolizarlos. Los almidones resistentes tipo III son resistentes debido a la

retrogradación, es decir, la recristalización de los fragmentos de amilosa y amilopectina previamente gelatinizados. Durante el enfriamiento de una pasta de almidón que se ha sometido a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización ocurre la reasociación de las cadenas de amilopectina. Esta reestructuración de los fragmentos almidonosos permite la formación de cristales muy estables que no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas. En el pan la cantidad de almidón resistente tipo III formada puede variar dependiendo de las condiciones de proceso utilizadas. Por otro lado, existen también almidones que han sido modificados químicamente para generar resistencia, clasificados como tipo IV. Estos son generalmente almidones entrecruzados o sustituidos (por ejemplo, por fosforilación, acetilación, hidroxipropilación, etc.). Por último, una categoría incorporada recientemente es la de los almidones resistentes tipo V, almidones que han sido complejados con lípidos. La asociación de lípidos y amilosa produce complejos resistentes a la digestión (Amini Khoozani, Birch, y Bekhit, 2019; Raigond, Ezekiel, y Raigond, 2015).

#### 1.3.4.1. Almidón resistente tipo II

Los almidones resistentes tipo II son almidones obtenidos a través de selección de cepas, en general de maíz o trigo, que producen almidón con alta proporción de amilosa, la cual puede alcanzar hasta el 80% de su peso. Se caracterizan por presentar una estructura cristalina tipo B y, si bien está conformado por una fracción amilácea digerible, su contenido de almidón resistente real puede rondar entre el 40 y el 60% (Chaudhary, Kumar, y Langyan, 2014). Es importante considerar que, dependiendo del origen botánico del cual se extraiga este almidón, la propiedad de estos gránulos de no ser digeridos puede alterarse durante la cocción, limitando el empleo de las variedades más termolábiles. Se ha observado que el almidón de maíz rico en amilosa es suficientemente termoestable en las condiciones de cocción de diversos alimentos, por lo que es capaz de conservar su contenido de almidón resistente y ejercer su acción como fibra alimentaria (Aravind et al., 2013; Bustos, Perez, y León, 2011; Hedayati et al., 2018; Korus, Witczak, Ziobro, y Juszczak, 2009; Tsatsaragkou et al., 2015).

## 1.3.4.2. Almidón resistente tipo III

Los almidones resistentes tipo III son almidones que pueden considerarse como modificados a través de procesos térmicos. Estos pueden formarse naturalmente en un alimento cocido una vez que este comienza a enfriarse, por ejemplo, en el caso de papas y pastas hervidas y luego almacenadas en ambiente refrigerado. El calentamiento de alimentos amiláceos en presencia de agua produce la gelatinización de los gránulos de almidón, induciendo la pérdida de su fase cristalina. Cuando este sistema es enfriado, los polímeros que componen al almidón tienden a reasociarse en estructuras más densas y ordenadas (cristales), dando como resultado la producción de una fracción de almidón resistente a la digestión enzimática.

Sin embargo, un calentamiento posterior de este sistema podría inducir nuevamente la desestabilización de una parte de la fase cristalina recientemente formada, produciendo la disminución del contenido total de almidón resistente tipo III. Muchos autores han realizado investigaciones sobre cómo lograr una fase retrogradada resistente a la digestión que sea, además, capaz de atravesar procesos de cocción sin disminuir el contenido de almidón resistente. Una de las tendencias más sobresalientes ha sido el empleo de tratamientos termocíclicos que permiten obtener una fase cristalina enriquecida en cristales más termoestables. Posteriormente, la combinación de estos procesos junto con la aplicación de tratamientos enzimáticos que faciliten la reasociación de las fracciones amiláceas han demostrado ser efectivos al momento de lograr productos con mayores rendimientos en almidón resistente tipo III (Amini Khoozani et al., 2019).

## 1.4. Panificados saludables

En Argentina, el consumo de pan se encuentra ampliamente arraigado. Sin embargo, cada vez es mayor el conocimiento sobre el consumo crónico de este alimento y sus consecuencias para la salud, principalmente en relación a su alto contenido de carbohidratos digeribles. Numerosas patologías se han asociado al consumo frecuente de carbohidratos digeribles y alimentos con elevado *IG* y/o *CG* como los panificados (Willett, Manson, y Liu, 2002b), pero dada la dificultad de excluir a estos productos en

la dieta se han pensado diversas estrategias con el objetivo de disminuir el impacto que estos alimentos tienen en la salud. Así, aprovechándose de su ubicuidad en la dieta, los panes constituyen una muy buena opción para ser modificados de manera obtener un alimento funcional o convertirlos en vehículos para introducir ingredientes funcionales en la dieta cotidiana. En nuestro país, el enriquecimiento de la harina por Ley Nacional 25.630 (2002) busca cumplir esta función al exigir a la incorporación de hierro, ácido fólico, y vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y niacina a esta materia prima. De este modo, también es posible aumentar la capacidad funcional del pan incorporando ingredientes beneficiosos para la salud tales como almidón resistente, proteínas y péptidos, compuestos bioactivos y antioxidantes, entre otros (Cauvain, 2012).

## 1.4.1. <u>Panificados con ingredientes funcionales</u>

Los ingredientes funcionales más habituales en panificados industriales en nuestro país se muestran en la Tabla 1.5. A partir de la misma surge que los almidones resistentes no tienen lugar dentro de los ingredientes funcionales actualmente en uso. Esto indica que sería importante invertir esfuerzos en desarrollar productos a partir de la incorporación de almidón resistente dadas sus ventajas tanto nutricionales como tecnológicas.

Harinas	Fuente de Fibra	Semillas*	Fortificación con minerales y vitaminas	Leche
Harina de trigo (enriquecida) Harina integral Harina de centeno	Salvado de trigo Fibra de avena	Lino Chía Amapola Girasol Sésamo	Fe Ca Zn P Mg Cu Se Vitamina D	Leche entera en polvo descremada

Tabla 1.5. Ingredientes funcionales utilizados en panificados en la República Argentina

Información obtenida a partir de la revisión de los productos ofrecidos por las mayores empresas productoras de pan industrializado de nuestro país.

\*Aportan ácidos grasos insaturados, minerales, fibras.

Según la información provista por distintos fabricantes, el aporte de fibra de una porción de pan de 50 g oscila entre los 1,2 y 4,3 g y las kilocalorías aportadas varían

entre 106 y 135, dependiendo de la formulación. En este sentido, se han realizado diversos intentos para disminuir el *IG* del pan, sustituyendo en diferentes proporciones la harina de trigo por otra materia prima que aporte almidones de digestión lenta o almidones resistentes, otorgándole la característica funcional, en la medida que esta modificación logre demostrar un beneficio para la salud (Chinachoti, 1995). Cabe destacar que el pan blanco contiene tan sólo alrededor de 1% de almidón resistente y cerca del 70% de su almidón es de digestión rápida (H. N. Englyst, Kingman, y Cummings, 1992).

Por su parte, los almidones resistentes, como los de tipo II, contienen menos de la mitad de las calorías que aportan los almidones tradicionales (1,6 kcal/g y 4,2 kcal/g, respectivamente), a su vez que aportan hasta un 60% de fibra dietaria (Amini Khoozani et al., 2019; Fuentes-Zaragoza et al., 2010; Homayouni et al., 2014; Keenan et al., 2006; Laurentin y Edwards, 2013; Raigond et al., 2015; Tsatsaragkou et al., 2015). Así, estos ingredientes resultan de especial interés para mejorar el perfil nutricional del pan.

### 1.4.2. <u>Almidón resistente como ingrediente funcional en panificados</u>

Una de las estrategias más empleadas para conferir funcionalidad al pan tradicional es el reemplazo parcial de la harina de trigo por harinas de otros orígenes u otros ingredientes. Realizar esta metodología empleando almidón resistente permitiría obtener productos panificados de menor índice glucémico y con un contenido de fibra dietaria aumentado. Estos productos serían aptos para ser incluidos en las dietas de personas que requieran cumplir regímenes nutricionales especiales.

Por otro lado, el almidón resistente es considerado como un ingrediente alimentario con un amplio espectro de efectos fisiológicos positivos, incluso actuando como prebiótico (McClearly y Brown, 2004). Es así como, una vez alcanzado el intestino grueso, el almidón resistente podría actuar como sustrato para la fermentación por la microbiota intestinal, dando lugar a la formación de dióxido de carbono, metano, hidrógeno, ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Nugent, 2005). Estos últimos, ejercerían efectos beneficiosos sobre las células que conforman de la mucosa intestinal (Topping, Fukushima, y Bird, 2003). Así mismo, el empleo de AR permitiría obtener productos de menor valor calórico.

Los efectos fisiológicos generales y específicos implicados en el consumo de alimentos con almidón resistente se detallan en la Tabla 1.6.

Electo insiologico específico
Respuesta glucémica postprandial más lenta Respuesta insulínica postprandial más lenta
Menos calorías disponibles Metabolismo lipídico aumentado
Sustrato fermentable (controlado) Aumento de la producción de SCFA en el colon Niveles reducidos de ácidos biliares secundarios Niveles reducidos del amonio fecal Aumento del bolo fecal Reducción del tiempo de tránsito fecal Tolerancia alta
Aumento de la población de bifidobacterias colónicas y lactobacilos Disminución de la población de patógenos Interacciones sinérgicas potenciadas con otros probióticos
Ayuda a mantener la viabilidad de baterías probióticas durante el procesamiento y consumo del alimento
Absorción aumentada de minerales, como calcio
Aumento de la producción de butirato Aumento del índice apoptótico Disminución de los niveles de compuestos citotóxicos del colon
Fibras alimentarias Proteínas Lípidos

Tabla 1.6. Efectos fisiológicos asociados al consumo de almidón resistente

Adaptada de Ribotta y Tadini (2009)

## 1.4.2.1. Consecuencias tecnológicas de la incorporación de ingredientes funcionales

La mejora nutricional o funcional de los productos alimenticios suele tener consecuencias a nivel tecnológico. Los alimentos pueden verse alterados a diferentes
niveles, tanto en su reología como en su textura, apariencia y estabilidad fisicoquímica, lo cual puede disminuir su vida útil e incluso su aceptabilidad.

En el caso de los panificados, dado que el pan es un alimento con un sabor suave muy característico, el cual ha sido muy conservado a lo largo de toda su historia, la inclusión de ingredientes que puedan aportar sabores inesperados podría ser causa de un menor interés por parte de los consumidores a la hora de adquirirlos. Lo mismo puede aplicarse a la aparición de coloraciones, aromas o partículas que se perciban como extrañas en el producto.

En el caso de los almidones resistentes, su color blanco, sabor neutro y su pequeño tamaño de partícula, permitiría que estos almidones puedan ser incorporados en elevada proporción sin que los consumidores perciban cambios en su sabor o aroma. Además, aunque seguiría siendo necesario considerar posibles modificaciones en la miga, como su aireado y su textura, varios estudios han demostrado que los consumidores estarían dispuestos a tolerar cierta disminución en la calidad de los productos si perciben que su consumo puede traerles beneficios para la salud (Baixauli, Salvador, Hough, y Fiszman, 2008).

Sin embargo, existe un obstáculo anterior a la llegada de un alimento funcional al público, que es su desempeño durante el proceso de elaboración. Es decir, la incorporación de nuevos ingredientes a un alimento de producción industrial puede ser incompatible con los procesos o equipamientos ya puestos a punto en la planta de producción, o volverla menos eficiente.

Diversos estudios han demostrado que, en general, la incorporación de ingredientes beneficiosos para la salud en niveles significativamente altos conlleva dificultades tecnológicas, principalmente afectando en forma negativa la reología de la masa, su retención de aire y la textura del producto final, dando lugar a panes de miga más compacta (Han y Koh, 2011; Tebben, Shen, y Li, 2018; Sunan Wang y Zhu, 2016; J. Xu, Wang, y Li, 2019). Desde este punto de vista, el reemplazo de la harina de trigo por otros componentes implica una disminución en la proporción de proteínas de gluten. Como se explicó anteriormente, estas proteínas (gliadinas y gluteninas) son las responsables de formar la red viscoelástica capaz de expandirse y retener el CO<sub>2</sub> formado durante la fermentación. La facilidad para manipular una masa panaria (adecuada elasticidad y baja adherencia) y las características de calidad final de los panes (buen volumen, miga aireada y esponjosa) dependen de la calidad y cantidad de gluten, por lo que el reemplazo de harina de trigo por harinas de otros orígenes o almidones conduce generalmente a masas panarias adhesivas o débiles, panes de menor volumen y migas de pobres características texturales.

En este sentido, con el objetivo de obtener un producto funcional cuyo desarrollo sea favorable para los diferentes eslabones de la cadena de producción, es necesario considerar no sólo el ingrediente funcional que se desea incorporar, sino también cualquier otro ingrediente o aditivo que ayude a lograr tal incorporación de forma efectiva y dando lugar a un producto de buena aceptabilidad comercial. En estos casos, el agregado de mejoradores de panificación puede resultar una opción adecuada para compensar la pérdida de calidad (Stauffer, 1990; Tebben et al., 2018).

#### 1.4.2.2. Hidrocoloides

El empleo de aditivos en panificación es una práctica común que busca resolver heterogeneidades en la calidad de las harinas de trigo. La producción de pan requiere que las harinas empleadas en la cadena de elaboración sean de calidad homogénea para evitar tener que realizar ajustes en la formulación cada vez que ingresa un nuevo lote de harina a la planta. Sin embargo, la calidad de las harinas está sujeta a las condiciones climáticas y estacionales del cultivo de trigo, así como también a las etapas posteriores como el almacenamiento de los granos en silos y proceso de molienda. Para sortear estos inconvenientes se emplean diferentes aditivos para corregir y/o dirigir sus características hacia los usos para los que sea adquirida.

Los aditivos comúnmente empleados son agentes oxidantes como ácido ascórbico o azodicarbonamida, agentes emulsificantes como ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico (DATEM) y estearoil lactilato de sodio (SSL), y enzimas como amilasas, proteasas y transglutaminasas, entre otros. Estos aditivos cumplen funciones tan variadas como las de reforzar la red de gluten, favorecer las propiedades reológicas de la masa que permitan una buena retención de gas, favorecer los procesos de levado, etc. (Tebben et al., 2018).

A pesar de la amplia gama de aditivos existentes, la búsqueda de nuevas soluciones que sean accesibles y logren resolver problemáticas generales o específicas que los aditivos tradicionales no logran corregir ha permanecido activa desde hace décadas. Las investigaciones en este aspecto han dado protagonismo a ciertos compuestos polisacáridos de alto peso molecular, denominados hidrocoloides. En general, estos son sustancias provenientes de matrices vegetales, algas, hongos y/o bacterias, las cuales pueden obtenerse a un costo accesible. En este grupo se encuentran diferentes gomas, las cuales son consideradas también como una fracción de la fibra dietaria. Entre las más comunes se encuentran la goma guar, goma garrofín, goma xántica, carragenanos, alginatos, pectinas y celulosas.

En años recientes se han desarrollado diversas investigaciones enfocadas en el empleo de distintos tipos de celulosas modificadas como aditivos de panificación. En general, estas investigaciones se enfocaron en corregir deficiencias en la calidad de harinas refinadas o de grano entero provistas directamente por el molino (Armero y Collar, 1996a; Guarda, Rosell, Benedito, y Galotto, 2004; Zannini, Waters, y Arendt, 2014). Así, si bien estas investigaciones demostraron el buen desempeño que estos componentes producen en la panificación, cuando se trata de incorporar ingredientes funcionales a los productos se recurre al empleo de aditivos tradicionales como forma de paliar las deficiencias que pudiesen surgir. Esta situación ha dejado un vacío en el conocimiento acerca del rol potencial que las celulosas modificadas podrían ejercer a la hora de mejorar la calidad panadera de formulaciones que han incorporado ingredientes funcionales.

#### 1.4.2.2.1. <u>Celulosas modificadas</u>

La celulosa es un polisacárido de alto peso molecular proveniente principalmente de las paredes celulares de las células vegetales, aunque se encuentra también en algas y hongos. Se compone exclusivamente de monómeros de β-D-glucosa unidos entre sí a

#### Capítulo 1: Introducción

través de enlaces glucosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), lo cual le otorga una conformación de tipo plegado  $\beta$  y permite su cristalización en estructuras altamente ordenadas.

Gracias a esto, la celulosa presenta porcentajes de cristalinidad superiores a los exhibidos por otros polímeros de glucosa como el almidón, alcanzando valores que rondan entre el 40, 60 o 70% para celulosas provenientes de ciertas bacterias, algodón y ciertas algas, respectivamente. La celda unitaria de la celulosa nativa, denominada celulosa I, es un arreglo monoclínico estabilizado por puentes de hidrógeno a lo largo de cadenas de celulosa paralelas (Figura 1.7). Dadas estas características, la celulosa es insoluble en agua y resistente a la digestión enzimática humana, por lo que tras ser ingerida actúa como fibra dietaria insoluble (Holtzapple, 2003).



Figura 1.7. a) Representación de la celda unitaria de un cristal de celulosa I para un arreglo en paralelo. b) Esquema de la situación de las cadenas de glucosa (adaptado de Holtzapple, 2003).

En general, el empleo de componentes insolubles en agua como aditivos en panificación no suele contribuir a la obtención de buenos resultados. La incapacidad de estos compuestos de integrarse eficientemente a la matriz acaba por generar obstaculizaciones al momento de formar una red de gluten fuerte y entrecruzada (L. Li et al., 2018). Sin embargo, la modificación química de la celulosa ha dado lugar al surgimiento de nuevos compuestos derivados con mayor solubilidad. Entre las celulosas modificadas más empleadas se encuentran la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y la carboximetilcelulosa sódica (CMC). En ambos casos se trata de celulosas sustituidas químicamente por grupos hidroxipropilo y metilo, y carboximetilo, respectivamente.

Para la obtención de estas dos celulosas modificadas es necesaria la obtención previa de celulosa alcalina. Esta se prepara mediante el proceso de mercerización, un procedimiento ideado por John Mercer en 1844 para mejorar las características de las celulosas de algodón empleadas en la fabricación de hilos (Cook, 1984). El mismo consiste en la inmersión de la celulosa en una solución concentrada de hidróxido de sodio (concentración mayor al 14%). A través de este proceso los iones Na<sup>+</sup> se introducen en la estructura de la celulosa. El tratamiento de esta celulosa alcalina con mezclas de cloruro de metilo y cloruro de 2-hidroxipropilo da lugar a la formación de HPMC, mientras que si se la trata con cloroacetato de sodio se obtiene CMC (Holtzapple, 2003).

La HPMC es capaz de solubilizarse en agua fría, dando soluciones con diferente rango de viscosidad dependiendo del grado de polimerización y el número de sustituciones con grupos hidroxipropilo y/o metilo que presente. Por otro lado, la presencia de estos grupos químicos no aporta carga a la molécula, por lo que este compuesto resulta muy estable en un rango de pH amplio (3 – 11). Además, la HPMC tiene la capacidad de formar geles cuando sus suspensiones se calientan por encima de su temperatura de gelificación, la cual puede variar entre los 63 y los 80 °C a medida que se incrementa el grado de sustitución. Estos geles son, además, reversibles durante el enfriamiento.

Por su parte, la CMC es también un polímero soluble en agua. Sus soluciones son translúcidas, incoloras y de sabor neutro. La viscosidad de las mismas dependerá de su grado de polimerización. Sin embargo, a diferencia de la HPMC, las soluciones de CMC no gelifican luego del aumento de su temperatura. Por otro lado, la sustitución de la celulosa alcalina con grupos carboximetilo aporta cargas negativas al polímero. Esto la hace sensible a cambios de pH, afectando tanto su viscosidad en solución como su reactividad en presencia de otros componentes. Su rango de estabilidad abarca pH entre 3 y 6 (Murray, 2009).

Ambos polímeros están aprobados como aditivos alimentarios. Su uso en panificados ha sido probado con buenos resultados en productos tanto frescos como congelados, así como también en panes pre-cocidos y enriquecidos con fibra (Angioloni y Collar, 2009; Armero y Collar, 1996b, 1997; Bárcenas, Benedito, y Rosell, 2004; Bárcenas y Rosell, 2005; Dodić et al., 2007; Rosell, Rojas, y Benedito de Barber, 2001).

# **Objetivos:**

# **Objetivo general:**

Optimizar la obtención y utilización de almidones resistentes para la obtención de productos panificados aptos para regímenes especiales.

# **Objetivos específicos:**

Evaluar el efecto del agregado de almidón resistente tipo II sobre la calidad tecnológica, sensorial y nutricional de productos panificados.

Evaluar el efecto de la incorporación de almidón resistente en los cambios fisicoquímicos producidos durante el almacenamiento.

Analizar las interacciones que se establecen entre el almidón resistente y los principales componentes de la harina, y postular mecanismos que permitan explicar los efectos encontrados.

Estudiar el efecto de hidrocoloides como mejoradores de la calidad de panificados con alto contenido de almidón resistente tipo II analizando las interacciones que se establezcan en el sistema.

Obtener almidón resistente tipo III a partir de almidón de trigo optimizando distintas variables de proceso.

# Capítulo 2 Materiales y métodos

# Capítulo 2: Materiales y métodos

# 2.1. Materiales

# 2.1.1. <u>Materias primas</u>

Se utilizó harina de trigo comercial 000 (Molino Campodónico S.A., Argentina) con las características alveográficas que se detallan en la Tabla 2.1.

Parametros alveograficos*	
P (mmH <sub>2</sub> O)	121
L (mm)	85
P/L	1,42
W (J)	390×10 <sup>-4</sup>

**Tabla 2.1. Características alveográficas de la harina de trigo** Parámetros alveográficos\*

\*Datos provistos por el molino.

En los ensayos alveográficos, los parámetros P y L son obtenidos de la altura y la base del alveograma, y se relacionan con la tenacidad y la extensibilidad de la masa, respectivamente. Por su parte, W es el trabajo de deformación alveográfico registrado durante el desarrollo del ensayo. Tanto la relación P/L como el valor de W indican que la harina presentaría una buena aptitud para la panificación.

Para la elaboración de las masas y panes se utilizó almidón resistente tipo II. El almidón resistente Hi-Maize  $260^{\text{TM}}$ , donado por Ingredion S.R.L., es un almidón de alta amilosa proveniente del maíz. Presenta una estructura semicristalina compacta que impide el acceso de las enzimas digestivas, ganando así su resistencia a la hidrólisis por  $\alpha$ -amilasas, por lo que aporta un 60% de fibra dietaria (base seca).

Para las formulaciones también se utilizó NaCl (sal de mesa Celusal, Industrias Químicas y Mineras Timbo S. A., Argentina), levadura fresca prensada (Calsa, Argentina) y agua destilada.

#### 2.1.2. Formulación de las premezclas

Las mezclas de harina de trigo y almidón resistente fueron preparadas reemplazando a la harina por el almidón en diferentes proporciones, con un 2% p/p de NaCl (en base harina o mezcla harina/almidón, según corresponda).

Los niveles de sustitución utilizados fueron del 0%, 10%, 20% y 30% (correspondientes a las formulaciones control, HM10, HM20 y HM30, respectivamente).

#### 2.1.3. Caracterización de materiales y premezclas

#### 2.1.3.1. Ensayos farinográficos

Los farinogramas son ensayos reológicos empíricos que se realizan sobre las harinas de trigo para evaluar su calidad para la elaboración de pan. Un farinógrafo de Brabender consta de un módulo de amasado termostatizado provisto de dos ganchos amasadores en forma de Z. En este módulo se carga la cantidad de harina especificada (por ejemplo, 300 g). Se activa el movimiento de los ganchos para mezclar la harina y, mediante una bureta, se agrega el agua para la formación de la masa. Estos ganchos están unidos a un sistema de medición que registra el torque que el equipo debe proveer a los ganchos para mantener la velocidad de amasado. Para obtener una curva farinográfica es necesario, en primera instancia, realizar un preensayo que permita determinar la cantidad de agua requerida por la harina para formar una masa de consistencia adecuada. Por convención, la parte central de la curva farinográfica debe situarse en 500 UF (Unidades Farinográficas). El valor de la cantidad de agua necesaria para lograr esta consistencia es conocido como absorción de agua farinográfica (A) y se expresa como porcentaje v/p en base harina con una humedad del 14%. Una vez conocido este valor es posible obtener las curvas farinográficas propiamente dichas empleando la cantidad de agua dada por A.

Las curvas (farinogramas) se obtienen registrando el torque ejercido por el gancho para deformar la masa a lo largo del tiempo de amasado. Existen varios parámetros que pueden obtenerse de los farinogramas y que brindan información acerca de las características de la masa y de su desempeño en la panificación: el tiempo de desarrollo farinográfico (TD), la estabilidad farinográfica (E) y el grado de ablandamiento (F). Estos parámetros pueden extraerse de las curvas como se indica en la Figura 2.1, según las definiciones siguientes:

- Tiempo de desarrollo farinográfico (TD): es el tiempo de amasado, en minutos, necesario para que la masa hidratada con la cantidad de agua *A* alcance su máxima consistencia antes de que esta comience a disminuir. Este valor es el que corresponde a un tiempo de amasado que permita obtener una red de gluten bien desarrollada.

- Estabilidad farinográfica (E): se obtiene como el tiempo, en minutos, que transcurre desde que la parte superior de la curva farinográfica sobrepasa la línea de 500 UF hasta el punto en el que vuelve a pasar por debajo de este valor. El valor de E permite conocer la tolerancia de la masa a lo largo de un amasado continuo.

- Grado de ablandamiento (F): es obtenido como la diferencia, en UF, entre el valor que toma el centro de la curva en el pico de consistencia y su valor 12 minutos después.



Figura 2.1. Farinograma y parámetros farinográficos (diseño: Arp)

Para obtener los farinogramas en el presente trabajo, muestras de harina de trigo, harina de trigo con NaCl y las premezclas de harina de trigo/NaCl/almidón resistente fueron evaluadas en un farinógrafo de Brabender (Duisburgo, Alemania) de 300 g de capacidad de acuerdo a procedimiento AACC 54-21.01 modificado (peso constante de harina y peso variable de masa) (AACC International, 2000a). Con el objetivo de caracterizar las propiedades de mezclado de las muestras se extrajeron los siguientes parámetros A, TD, E y F utilizando el software Brabender<sup>®</sup> Farinograph 4.0.2. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

#### 2.1.3.2. Capacidad de retención de solventes (SRC)

La cantidad y calidad de los distintos componentes de las harinas determinan su desempeño o su adecuación para diferentes usos: panificación, pastelería, galletitas, pastas, etc. Particularmente, esto es así en el caso de las proteínas, los pentosanos y el almidón dañado. En el ensayo de capacidad de retención de solventes (*SRC*, del inglés: *Solvent Retention Capacity*) se ponen en evidencia cada uno de estos componentes al interaccionar de manera distinta cuando son enfrentados con soluciones de diferentes solutos.

Los solventes empleados son agua destilada, solución de sacarosa 50% p/p, solución de carbonato de sodio 5% p/p y solución de ácido láctico 5% p/p. A excepción del agua, la cual interactúa de manera global con todos los componentes de la harina, cada solvente interactúa de manera distinta con las diferentes fracciones mencionadas. Generalmente se asocia a la capacidad de retención de la sacarosa con las características de los pentosanos, a la del carbonato de sodio con el almidón dañado, y a la del ácido láctico con las características de las gluteninas (AACC International, 2000b). El análisis conjunto de las cuatro capacidades de retención será lo que sugiera el uso adecuado para la harina. El valor de la *SRC* se obtiene como porcentaje de solvente retenido en base a la harina ensayada con una humedad del 14%. La *SRC* de la harina de trigo y las premezclas (preparadas sin NaCl) fueron determinadas de acuerdo al procedimiento AACC 56-11.02 (AACC International, 2000b). Las capacidades de retención de agua (*WaRC*), sacarosa (50%, p/p) (*SuRC*), carbonato de sodio (5%, p/p) (*SCRC*) y ácido láctico (5%, p/p) (*LARC*) fueron evaluadas para cada muestra por

duplicado. Brevemente, el método consiste en mezclar 5 g de harina o premezcla con 25 ml de solvente en tubos de centrífuga de base cónica de 50 ml, empleando un tubo diferente por cada solvente. Estas mezclas se agitan vigorosamente cada 5 min para favorecer la solvatación y el hinchamiento durante un tiempo total de contacto solvente-muestra de 20 min. Luego, los tubos son centrifugados (1000×g; 15 min) y el sobrenadante es descartado. La cantidad de solvente retenido por cada muestra es determinada por pesada (peso del gel). Los valores de capacidad de retención de solvente se calculan entonces según la Ecuación 2.1.

$$\% SRC = \left[\frac{peso \ gel}{peso \ harina \ o \ premezcla}\right] \times \left[\frac{86}{100 - humedad \ harina \ o \ premezcla}\right] \times 100$$
 Ecuación 2.1

Por otro lado, también es posible sopesar la influencia de las características del gluten respecto de las influencias de los demás componentes (pentosanos y almidón dañado) mediante el índice de desempeño del gluten (*IDG*) derivado de los valores de *SRC* (Kweon, Slade, y Levine, 2011) (Ecuación 2.2).

$$IDG = \frac{LARC}{(SURC+SCRC)}$$
 Ecuación 2.2

#### 2.1.3.3. Determinación del contenido de gluten de la harina de trigo

Los valores de gluten húmedo (*GH*) y gluten seco (*GS*) de la harina de trigo fueron obtenidos con el empleo de un Glutomatic 2200 (Perten Instruments, Suecia). Los ensayos en harina se realizaron según el método 38-12.02 (AACC International, 2000c). Para esto, se pesaron 10,0 g de harina en la cámara de amasado-lavado del Glutomatic sobre una malla de 88 µm, agregando además 5 ml de agua sobre la harina. La cámara se colocó en el soporte del Glutomatic y la obtención del gluten se realizó utilizando el siguiente programa de amasado y lavado: 20 segundos de mezclado y amasado seguido de un lavado con agua durante 5 min para eliminar los componentes solubles.

El gluten obtenido a través del procedimiento anterior retiene agua superficial, la cual debe ser eliminada por centrifugación. Para esto, se empleó una centrífuga 2015 a

6000 rpm durante 1 min. El porcentaje de *GH* se calculó en base al peso del gluten luego de la centrifugación (Ecuación 2.3). Posteriormente, el mismo gluten pesado para obtener el valor de gluten húmedo fue secado mediante el empleo de un Glutork 2020 (constituido por dos planchas calientes), durante 4 min a temperaturas por encima de los 150 °C, y pesado para la determinación del porcentaje de *GS* (Ecuación 2.4).

Adicionalmente, la técnica permite obtener el valor de gluten index (*GI*), un parámetro relacionado con la calidad de las gluteninas. Para esto, la centrífuga usada en la obtención de *GH* está provista de soportes cribados, que es donde se coloca el gluten obtenido tras el lavado en el Glutomatic. Este diseño permite determinar gravimétricamente la proporción de gluten que atraviesa la placa cribada y la que no lo hace tras el centrifugado. En general, cuando un gluten es muy fuerte, la mayor parte del él queda retenido del lado de la placa cribada donde fue colocado. En cambio, si el gluten es débil, parte de él atraviesa la placa. El *GI* se calcula entonces según la Ecuación 2.5.

$$GH (\%) = \frac{peso \ gluten \ húmedo \ total \ (g) \times 860}{100 - \% \ humedad \ harina}$$
Ecuación 2.3  

$$GS (\%) = \frac{peso \ gluten \ seco \ total \ (g) \times 860}{100 - \% \ humedad \ harina}$$
Ecuación 2.4  

$$GI = \frac{peso \ gluten \ que \ atraviesa \ la \ placa \ (g) \times 100}{peso \ gluten \ húmedo \ total \ (g)}$$
Ecuación 2.5

#### Todas las determinaciones se llevaron a cabo, al menos, por duplicado.

#### 2.1.3.4. Medida del tamaño de los gránulos de almidón por difracción láser

La determinación por difracción láser o dispersión estática de la luz permite obtener las distribuciones de tamaño de partículas suspendidas en un medio líquido. Para esto, el sistema se sirve de un láser que incide sobre una suspensión de partículas (Figura 2.2). La dispersión de la luz generada por las partículas que se interponen en el camino del láser producirá un patrón angular de mayores o menores intensidades dependiendo del tamaño de cada partícula (Figura 2.3). Si se conocen el índice de difracción y la absorción de las partículas estudiadas, entonces los patrones de intensidad de difracción obtenidos serán característicos para cada tamaño de partícula. De esta forma, el sistema es capaz de traducir cada patrón medido a valores de tamaño y generar la distribución deseada (McClements, 1999; Malvern Instruments Ltd., 2007).



Figura 2.2. Esquema de funcionamiento de un difractómetro láser (Diseño: Arp, adaptada de McClements, 1999)



Figura 2.3. Esquema de los patrones de difracción generados por partículas de diferente tamaño (adaptada de McClements, 1999)

La distribución de tamaños de partícula de los gránulos de almidón de la harina de trigo y del almidón resistente fueron medidos con un analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Los gránulos de almidón de la harina de trigo fueron extraídos recolectando el agua de lavado obtenida durante las determinaciones de gluten de la harina (Sección 2.1.3.3). El agua de lavado se dejó secar a temperatura ambiente disponiéndola en una capa muy fina sobre soportes plásticos, para así obtener el almidón seco.



como %Volumen (rojo) y como %Acumulado (azul) (diseño: Arp)

Los almidones fueron posteriormente suspendidos en agua (10%, p/p) previo a la realización de las medidas. Luego, aproximadamente 1 ml de cada suspensión fue agregado al baño de agua agitado para atravesar el sistema de medición del equipo. Los índices de refracción utilizados para el agua y el almidón fueron 1,33 y 1,52, respectivamente. El oscurecimiento se mantuvo en el rango entre 12% y 14% para todas las medidas. El tamaño de los gránulos fue evaluado en términos del 10<sup>mo</sup> percentil (D(0,1)), el 50<sup>mo</sup> percentil o mediana (D(0,5)), el 90<sup>mo</sup> percentil (D(0,9)), la media del momento de volumen o diámetro de De Broucker (D[4,3]) y el área superficial específica, los cuales fueron obtenidos a partir de la distribución de volúmenes (Figura 2.4). La determinación fue realizada al menos por duplicado.

#### 2.1.3.5. Ensayos con viscoamilógrafo rápido (RVA)

Las propiedades térmicas de empaste (*pasting*) de la harina de trigo, el almidón resistente y las premezclas se estudiaron a través de un viscoamilógrafo rápido RVA 4500 (Perten Instruments, Australia) según el método AACC 76-21.01 (1999). Para esto, se pesaron 3,50 g de harina (o 3,00 g de almidón), se trasvasaron al recipiente de

medida y se agregaron 25,0 ± 0,1 ml de agua destilada (tanto el peso de la muestra como la cantidad de agua a agregar se corrigieron en base a un 14% de humedad). Se colocó el agitador sumergido en la suspensión, agitándolo vigorosamente hacia arriba y abajo 10 veces, y luego el recipiente fue colocado en la posición de trabajo del equipo. Se utilizó un ciclo de calentamiento y enfriamiento siguiendo un protocolo térmico estandarizado. Este incluyó una etapa de termostatización (50 °C) y homogeneización (960 rpm) de la muestra. El ensayo continuó con calentamiento a 50 °C (1 min 10 s) con agitación a 160 rpm (velocidad utilizada hasta finalizar el ensayo). Luego se aplica una rampa de temperatura hasta 95 °C (3 min 32 s) seguida de una etapa isotérmica durante 2 min 30 s, finalizando con una rampa de enfriamiento hasta 50 °C (3 min 48 s), la cual se mantiene durante 2 min más (tiempo total = 13 min).

Las propiedades de empaste de las suspensiones se caracterizaron mediante los siguientes parámetros (Figura 2.5):



Figura 2.5. Ejemplo del perfil viscoamilográfico con indicación de los parámetros y rampa de calentamiento-enfriamiento utilizada (diseño: Arp)

- Temperatura de empaste (T<sub>e</sub>): temperatura a la cual comienza el aumento de la viscosidad debido al hinchamiento de los gránulos de almidón.
- Tiempo de empaste (t<sub>e</sub>): tiempo en el cual da comienzo el aumento de la viscosidad.
- Viscosidad de pico (η<sub>p</sub>): viscosidad máxima alcanzada durante el calentamiento isotérmico a 95 °C, relacionada con la capacidad del almidón para ligar agua.
- Viscosidad mínima (η<sub>min</sub>): viscosidad mínima registrada durante la etapa isotérmica a 95 °C, relacionada con la tolerancia del almidón al esfuerzo ejercido por la agitación.
- Viscosidad final ( $\eta_f$ ): viscosidad registrada al final del enfriamiento a 50 °C, relacionada con la capacidad de gelificación del almidón.
- Inestabilidad: definida como la diferencia entre  $\eta_p$  y  $\eta_{min}$ , se relaciona con la capacidad del almidón para resistir el calentamiento y el esfuerzo de corte.
- Asentamiento 1 (setback): definido como la diferencia entre  $\eta_f y \eta_{min}$ .
- Asentamiento 2: definido como la diferencia entre  $\eta_f y \eta_p$ , ambos asentamientos están relacionados con la tendencia a la retrogradación del almidón.

#### 2.1.3.6. Transiciones térmicas de las materias primas

La mayoría de los macrocomponentes que conforman un alimento (proteínas, lípidos y polisacáridos como el almidón) son susceptibles a sufrir diversas transiciones cuando son sometidos a cambios de temperatura. Los procesos como la cocción, refrigeración o congelación son ejemplos comunes en los cuales estos fenómenos pueden tener lugar. Las transiciones más típicas en estos sistemas son la desnaturalización de las proteínas, fusión o cristalización de lípidos y/o gelatinización de los gránulos de almidón. Usualmente estos fenómenos implican intercambios energéticos con el entorno debido a que ocurren reestructuraciones de los enlaces que estabilizan a las moléculas (procesos entálpicos). A su vez, estas transiciones pueden ocurrir ya sea liberando calor (transiciones exotérmicas) o absorbiéndolo (transiciones endotérmicas). Otros fenómenos que pueden darse en los alimentos al ser procesados térmicamente son reacciones químicas entre sus componentes, volatilización de compuestos, transiciones vítreas, entre otros (Gabbott, 2008; MacNaughtan, 2008).

La técnica más ampliamente utilizada para estudiar todos estos cambios es la calorimetría diferencial de barrido (DSC por las siglas en inglés de *Differential Scanning Calorimetry*). Como su nombre lo indica, la técnica se basa en someter simultáneamente a la muestra problema y a una muestra de referencia a un barrido de temperatura, entregando un flujo de calor a cada una de manera que la diferencia de temperatura entre ambas sea nula. Cuando la muestra problema sufre transiciones térmicas, el equipo deberá entregarle menor o mayor flujo de calor dependiendo de si las transiciones son exotérmicas o endotérmicas, respectivamente, para mantener la temperatura igual entre muestra y referencia. Esto se cumple siempre que la referencia utilizada no sufra transición alguna en el rango de temperaturas ensayado. El equipo detecta y registra estas menores o mayores necesidades de flujo de calor para generar el termograma correspondiente, es decir, una curva de flujo de calor en función de la temperatura (Gabbott, 2008).

A partir de los termogramas es posible extraer información acerca de las transiciones que tienen lugar en la muestra problema. En general, cuando las transiciones son de naturaleza endo o exotérmicas, se evidencian en forma de picos o valles en el termograma. En estos casos es útil conocer la temperatura a la cual comienza la transición (temperatura de inicio o T<sub>i</sub>), la temperatura a la cual la transición ocurre en su mayor extensión (temperatura de pico/valle o T<sub>p</sub>) y la temperatura a la cual la transición finaliza (temperatura final o T<sub>f</sub>). Otra información clave a la hora de analizar las transiciones es la cantidad de energía que está involucrada en el proceso (diferencia de entalpía o  $\Delta$ H), la cual puede calcularse como la integral del flujo de calor en función del tiempo del pico o valle correspondiente a la transición (Figura 2.6).

Para estudiar el comportamiento térmico del almidón de la harina y el almidón resistente se prepararon, separadamente, suspensiones del almidón extraído de la harina y del almidón HM en agua destilada (1:3, agua:almidón). Aproximadamente 10,00 mg de estas suspensiones fueron colocados en cápsulas de aluminio recubiertas (TA Instruments, Estados Unidos) y cerradas herméticamente con una prensa para tal fin. Para la realización de los ensayos se empleó un calorímetro diferencial de barrido Q100 (TA Instruments, Estados Unidos). Las muestras se evaluaron en un rango de temperatura que fue desde los 5 °C hasta los 140 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para la estabilización térmica previa al comienzo de la rampa de temperatura se emplearon isotermas de 5 min a 5 °C. Todas las muestras se corrieron al menos por triplicado.



Figura 2.6. Representación de un termograma con un pico y un valle, y sus respectivos parámetros térmicos (diseño: Arp)

#### 2.1.3.7. Composición proximal

El contenido de proteínas, lípidos, humedad, cenizas, fibra dietaria y carbohidratos en las materias primas fueron determinados según los siguientes métodos.

#### 2.1.3.7.1. Contenido de proteínas

Mediante el método de Kjeldahl con la modificación del ácido bórico (AACC 46-12.01) se obtuvo el contenido de nitrógeno total de las harinas y los almidones, los cuales se convirtieron a contenido de proteína bruta empleando el factor de conversión de N a proteína para cereales (5,7). Para esto, se utilizó un equipo semiautomático Büchi K350 (Suiza). Se pesó con exactitud aproximadamente 1 g de muestra en balanza analítica. Se colocó en un tubo de digestión/destilación de Kjeldahl y se agregaron H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% p/p, mezcla de las sales CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (en proporción 1:10) y plato poroso para su digestión en un digestor. En esta etapa toda la materia orgánica es combustionada sirviéndose del fuerte poder oxidante del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y las altas temperaturas. El carbono orgánico es eliminado en forma de CO<sub>2</sub> y el nitrógeno permanece solubilizado en forma de NH4<sup>+</sup> en el medio ácido del ácido sulfúrico. Posteriormente, el digerido se diluyó con agua destilada en proporción 1:2, y se destiló en un equipo destilador previa alcalinización con NaOH 32% p/p. La alcalinización del digerido permite la volatilización del nitrógeno en la forma de NH<sub>3</sub>. El NH<sub>3</sub> destilado se recogió en un Erlenmeyer conteniendo H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4% p/p e indicador de pH combinado Mortimer (solución alcohólica de rojo de metilo y verde de bromocresol). El medio ácido del ácido bórico permite nuevamente la solubilización del NH3 en la forma protonada. Así, el color rojizo inicial del indicador en la solución de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> se torna azulado durante la destilación. Para cuantificar el contenido de nitrógeno recogido durante la destilación se realizó una titulación ácido-base con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N valorado. El cálculo del porcentaje de proteínas se realizó según la Ecuación 2.6. En paralelo a cada determinación se corrió un blanco. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

$$Proteinas (g/100g) = \frac{(V_m - V_b) \times N \times F_{N \to P} \times Peq_N}{m} \times 100$$
 Ecuación 2.6

donde  $V_m$  es el volumen de titulante necesario para titular la muestra (en L),  $V_b$  es el volumen de titulante empleado para titular el blanco (en L), N es la normalidad del titulante (en eq/L),  $F_{N \to P}$  es el factor de conversión de nitrógeno a proteínas,  $Peq_N$  es el peso equivalente del N (en g/eq) y *m* es la masa de muestra (en g).

# 2.1.3.7.2. Contenido de lípidos

El contenido de lípidos se obtuvo siguiendo el método de lípidos totales para harinas, panes y productos horneados basados en cereales sin fruta (AACC 30-10.01). El método consistió en realizar una hidrólisis ácida de las muestras en vasos de precipitado con una solución de HCl 25% p/p en un baño de agua entre 70 y 80 °C durante 50 min para liberar los lípidos que pudieran estar asociados a proteínas o carbohidratos. Posteriormente se trasvasó el contenido de los vasos a probetas graduadas con tapón y se realizaron lavados cuantitativos con dos porciones de 5 ml de alcohol. Luego se agregaron 50 ml de éter de petróleo (rango de ebullición = 35-60 °C), se taparon las probetas y se agitaron vigorosamente por 30 s. Las probetas se dejaron reposar hasta el día siguiente, momento en el cual se midió el volumen de la fase etérea (*V<sub>fe</sub>*). Para la cuantificación de los lípidos se tomaron alícuotas de la fase etérea con pipeta de doble aforo y se depositaron en vasos de precipitado previamente pesados. Se evaporó el éter de cada vaso con ayuda de una placa calefactora (sin permitir ebullición visible) hasta peso constante del vaso conteniendo los residuos lipídicos a temperatura ambiente. El cálculo del porcentaje de lípidos en la muestra se calculó como se indica en la Ecuación 2.7. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

$$Lipidos (g/100g) = \frac{V_{fe} \times R}{Al \times m} \times 100$$
 Ecuación 2.7

donde  $V_{fe}$  es el volumen de la fase etérea (en ml), R es el peso del residuo lipídico luego de la evaporación del éter (en g), Al es el volumen de la alícuota (en ml) y m es la masa de la muestra (en g).

#### 2.1.3.7.3. <u>Humedad</u>

El contenido de humedad se determinó por secado en estufa hasta peso constante. Para esto, se registró el peso de cristalizadores de vidrio en balanza analítica y, sobre ellas, se pesaron con exactitud aproximadamente 3 g de muestra por triplicado. Cada placa fue cubierta con papel aluminio perforado y llevada a estufa eléctrica (San Jor, Argentina) a 105 °C. Luego del secado, las placas se trasladaron a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y, posteriormente, se pesaron. El cálculo de la humedad de las muestras se realizó según la Ecuación 2.8.

Humedad 
$$(g/100g) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_3)} \times 100$$
 Ecuación 2.8

donde  $m_1$  es la masa de la placa con la muestra (en g),  $m_2$  es la masa de la placa con la muestra luego del secado (en g) y  $m_3$  es la masa de la placa sin muestra (en g).

#### 2.1.3.7.4. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó según el método AACC 08-01.01. Para esto, unos 3 g de muestra fueron pesados con exactitud en balanza analítica sobre cápsulas de porcelana anchas previamente pesadas. Se utilizó un mechero, trípode y triángulo de pipas para carbonizar completamente la muestra y así evitar su ignición en la etapa de calcinación. Una vez carbonizadas, las cápsulas fueron colocadas en una mufla (Hornos Eléctricos S.A., Argentina) y calcinadas a 550 °C hasta obtención de cenizas de color gris claro uniforme. El cálculo del porcentaje de cenizas de la muestra se realizó según la Ecuación 2.9.

Cenizas 
$$(g/100g) = \frac{m_1 - m_2}{m_3 - m_2} \times 100$$
 Ecuación 2.9

donde  $m_1$  es el peso de la cápsula conteniendo los residuos de cenizas tras la calcinación (en g),  $m_2$  es el peso de la cápsula vacía (en g) y  $m_3$  es el peso de la cápsula con la muestra (en g). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

# 2.1.3.7.5. Contenido de fibra dietaria total

Se determinó el contenido de fibra dietaria total mediante el método enzimáticogravimétrico AACC 32-05.01, empleando el kit Total Dietary Fiber Kit Assay (Megazyme U.C., Irlanda). El método consistió en pesar con exactitud, por duplicado, 1 g de muestra en vasos de precipitado de cuello alto (de tipo Berzelius) de 500 ml. Se adicionaron 50 ml buffer fosfato (0,08 M; pH 6,0) a cada vaso y tras verificar pH 6,0 ± 0,1 se adicionaron 50 µl de solución de α-amilasa termoestable. Los vasos fueron cubiertos con papel aluminio e incubados en un baño a ebullición durante 30 min, aplicando agitación manual cada 5 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los vasos fueron enfriados a temperatura ambiente y su contenido se llevó a pH 7,5 ± 0,1. Se adicionaron 100 µl de solución de proteasa, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron en un baño a 60 °C con agitación orbital durante 30 min. Luego de esta incubación los vasos se volvieron a enfriar a temperatura ambiente y su contenido se llevó a pH 4,5 ± 0,2. Se añadieron 200 µl de solución de amiloglucosidasa y se incubaron nuevamente a 60 °C con agitación orbital y cubiertos con papel aluminio durante otros 30 min. Luego de esta incubación se adicionó alcohol 96º precalentado a 60 °C en cantidad necesaria para alcanzar una relación 4:1 de alcohol respecto al contenido del vaso (aproximadamente 225 ml de alcohol para cada vaso). Los vasos se cubrieron nuevamente con papel aluminio y se dejaron decantar los precipitados generados durante al menos 60 min. Una vez transcurrido este tiempo, se filtró el contenido de los vasos sobre crisoles con vidrio fritado (tamaño de poro entre 40-60 µm y conteniendo una capa de Celite como lecho filtrante) previamente pesados y utilizando una bomba de vacío Numak BVD-001 (Zelián S.A., Argentina). Los crisoles conteniendo el residuo de fibra fueron secados en estufa a 105 °C hasta peso constante. Los pesos de los residuos fueron registrados y corregidos descontando sus contenidos de cenizas (método 08-01.01) y proteínas (método 46-12.01). Con estos datos, el contenido de fibra dietaria total se calculó según la Ecuación 2.10.

Fibra Dietaria Total 
$$(g/100g) = \frac{[(R_1 + R_2)/2] - Prot - Cen}{[(m_1 + m_2)/2]} \times 100$$
 Ecuación 2.10

donde  $R_1$  y  $R_2$  son los pesos de los residuos provenientes de las muestras 1 y 2,  $m_1$  y  $m_2$  son los pesos de las muestras 1 y 2, y *Prot* y *Cen* son los pesos de las proteínas y las cenizas, respectivamente, contenidas en los residuos correspondientes. Todas las determinaciones fueron realizadas el menos por duplicado.

#### 2.1.3.7.6. <u>Contenido de carbohidratos</u>

Se calculó el contenido de carbohidratos diferentes de fibra por diferencia mediante la Ecuación 2.11.

*Carbohidratos* 
$$(g/100g) = 100 - (\%H + \%P + \%L + \%C + \%F)$$
 Ecuación 2.11

donde *%H*, *%P*, *%L*, *%C* y *%F* son los contenidos de humedad, proteína, lípidos, cenizas y fibra dietaria total, respectivamente.

# 2.2. Formulación y estudio de las masas panarias

# 2.2.1. <u>Preparación de las muestras de masa</u>

Las masas se prepararon usando una amasadora planetaria (Kenwood, Italia) provista de un gancho amasador. Las premezclas fueron mezcladas en seco a la menor velocidad (52 rpm) en el contenedor de la amasadora durante 1 minuto. Para cada premezcla se utilizó el correspondiente valor de absorción farinográfica de agua como el valor óptimo de agua a ser agregado en la preparación, y el parámetro de tiempo de desarrollo farinográfico como tiempo de amasado. Se utilizó agua fría (4 °C) para evitar un aumento excesivo de la temperatura durante el amasado (Cauvain y Young, 2008). El agua fue adicionada durante el primer minuto, y luego la velocidad se elevó a 89 rpm hasta completar el tiempo total de amasado. Una vez formada, la masa se cubrió con un film y se dejó reposar durante 10 min antes de cada ensayo. En estas preparaciones no se utilizó levadura para así evitar posibles cambios durante la ejecución de los ensayos. Cada formulación fue preparada por duplicado.

# 2.2.2. Determinación del contenido de gluten de las premezclas

El contenido de gluten húmedo y seco en las premezclas se realizó de forma similar a la mencionada en la Sección 2.1.3.3 con la salvedad de que se adoptaron las modificaciones introducidas por Correa, Añón, Pérez, y Ferrero (2010). Para esto, la preparación de las masas se llevó adelante fuera de la cámara de mezclado-lavado del Glutomatic debido a que los tiempos de amasado configurados en el equipo no fueron suficientes para obtener una red de gluten desarrollada. Así, 15,0 ± 0,1 g de cada masa ya preparada fueron colocados en la cámara del Glutomatic para realizar exclusivamente el procedimiento de lavado.

Los parámetros *GH*, *GS* y *GI* fueron calculados según la Ecuación 2.3, Ecuación 2.4 y Ecuación 2.5, respectivamente. Asimismo, se calcularon dos parámetros adicionales para evaluar el comportamiento del gluten en relación al agua. La diferencia *GH-GS*,

denominada WBC por las siglas en inglés de capacidad de absorción de agua (*Water Binding Capacity*), se utiliza para conocer la cantidad de agua asociada al gluten y, por el otro lado, la relación *GH/GS* permite evaluar posibles cambios en la afinidad del gluten por el agua.

#### 2.2.3. <u>Contenido de humedad</u>

La determinación del contenido de humedad de las masas panarias se realizó según el método descripto en la Sección 2.1.3.7.3. El contenido de humedad se calculó a través de la Ecuación 2.8. Las determinaciones se realizaron sobre muestras de dos masas preparadas de forma independiente. Las determinaciones se realizaron sobre dos masas preparadas independientemente, tomando muestras por triplicado de cada una.

#### 2.2.4. <u>Medidas de actividad acuosa (aw)</u>

La evaluación de la  $a_w$  fue realizada a 25 °C en un higrómetro AquaLab Series 4 (Decagon Devices Inc., Estados Unidos) utilizando contenedores plásticos para tal fin. Las porciones de masa evaluadas fueron lo suficientemente grandes como para cubrir toda la base del recipiente. Las medidas se obtuvieron sobre dos masas independientes tomando muestras por triplicado de cada una.

#### 2.2.5. <u>Determinación del pH de las masas</u>

La evaluación del pH de las masas panarias se realizó mediante potenciometría utilizando un electrodo de pH para muestras sólidas calibrado y un sensor de temperatura acoplados a un equipo de medición SevenMulti (Mettler Toledo GmbH, Suiza). Las medidas se realizaron por penetración de ambas sondas en tres zonas diferentes de cada masa independiente.

#### 2.2.6. Ensayos de reología fundamental

La reología estudia la deformación y el flujo de la materia. Su análisis tiene muchas aplicaciones en el campo de la ciencia y el desarrollo de los alimentos, ya que las características de los materiales empleados en su producción influirán en el procesamiento, manipulación y aceptabilidad de los mismos. En el caso de las masas panarias, la reología es gran importancia para detectar potenciales problemas previo a la panificación y/o predecir si las mismas permitirán la obtención de productos de buena calidad panadera (Bourne, 2002). Los estudios reológicos de pequeña amplitud son muy sensibles a la composición química de los materiales ya que, si se produce una modificación de las interacciones presentes en la muestra, éstas influirán en su comportamiento reológico.

# 2.2.6.1. Ensayos oscilatorios de pequeña amplitud

El caso particular de los ensayos de reología oscilatoria constituye una excelente herramienta para caracterizar materiales viscoelásticos: aquellos que no son sólidos o líquidos en sentido estricto, sino que presentan características intermedias. El empleo de reómetros de esfuerzo controlado, equipos especializados en el estudio de la reología, permite la medición de la respuesta dada por la muestra (deformación,  $\gamma$ ) ante la aplicación de pequeños esfuerzos de corte ( $\sigma$ ) armónicos variables, generalmente sinusoidales. Mediante el registro de la deformación, el equipo calcula diferentes parámetros que permiten caracterizar a los materiales. Los dos parámetros más empleados son el módulo elástico o de almacenamiento (G') y el módulo viscoso o de pérdida (G''). El primero representa la componente elástica del material cuando le es aplicado el esfuerzo de corte. El segundo representa, en cambio, a la componente viscosa de esa respuesta. Ambos módulos son dependientes de la frecuencia ( $\omega$ ) de los esfuerzos de corte aplicados y se relacionan entre sí a través de otros dos parámetros: el módulo complejo ( $G^*$ ) y la tangente del ángulo de fase (tan  $\delta$ ).

$$G' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right) \cos \delta$$
 Ecuación 2.12

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0}\right) \operatorname{sen} \delta$$
 Ecuación 2.13

$$G^* = \sqrt[2]{(G')^2 + (G'')^2}$$
 Ecuación 2.14

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$
 Ecuación 2.15

donde  $\sigma_0$  es el esfuerzo máximo aplicado,  $\gamma_0$  es la deformación máxima alcanzada y  $\delta$  es el ángulo de fase entre la respuesta y la perturbación aplicada.

Como se puede observar a partir de la Ecuación 2.12 y la Ecuación 2.13, es posible interpretar que  $G'\gamma_0$  se encuentra en fase con  $\sigma_0$ , mientras que  $G''\gamma_0$  está desfasada en 90° respecto a  $\sigma_0$ . Esto implica que, para un sólido ideal, es decir, un material en el cual toda la energía aplicada como esfuerzo de corte es almacenada por el mismo, la deformación y el esfuerzo de corte están en fase (Figura 2.7a).

En este caso, se cumple que:

$$Para \ \delta = 0^{\circ} \ \rightarrow \cos \delta = 1 \ \therefore \ G' \gamma_0 = \ \sigma_0$$
$$Para \ \delta = 0^{\circ} \ \rightarrow \sin \delta = 0 \ \therefore \ G'' \gamma_0 = 0$$

Por el contrario, en el caso de un líquido ideal, que es un material cuya energía aplicada por un esfuerzo de corte es disipada totalmente por fenómenos de fricción (viscosidad), la deformación y el esfuerzo de corte están desfasados en 90° (Figura 2.7b).

En este caso, se cumple que:

$$Para \ \delta = 90^{\circ} \ \rightarrow \cos \delta = 0 \ \therefore \ G' \gamma_0 = 0$$

$$Para \ \delta = 90^{\circ} \ \rightarrow \operatorname{sen} \delta = 1 \ \therefore \ G'' \gamma_0 = \ \sigma_0$$



Figura 2.7. Interpretación del ángulo de fase ( $\delta$ ) entre el esfuerzo de corte aplicado ( $\sigma$ ) y la deformación producida ( $\gamma$ ) en a) un sólido ideal y b) un líquido ideal (diseño: Arp)

Para el caso de los materiales viscoelásticos que presentan características intermedias entre ambos extremos, el ángulo de fase se ubicará en una posición intermedia entre 0° y 90°, presentando el material una componente de cada módulo (Steffe, 1996).

Para que estas ecuaciones puedan aplicarse al estudio de los materiales, los esfuerzos de corte aplicados deben ser lo suficientemente pequeños como para evitar la disrupción microestructural de la matriz viscoelástica. Así, se denomina rango de viscoelasticidad lineal (RVL) al espectro de amplitudes de deformación en el cual la microestructura se mantiene intacta, ya que en estas condiciones la respuesta del material no depende de la magnitud de la deformación aplicada (Steffe, 1996). Una forma de asegurarse que los ensayos reológicos se llevarán adelante en esta región de comportamiento lineal es registrando los valores de *G'* y *G''* mientras se aplican esfuerzos de corte de amplitud creciente a una frecuencia constante. Para la mayoría de los materiales existirá un  $\sigma_{crítico}$  para el cual una amplitud mayor de deformación producirá una disrupción irreversible de la matriz, punto en el cual ya no se podrá considerar que el esfuerzo aplicado sea pequeño (Figura 2.8).



Figura 2.8. Ejemplo de un barrido de esfuerzos para la obtención del RVL (diseño: Arp)

Cuando se aplica a las muestras un esfuerzo de corte de amplitud constante dentro del RVL variando la frecuencia de oscilación y se registran los valores de G' y G'' en

función de ésta se obtienen los llamados espectros mecánicos (Figura 2.9). Estos espectros son útiles para caracterizar matrices viscoelásticas ya que distintos materiales presentarán diferentes tipos de espectros dependiendo de las contribuciones elásticas y viscosas que la muestra exhiba ante el esfuerzo aplicado. Por ejemplo, en soluciones diluidas de hidrocoloides, predomina el aporte viscoso y la muestra presenta un comportamiento cercano al de un líquido ideal (Figura 2.9a). En cambio, cuando se trabaja con soluciones de hidrocoloides más concentradas el comportamiento es dependiente de la frecuencia, observándose mayor contribución viscosa a bajas frecuencias, donde el material es capaz de fluir. Por el contrario, a frecuencias mayores, la incapacidad de las grandes macromoléculas para acomodarse ante las rápidas variaciones de deformación produce un aumento en contribución elástica y el material pierde fluidez (Figura 2.9b).

Otros materiales, en cambio, presentan una predominancia del aporte elástico sobre el aporte viscoso en todo el rango de frecuencias, siendo su comportamiento más próximo al de un sólido ideal. En general, en estos materiales ambos módulos tienen baja o nula dependencia con la frecuencia de la deformación. Estos materiales son denominados geles autoportantes y no son capaces de fluir (Figura 2.9c) (Steffe, 1996).



Figura 2.9. Espectros mecánicos típicos de a) soluciones diluidas de hidrocoloides, b) soluciones concentradas de hidrocoloides y c) geles autoportantes (adaptada de Steffe, 1996)

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Para la realización del estudio reológico de las masas panarias las muestras se prepararon como se menciona en la Sección 2.2.1 y fueron evaluadas en un reómetro Haake RS600 (Thermo Science, Alemania) equipado con un sistema de platos paralelos rugosos de 30 mm de diámetro (Figura 2.10). Las sondas fueron ubicadas de tal manera que el espacio para colocar la muestra fuera de 1,5 mm de espesor. Para realizar el ensayo, se prepararon discos de masa de 30 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Se realizaron barridos de deformación entre 0,5 y 200 Pa a frecuencia constante de 1 Hz para la determinación del rango de viscoelasticidad lineal (RVL). Una vez determinado el RVL, seis discos fueron evaluados mediante un protocolo de barrido de frecuencias entre 0,005 y 100 Hz con una amplitud de deformación constante de 5 Pa (dentro del RVL) para obtener los espectros mecánicos. Antes del comienzo de cada ensayo, todas las muestras fueron cubiertas con vaselina líquida para evitar la deshidratación de las masas por sus laterales, y se las dejó reposar 15 min en la posición de medida para su relajación y termostatización a 25 °C. Se analizaron los valores del módulo de almacenamiento (*G'*), módulo de pérdida (*G''*) y la tangente del ángulo de fase (tan  $\delta$ ).



Figura 2.10. a) Reómetro RheoStress RS600, b) sondas de tipo platos paralelos rugosos de 30 mm y c) sistema ensamblado

Ambos módulos fueron ajustados a la ecuación de la ley de la potencia logarítmicamente linealizada (Ecuación 2.16 y Ecuación 2.17).

$$\log G'(\omega) = \log a + n \log \omega$$
 Ecuación 2.16  
$$\log G''(\omega) = \log b + m \log \omega$$
 Ecuación 2.17

donde  $\omega$  es la frecuencia en Hz.

El análisis de los espectros mecánicos a través de estas ecuaciones permite realizar comparaciones en el comportamiento viscoelástico de las muestras. Las pendientes (*n* o *m*, según corresponda) pueden interpretarse como una medida de la dependencia de cada módulo correspondiente (*G*' o *G*'') con la frecuencia ( $\omega$ ). Pendientes cercanas a 0 indicarían independencia del módulo respecto a  $\omega$ , mientras que pendientes de mayor valor sugieren que tal dependencia es significativa. Asimismo, el análisis de las ordenadas al origen (log *a* ó log *b*) permite comparar el comportamiento viscoelástico de las muestras, ya que valores mayores de estas ordenadas evidencian mayor comportamiento elástico o viscoso, según corresponda.

### 2.2.7. Ensayos de reología empírica

#### 2.2.7.1. Ensayos de relajación

Otro ensayo empírico capaz de ser realizado mediante el empleo de un analizador de textura es el ensayo de relajación. Este experimento permite la caracterización del comportamiento viscoelástico de un material cuando es sometido a un esfuerzo constante y estático de gran amplitud. El comportamiento adoptado por el material ante este tipo de perturbación será diferente dependiendo de la naturaleza reológica de la muestra. Un sólido ideal opondrá un esfuerzo constante y de magnitud proporcional a la amplitud de la deformación aplicada sobre él durante todo el tiempo que esta deformación tenga lugar. Por el contrario, un material de naturaleza líquida ideal disipará instantáneamente y en forma de calor toda la energía que le fue aplicada para deformarlo (relajación instantánea).

Los materiales viscoelásticos, en cambio, mostrarán un comportamiento intermedio entre ambos extremos, exhibiendo una relajación gradual del esfuerzo a lo largo del tiempo. Como se mencionó para el caso de los ensayos reológicos de pequeña amplitud, el comportamiento de un material viscoelástico puede ser desglosado en una componente elástica y una componente viscosa. Si el comportamiento elástico es predominante, el material disipará parte de la energía que le fue aplicada para deformarlo en forma de calor, pero tendrá capacidad para almacenar la energía restante. Por lo tanto, el esfuerzo que opondrá el material ante la deformación alcanzará un nivel de equilibro intermedio entre los exhibidos por un sólido ideal o un líquido ideal. Por el contrario, si lo que predomina es el comportamiento viscoso, el material disipará gradualmente toda la energía aplicada y el esfuerzo que opone a la deformación decaerá hasta 0 luego de cierto tiempo (Figura 2.11).



Figura 2.11. Ejemplo de perfiles de relajación para materiales de diferente comportamiento reológico (adaptada de Steffe, 1996)

Para el desarrollo de estos experimentos, discos de masa preparados como en la sección anterior se sometieron a una compresión hasta un 40% de la altura original de

la muestra durante 20 minutos. Se empleó una sonda cilíndrica plana de 75 mm de diámetro (P/75) equipada en un analizador de textura TA.XT2i y se obtuvieron curvas de esfuerzo en función del tiempo (curvas de relajación).

Las curvas de relajación fueron ajustadas al modelo exponencial de Maxwell (Ecuación 2.18).

$$\varepsilon(x) = \left(\sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i e^{-x/t_i}\right) + \varepsilon_e$$
 Ecuación 2.18

donde  $\varepsilon$  (*x*) es el esfuerzo (obtenido como la relación entre la fuerza aplicada sobre la muestra y el área de ésta, en Pa),  $\varepsilon_i$  representa el esfuerzo de decaimiento del elemento *i* de Maxwell, *x* es el tiempo (en s), *t*<sub>i</sub> es el tiempo de relajación del elemento *i* de Maxwell y  $\varepsilon_e$  es el esfuerzo de equilibrio alcanzado por la muestra tras un tiempo *x*  $\rightarrow \infty$  (Figueroa, Manuel, Hernández-Estrada, y Ramírez-Wong, 2012).

En este modelo, el número de términos de la sumatoria representa el número de elementos de Maxwell que componen un sistema. Los modelos comúnmente empleados para explicar el comportamiento de materiales viscoelásticos son el modelo de Maxwell, que consta de un arreglo en serie de un resorte y un amortiguador (Figura 2.12a), y el modelo de Kelvin que presenta los mismos componentes con un arreglo en paralelo (Figura 2.12b).



Figura 2.12. Modelos de relajación de a) Maxwell y b) Kelvin (adaptada de Steffe, 1996)
El modelo tiene en cuenta un componente elástico ideal cuyo comportamiento sigue la Ley de Hooke (Ecuación 2.19):

$$\varepsilon = E\gamma$$
 Ecuación 2.19

donde  $\varepsilon$  es el esfuerzo (en N/m<sup>2</sup>), E es el módulo elástico de una compresión uniaxial y  $\gamma$  es la deformación relativa; y un componente viscoso ideal que se comportan según la Ley de Newton (Ecuación 2.20):

$$\varepsilon = \mu \dot{\gamma}$$
 Ecuación 2.20

donde  $\varepsilon$  es el esfuerzo de corte,  $\mu$  es el coeficiente de viscosidad y  $\dot{\gamma}$  es el gradiente de velocidad.

### 2.2.7.2. Análisis del perfil de textura (TPA)

El análisis de perfil de textura, conocido comúnmente como TPA por las siglas en inglés de *Texture Profile Analysis*, es un ensayo reológico empírico en el cual se aplican grandes deformaciones al material, registrando tanto la distancia que recorre la sonda como la resistencia que ofrece la muestra ante la deformación. Con estos datos se construyen curvas de fuerza vs. tiempo (perfiles de textura) que permiten caracterizar a las muestras a partir de la extracción y cálculo de diferentes parámetros. Dado que es una técnica empírica, es crítico cuidar que tanto la muestra como las condiciones de ensayo sean lo más similares posibles para asegurar la reproducibilidad y la validez de los datos obtenidos.

Un ensayo de TPA típico implica la compresión de una muestra en dos ciclos consecutivos con el empleo de una sonda cilíndrica plana. La sonda desciende a velocidad constante, con su cara plana en forma perpendicular a la muestra, y la comprime hasta cierto porcentaje de su altura original (fijado por el usuario). Posteriormente la sonda asciende para dar comienzo a otro ciclo de compresión.

Un perfil típico se muestra en la Figura 2.13. Del mismo pueden extraerse los siguientes parámetros texturales:



Figura 2.13. Ejemplo esquemático de un perfil de textura típico para masas panarias (diseño: Arp)

- Dureza: es el valor máximo de fuerza que alcanza el pico, correspondiente al primer ciclo de compresión (D en la Figura 2.13).

- Consistencia: es la suma de las áreas bajo la curva de los picos positivos correspondientes a ambos ciclos de compresión (A1 + A2 + A4 + A5 en la Figura 2.13).

- Cohesividad: es la relación entre las áreas bajo la curva de los picos correspondientes al segundo y primer ciclo ((A4 + A5)/(A1 + A2) en la Figura 2.13).

- Adhesividad: es el área negativa correspondiente al ascenso de la sonda entre ambos ciclos de compresión (A3 en la Figura 2.13).

- Elasticidad: es la relación de distancias recorridas por la sonda para alcanzar los valores máximos de fuerza de los picos correspondientes al segundo y primer ciclo, respectivamente (L2/L1 en la Figura 2.13).

- Resiliencia: es la relación de las áreas bajo la curva luego y antes de alcanzar el valor máximo de fuerza del pico correspondiente al primer ciclo de compresión (A2/A1 en la Figura 2.13).

- Gomosidad: es el producto de los parámetros dureza y cohesividad.

Para la obtención de los perfiles, discos de masa de 30 mm de diámetro y 10 mm de espesor fueron sujetos a dos ciclos consecutivos de compresión hasta el 40% de su altura original utilizando una sonda circular plana P/75 (75 mm de diámetro) acoplada a un analizador de textura TA.XT2i. A partir de los perfiles de textura obtenidos se extrajeron los parámetros mencionados. Para cada muestra se evaluaron un total de 32 discos provenientes de 2 masas independientes.

# 2.2.8. <u>Medidas de tiempo de relajación por resonancia magnética nuclear de</u> protones (RMN-1H)

La espectrometría RMN es una de las mejores técnicas analíticas para la medición de las propiedades moleculares del agua, como lo es su movilidad en una matriz. En esta técnica, se aprovecha la propiedad de los núcleos con spin diferente de 0 de ser susceptibles a los campos magnéticos que los rodean. En el caso de la RMN-1H, la técnica emplea la aplicación de un campo magnético externo de gran magnitud para alinear a todos los protones presentes en la muestra en una posición de equilibrio de forma paralela al campo magnético aplicado (Figura 2.14a y b). Posteriormente, se aplican pulsos de una frecuencia determinada para inducir perturbaciones en la alineación de los spines, es decir, estos pulsos alteran la posición de equilibrio de los spines alineados al campo magnético externo (Figura 2.14c). Entonces, cuando se retira la influencia de los pulsos los spines tienden a volver a su estado de equilibrio alineándose nuevamente con el campo magnético (Figura 2.14d). A este proceso se lo denomina relajación y puede ser registrado por un espectrómetro. La relajación está compuesta por dos componentes: una a lo largo del eje z ( $T_1$  longitudinal o relajación spin-red) y otra a lo largo del plano xy ( $T_2$  transversal o relajación spin-spin).



Figura 2.14. Explicación esquemática de la RMN-1H (diseño: Arp)

Particularmente, el análisis de  $T_2$  se ha utilizado ampliamente como una aproximación para el estudio de la distribución y movilidad del agua en los alimentos. El espectrómetro es capaz de registrar las señales producto de la fluctuación de los protones en función del tiempo, y así construir curvas distribución de  $T_2$  (curvas de relajación). En estas curvas, las diferentes poblaciones de protones con mayor o menor movilidad representan diferentes componentes que conforman la totalidad de la señal. Aquellas poblaciones con mayor movilidad (por ejemplo, los presentes en las moléculas de agua libre) aportan a la señal a tiempos de relajación más largos, mientras que las de menor movilidad (por ejemplo, moléculas de agua que interactúan con la microestructura) contribuyen a la señal correspondiente a tiempos más cortos (McClements 2007). De estas curvas es posible extraer información acerca de la cantidad total de protones en la muestra (amplitud inicial de la señal), el número de entornos diferentes en los que se encuentran los protones (número de componentes que aportan a la señal) y la movilidad o extensión de las interacciones de los protones con su entorno (tiempos de decaimiento característicos para cada componente de la señal).

Para el análisis de estas curvas se emplean generalmente ecuaciones de tipo exponencial (Ecuación 2.21):

$$I = I_0 + \sum_{i=1}^{n} A_i e^{-x/T_{2i}}$$
 Ecuación 2.21

donde *I* es la intensidad de señal de la totalidad de los protones en la muestra y cada término de la sumatoria representa a una *i* población de protones en diferentes entornos (con *i* = 1, 2, 3... n). *I*<sub>0</sub> es la intensidad de la señal residual de decaimiento, *A<sub>i</sub>* representa a la proporción de protones que se encuentran en el entorno *i*, y  $T_{2i}$ representa el tiempo de relajación característica de la población *i*.

Se determinaron los tiempos de relajación spin-spin ( $T_2$ ) de <sup>1</sup>H con un espectrómetro de baja resolución MiniSpec pc120 (Bruker, Alemania) usando la secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con un espaciado de interpulsos de 200 µs. Para este propósito, las masas fueron preparadas por duplicado, y cada duplicado fue medido a su vez en tres tubos de vidrio para RMN diferentes. Además, cada tubo fue medido por triplicado, rotando su posición en 90° entre medidas consecutivas. Los tubos fueron preparados colocando porciones de masa, las que se presionaron usando una varilla de vidrio como émbolo para eliminar burbujas de aire.

#### 2.2.9. <u>Transiciones térmicas de la masa por DSC</u>

Para estudiar los fenómenos térmicos involucrados en el proceso de cocción de las masas panarias (horneado), aproximadamente 10,00 mg de las mismas fueron pesadas en cápsulas de aluminio y cerradas herméticamente para su análisis en un calorímetro Q100. Se emplearon las mismas condiciones de corrida descriptas para el análisis de las materias primas (Sección 2.1.3.6).

#### 2.2.10. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

#### 2.2.10.1. Preparación de la muestra

La técnica de microscopía SEM requiere que las muestras reúnan ciertas condiciones para realizar la observación. En primer lugar, las muestras deben estar deshidratadas, ya que la cámara de observación donde se colocan las mismas debe mantenerse con alto vacío. En estas condiciones y si la deshidratación de la muestra hubiese sido incompleta, el agua presente en ella podría volatilizar y formar canales de escape en la matriz, produciendo deformaciones en la estructura original. Por otro lado, una condición necesaria para la observación de muestras no conductoras es la metalización por pulverización catódica de la superficie de la misma con una fina capa de oro. Esta capa metálica es la que permite que el haz de electrones interaccione con la superficie de la muestra, habilitando así la observación de los electrones dispersados por ella (detección de electrones retrodispersados).

Con el objetivo de obtener una muestra en condiciones aptas para su observación, las masas panarias se sumergieron en glutaraldehído 2,5% v/v durante al menos una semana a 4 °C para fijar su estructura. Luego se realizó una deshidratación progresiva de cada masa con soluciones acuosas de acetona a concentraciones crecientes: 0%, 25%, 50%, 75% y 100% v/v. Cada porción de masa fue lavada tres veces durante 5 min con cada solución. Una vez concluido el tercer lavado con acetona 100% v/v, las muestras fueron inmediatamente colocadas en un secador por punto crítico Baltec PCD30 (Liechtenstein) para su completa deshidratación. Posteriormente, las muestras fueron finamente metalizadas con una capa de oro utilizando un metalizador Jeol Fine Coat Ion Sputter JFC1100 (Japón).

# 2.2.10.2. Observación microscópica

Una vez deshidratadas y metalizadas, las porciones de masa estuvieron listas para la observación de sus superficies de fractura en un microscopio SEM Jeol JSM-6360 LV (Japón). Se tomaron micrografías de diferentes campos a 160×, 300×, 600×, 650× y 1200× empleando un detector de electrones retrodispersados.

# 2.2.11. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

La microscopía ESEM es una técnica que se presenta como una mejora a la SEM convencional si lo que se busca es observar la muestra sin las distorsiones que suelen producir los tratamientos requeridos para SEM. Esto es así debido a que, a diferencia de lo que ocurre en SEM, no es requerida una preparación o manipulación exhaustiva de las muestras (deshidratación y metalizado), pudiéndose observar éstas de manera directa.

Las muestras de masa fueron montadas sobre un soporte metálico cóncavo para la observación directa de sus superficies en un microscopio ESEM FEI Quanta 200 utilizando una presión atmosférica de 4,14 torr a 10 °C. Se capturaron imágenes de diferentes campos a 600×, 1000×, 1200×, 2000× y 5000×. Las micrografías fueron adquiridas mediante el Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFi-LIMF) – Facultad de Ingeniería, UNLP, Argentina.

# 2.2.12. <u>Microscopía confocal láser de barrido (CSLM)</u>

La microscopía confocal láser de barrido (CSLM) es una herramienta esencial a la hora de estudiar sistemas biológicos. El desarrollo y empleo de una gran variedad de sondas ha permitido estudiar simultáneamente varias moléculas existentes en una misma muestra, pudiendo así evaluarse las interacciones entre ellas y el medio en el que están inmersas, sus conformaciones, ubicaciones en la muestra, etc. Además de esto, la técnica de CSLM permite realizar estas observaciones con una resolución vertical y horizontal mayor respecto a las microscopías ópticas convencionales, ya que emplea el principio de confocalidad para filtrar la fluorescencia proveniente de los planos focales distintos al que se esté observando mediante la utilización de diafragmas, logrando así imágenes de muy buena calidad (Figura 2.15).



Figura 2.15. Esquema del funcionamiento de un CSLM (adaptada de Claxton et al., 2006)

El hecho de utilizar luz láser implica que la pequeña sección que se busca observar sea iluminada con gran intensidad (tamaño del punto de iluminación entre 0,25 y 0,8  $\mu$ m), aumentando de esta forma la nitidez y el contraste (Figura 2.16) (Claxton, Fellers, y Davidson, 2006). A su vez, la técnica también permite adquirir imágenes en distintos planos del eje Z. Se pueden obtener entonces imágenes limpias de cada plano focal en una muestra, y luego reconstruir e integrar estas secciones en una sola imagen tridimensional nítida. Por otro lado, CSLM es una técnica que permite obtener imágenes de la microestructura de la muestra minimizando la alteración de la misma durante su preparación.

#### Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 2.16. Diferencia entre la iluminación de campo amplio y la iluminación láser de un CSLM (adaptada de Claxton et al., 2006)

#### 2.2.12.1. Preparación de la muestra

Muestras de extendidos de masa fueron teñidas de forma no covalente con soluciones acuosas de rodamina B (0,001%, p/v) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0,01%, p/v, en solución 0,005 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 0,01 mM de NaCl, pH 9) durante 60 min en condiciones de oscuridad.

#### 2.2.12.2. Observación de la muestra

Luego, los extendidos fueron observados en un microscopio confocal Olympus FV1000. Las longitudes de onda de excitación fueron 568 y 488 nm para rodamina B y FITC, respectivamente. A su vez, las longitudes de onda de emisión para rodamina B y FITC fueron de 625 y 518 nm, respectivamente. Se capturaron micrografías de las masas a 10× y 20×.

Las imágenes digitales obtenidas fueron procesadas y analizadas mediante el software de análisis de imágenes ImageJ 1.49p (National Institutes of Health, Estados Unidos) con el propósito de cuantificar la complejidad de la matriz proteica. Para esto, el canal correspondiente a la rodamina B fue seleccionado dado que representó un retrato más adecuado de la red proteica que el canal derivado del FITC. Las imágenes fueron procesadas a través de un filtro FFT para realizar correcciones sombreadas y suavizadas de los artefactos. Luego, se binarizaron las imágenes mediante el algoritmo de Otsu. Se utilizó la herramienta "*Fractal Box Count*" para cuantificar el número (*N*) del *r*-tamaño de cajas necesario para llenar las estructuras. La dimensión fractal (*DF*), un

parámetro que permite evaluar el grado de complejidad de una matriz de la matriz, fue calculada entonces con la Ecuación 2.22.

$$N(r) = \kappa * r^{-DF}$$
 Ecuación 2.22

donde *κ* es una constante.

# 2.3. Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón resistente

#### 2.3.1. Ensayos de fermentación

Se realizaron ensayos para obtener curvas de fermentación con el objetivo de optimizar los tiempos de levado y así prevenir el colapso de la masa durante la fermentación y/o el horneado. Para esto, las masas fueron preparadas como se menciona en las secciones anteriores, pero agregando 3% de levadura fresca y dejando que la masa repose 40 min, que es el tiempo que insume la realización de los diferentes procedimientos de la panificación antes de la etapa de levado. Luego, se tomaron 3 porciones de 50,0 g de las masas obtenidas, y cada una fue bollada a mano antes de colocarse en respectivas probetas graduadas. Se colocó un émbolo marcador sobre cada masa para facilitar la lectura de los volúmenes en la escala, y una tapa plástica sobre el borde superior de la probeta para minimizar la deshidratación de la masa durante el transcurso del ensayo. Las probetas fueron entonces llevadas a una cámara de fermentación (Brito Hermanos, Argentina) a 30 °C. Las curvas de fermentación fueron construidas registrando el incremento de volumen ( $\Delta V$ ) en el tiempo hasta alcanzar un valor máximo de equilibrio de  $\Delta V$  ( $\Delta V_{máx}$ ). Con el objetivo de evitar el colapso de la estructura por fermentación excesiva, los tiempos óptimos de levado fueron calculados como el tiempo en el cual la masa alcanza el 75% de  $\Delta V_{máx}$ . Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado.

# 2.3.2. Proceso de panificación

Para la preparación del pan tradicional, conocido en Argentina como "pan francés", la masa se preparó como en la Sección 2.2.1 utilizando levadura fresca en su elaboración. Para esto, la levadura fue suspendida en parte del agua a utilizar y se agregó junto con ésta. Una vez amasada, la masa fue reposada durante 10 min para permitir la relajación de su estructura. Luego del reposo, el bollo de masa fue dividido en dos mitades y cada una fue laminada 4 veces, haciéndola pasar entre los dos rodillos de acero inoxidable de una laminadora (Pastafácil, Argentina). Entre los pasos sucesivos de laminado, la masa fue plegada a la mitad y rotada 90°.



Figura 2.17. Esquema del proceso de panificación: a) peso de los ingredientes, b) mezcla de ingredientes secos, c) amasado, d) reposo, e) laminado, f) reposo de la masa laminada, g) división de las porciones, h) bollado, i) reposo previo al armado, j) piezas armadas, k) fermentación, l) piezas fermentadas, m) horneado, n-o) piezas obtenidas y p) corte del producto

Al final del cuarto pasaje, cada porción se dejó reposar nuevamente por 10 min. Luego, se dividieron en porciones de aproximadamente 90 g. Con cada porción se elaboraron bollos en forma manual y luego estos se dejaron reposar por otros 10 min antes de emplear un moldeador (MPZ, Argentina) para darle la forma de piezas de pan a los bollos. Una vez formadas, se realizaron dos pequeñas incisiones en la parte superior de cada pieza y se llevaron a una cámara a 30 °C para su levado. Los tiempos de fermentación utilizados fueron los obtenidos en los ensayos de fermentación. Posteriormente, las piezas ya leudadas fueron horneadas en un horno de convección (Ariston, Argentina) a 210 °C por 26 min (Figura 2.17).

#### 2.3.3. Calidad del pan fresco

Piezas de pan de un total de 8 panificaciones preparadas en 2 días fueron estudiadas para la evaluación de su calidad. Se realizaron los ensayos descriptos a continuación.

#### 2.3.3.1. Volumen específico de pan

El volumen específico de las piezas de pan, expresado como el volumen de desplazamiento de semillas de nabo (en ml) por gramo de pan, fue determinado (luego pesar las piezas) utilizando de un volumenómetro (CIDCA, Argentina) provisto de una columna graduada de 10,18 cm<sup>2</sup> de sección transversal (Figura 2.18). Se ensayaron 6 panes por cada panificación independiente, dando un total de 12 panes por formulación.



Figura 2.18. Volumenómetro de semillas para pan

# 2.3.3.2. Análisis del perfil de textura (TPA) de la miga

Uno de los parámetros de calidad más importantes para los consumidores es la textura del pan. Una simple presión con los dedos sobre una pieza de pan le sirve al consumidor para recabar mucha información acerca de la textura del producto. Ya sea consciente o inconscientemente, el consumidor puede percibir la firmeza, suavidad y elasticidad del pan, y hasta el grado de recuperación de la forma que tiene tras presionarlo. Todo esto puede ser determinante para que un potencial comprador adquiera o rechace un producto, dado que la percepción de su frescura está fuertemente ligada a cómo se siente al tacto. Se espera que un pan fresco y de buena calidad tenga una miga que, al presionarse, se sienta blanda y suave, que no se desmigaje (es decir, que sea cohesiva) y que al liberar la presión sea lo suficientemente elástica como para recuperar su forma. Por el contrario, una miga firme, desmoronable e incapaz de recuperar su estructura tras la presión, se asocia con productos envejecidos que ya han pasado cierto tiempo en góndola (Cauvain, 2015).

Los ensayos de TPA se han usado desde hace décadas para evaluar estas características en los panificados, ya que permiten obtener datos objetivos y reproducibles acerca de la textura de los productos. Como se mencionó en la sección 2.3.6.3, el ensayo consta de dos ciclos de compresión de la muestra. En el caso de la evaluación de productos listos para su consumo, este procedimiento fue diseñado para imitar el proceso de masticación. Los perfiles típicos obtenidos en muestras de miga de pan generalmente se presentan en la forma que se ilustra en la Figura 2.19.

De estos perfiles se pueden extraer o calcular parámetros texturales de forma similar a como se indicó para el caso de las masas (Sección 2.2.7.2), con las diferencias conceptuales que ameritan dada la distinta naturaleza de ambos sistemas. Por ejemplo, si bien los parámetros dureza, consistencia, cohesividad, elasticidad y resiliencia se obtienen de forma similar, los perfiles provenientes de muestras de pan no suelen presentar fenómenos de adhesividad, y la gomosidad puede ser reemplazada por otro parámetro, la masticabilidad, que está relacionado con la energía total requerida para masticar un alimento hasta que esté listo para su deglución. La masticabilidad, expresada en N, es calculada como el producto entre la dureza, la cohesividad y la elasticidad.



Para la evaluación de la textura de la miga se realizaron medidas usando un texturómetro TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Reino Unido). Para esto, se tomaron dos rodajas centrales de cada pan y de ellas se extrajeron dos porciones de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro empleando un cortapastas. Las porciones de pan fueron comprimidas hasta un 40% de su altura original en dos ciclos de compresión, con ayuda de una sonda plana de 75 mm de diámetro (P/75). Al menos 8 porciones fueron analizadas para cada panificación independiente (16 discos de miga por muestra). Los parámetros extraídos de los perfiles de textura fueron dureza, consistencia, cohesividad, elasticidad, resiliencia y masticabilidad.

#### 2.3.3.3. Porosidad de la miga

Como en el caso de la textura de la miga, otro de los parámetros más importantes a la hora de evaluar la calidad de un pan es la porosidad o alveolado de la miga. La combinación del tamaño, la forma y la distribución de los poros es variable en cada tipo de pan, y generalmente existe una preferencia subjetiva por parte del consumidor acerca de qué tipo de producto desea. Para el estudio de la porosidad de la miga se han logrado estandarizar métodos que permiten cuantificar los diferentes parámetros que definen a una distribución alveolar (Cauvain, 2015). Estos métodos, en general, se realizan mediante un proceso de análisis de imágenes en la siguiente secuencia:

a. Adquisición de las imágenes: se realiza mediante cámaras fotográficas o de video, microscopios, escáneres o equipos diseñados específicamente para tal fin, en condiciones estandarizadas (distancia, foco, luz, exposición, resolución, etc.).

b. Procesamiento: las imágenes adquiridas se corrigen y transforman para un mejor análisis. Se pueden eliminar artefactos o ruidos que podrían ser fuente de error, corregir el brillo, el fondo y la luz, realizar operaciones y/o transformaciones (adiciones, sustracciones, transformadas de Fourier, deconvoluciones, etc.) y aplicarse los filtros que fueran necesarios, entre otras muchas alternativas y combinaciones.

c. Segmentación: se separan o seleccionan, de todo el resto de la imagen, los objetos de interés para el análisis. Esto puede realizarse por delimitación manual, por umbralización, por color, textura y/o filtración.

d. Análisis morfométrico y cuantitativo: puede ser analógico o digital, manual, parcial o totalmente automatizado, y requiere calibración. Es posible analizar una enorme cantidad de parámetros como localización, orientación, alineación, tamaño, número, forma e intensidad, entre muchos otros.

e. Presentación gráfica y estadística: se analizan estadísticamente los datos obtenidos y se presentan en forma de gráficos, histogramas, tablas (Gonzalez y Woods, 2008).

En el caso de los productos panificados poder lograr cuantificaciones objetivas de la estructura alveolar de la miga es importante ya que posibilita encontrar correlaciones entre las variables puestas en juego a lo largo del proceso de panificación y la estructura y calidad de la miga del producto final (Cauvain, 2012).

Para la realización de este análisis se realizó, en un primer paso, el escaneo de rodajas obtenidas de la parte media de los panes utilizando un escáner HP Scanjet 4070 para obtener imágenes digitales del corte transversal de las piezas. Luego, con la ayuda del programa de análisis de imágenes ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institute of Health, Estados Unidos) se recortó la parte central de cada rodaja para su análisis. Estos recortes se convirtieron en imágenes de 8-bits (escala de grises) y, posteriormente, se segmentaron por binarizado empleando una umbralización con el algoritmo IsoData y aplicando el filtro *"watershed"* para separar los alveolos que hubieran sido fusionados en el procesamiento (Figura 2.20). A través de la herramienta de análisis de partículas se obtuvieron los siguientes parámetros de alveolado: número de alveolos (N), fracción de aire (expresada como el porcentaje del área ocupada por los alveolos sobre el área total de la imagen), área alveolar media (AAM, en cm<sup>2</sup>), perímetro (en cm) y circularidad. Se escanearon al menos 8 rodajas de cada panificación (16 rodajas de pan por formulación).



Figura 2.20. Ejemplo del proceso de recorte, procesamiento, segmentación y cuantificación de imágenes de la miga para el análisis del alveolado (diseño: Arp)

#### 2.3.3.4. Humedad de la miga

El contenido de humedad de las muestras de miga se obtuvo según se detalla en la Sección 2.1.3.7.3, empleando la Ecuación 2.8. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada panificación independiente.

# 2.3.3.5. Actividad acuosa (a<sub>w</sub>) de la miga

La evaluación de la actividad acuosa de la miga panaria se realizó según se describió en la Sección 2.2.4. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada panificación independiente.

# 2.3.3.6. Color de la corteza y de la miga

Se empleó un colorímetro triestímulo Chroma Meter CR-400C (Kónica Minolta, Japón) para evaluar el color de la corteza y la miga de los panes en la escala CIE 1976 L\*a\*b\*. Se adquirieron los valores para los parámetros L\*, a\* y b\*, los cuales aportan información acerca de la luminosidad, la cromaticidad rojo-verde y la cromaticidad azul-amarillo, respectivamente. El parámetro L\* toma valores en el rango de 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que a\* toma valores positivos para el rojo y negativos para el verde, y b\* lo hace para el amarillo (positivos) y para el azul (negativos) (Figura 2.21). Las medidas de color se realizaron por triplicado en, al menos, 14 muestras de corteza y 8 porciones de miga para cada formulación.



1976 L\*a\*b\* (fuente: Korn et al., 2014)

Adicionalmente, en panificados es útil evaluar el grado de pardeamiento no enzimático que ocurre durante el horneado por reacciones de Maillard. Para esto se utiliza el índice de pardeamiento o *browning index (BI*), el cual deriva de los parámetros L\*, a\* y b\* según la Ecuación 2.23 (Buera, Retriella, y Lozano, 1985).

$$BI = \frac{100 \times (X - 0,31)}{0,172}$$
 Ecuación 2.23

donde *BI* es el índice de pardeamiento y *X* se calcula como se indica en la Ecuación 2.24.

$$X = \frac{a^* + (1,75 \times L^*)}{(5,645 \times L^*) + a^* - (3,012 \times b^*)}$$
 Ecuación 2.24

#### 2.3.4. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de los productos frescos

Se empleó la técnica de ESEM para visualizar la estructura de las paredes alveolares en la miga de pan fresco. El pan se elaboró el mismo día de la observación para evitar posibles artefactos debido a la formación de hielo durante el almacenamiento en freezer. Para esto, pequeñas piezas de miga de pan fueron tomadas del centro de las piezas y colocadas en un soporte cilíndrico metálico con una concavidad cónica para ser observado en un microscopio ESEM FEI Quanta 200. Las presiones y temperaturas de trabajo utilizadas para la observación estuvieron entre 4.14 y 4.41 torr, y 10 °C. Se realizaron 2 ciclos de purga entre 3 y 5 torr previo a la observación. Las imágenes de diferentes campos se capturaron a 500× y 1500×.

#### 2.3.5. Valor nutricional y digestibilidad in-vitro del almidón

#### 2.3.5.1. Composición proximal

El análisis de la composición de los panes se realizó según las técnicas descriptas en la Sección 2.1.3.6 para las materias primas. En este caso, rodajas de pan fueron liofilizadas y posteriormente molidas hasta obtener un polvo fino, el cual fue utilizado para analizar su contenido de proteínas, lípidos, cenizas, fibra dietaria y carbohidratos.

# 2.3.5.2. Digestibilidad in-vitro de almidón e índice glicémico estimado

La digestibilidad del almidón fue evaluada por el método descripto por Goñi, Garcia-Alonso, y Saura-Calixto (1997) con algunas modificaciones. Se pesaron 500 mg de pan por duplicado en tubos plásticos de base cónica de 50 ml y luego se adicionaron 10 ml de buffer HCl-KCl (pH 1,5). Los tubos fueron colocados en un termobloque DLab HM100-Pro (Estados Unidos) a 40 °C con agitación constante (650 rpm). Una vez alcanzada la temperatura de incubación se agregaron 200 µl de solución de pepsina (200 FIT-U/ml) a cada tubo v se dejaron incubar durante 60 min manteniendo la agitación. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos se enfriaron a 37 °C y se les agregó 15 ml de buffer fosfato (pH 6,9) con 20 µl de solución de CaCl<sub>2</sub> 3 M previo al agregado de 5 ml de solución de  $\alpha$ -amilasa (10,31 U/ml) preparada con 33 µl de solución de CaCl<sub>2</sub> 3 M. Las soluciones de CaCl<sub>2</sub> fueron agregadas separadamente para evitar la precipitación de iones Ca<sup>+2</sup> en presencia de fosfatos. Los tubos fueron entonces incubados a 37 °C con agitación constante (600 rpm) durante 180 min. Alícuotas de 200 µl fueron tomadas a 0, 20, 60, 90, 120 y 180 min, y colocadas en tubos de vidrio precalentados a 100 °C. Las alícuotas permanecieron 5 min a esta temperatura para inactivar las enzimas presentes. Los azúcares reductores liberados por la acción de la  $\alpha$ -amilasa fueron cuantificados mediante la reacción colorimétrica con el ácido 3,5dinitrosalicílico (DNS). Para esto, los tubos con las soluciones de azúcares reductores se mezclaron con solución de DNS y se calentaron a 100 °C durante 10 min para inducir la reacción colorimétrica. Posteriormente, se midió la absorbancia de las soluciones resultantes a 530 nm en un lector de microplacas multidetección SynergyTM HT (BioTek Instruments, Estados Unidos).

La tasa de hidrólisis fue calculada entonces como mg de maltosa liberados (expresados como almidón) por gramo de almidón, empleando una curva de calibración (confeccionada entre 0 y 1 mg de maltosa/ml) cuya reacción colorimétrica se realizó en paralelo a los tubos con muestra. Para la estimación del índice glicémico in-vitro (*IG*) de los panes con HM se calcularon las áreas bajo las curvas (ABC) de las tasas de hidrólisis. Empleando el ABC del pan control como referencia (100% de *IG*), los

*IG* estimados para cada pan con HM se calcularon como relación entre el ABC del pan correspondiente y el ABC del control (Figura 2.22).



Figura 2.22. Representación esquemática de tasas de hidrólisis para una referencia y una muestra con sus respectivas áreas bajo la curva (diseño: Arp)

#### 2.3.6. <u>Análisis sensorial y percepción nutricional de los productos</u>

El análisis sensorial de los panificados consistió en la realización de dos métodos diferentes. En primera instancia se realizó una prueba de diferencia con un control como método de discriminación. El objetivo fue establecer si los consumidores eran capaces de diferenciar una muestra conocida de muestras desconocidas y determinar la magnitud de tales diferencias en caso de que fueran percibidas. En una segunda etapa se realizó un ensayo de aceptabilidad mediante la metodología de escalas hedónicas.

#### 2.3.6.1. Preparación de las muestras

Los panificados utilizados para los ensayos fueron preparados según se indica en la Sección 2.3.2 con una semana de anticipación y congelados en freezer a -18 °C hasta el día de la realización de cada panel. Las piezas fueron descongeladas 90 min antes del comienzo de cada ensayo y cortadas en rodajas de 2 cm de espesor. Para las pruebas se utilizaron sólo 4 rodajas por cada pan, las cuales correspondían a la parte central de cada pieza.

## 2.3.6.2. Prueba de diferencia con un control

El ensayo de diferencia con un control o testigo es un ensayo de discriminación en el cual se busca determinar, si existe, el grado de diferencia percibido por consumidores al presentarles una muestra codificada como testigo y varias muestras incógnitas (entre las que se encontraba también una muestra correspondiente a la formulación control).

Las hipótesis planteadas en este ensayo fueron:

- <u>Hipótesis Nula o Ho</u>: No se perciben diferencias significativas entre la muestra testigo y las muestras incógnitas.

- <u>Hipótesis Alternativa o  $H_{1:}$ </u> Al menos una muestra incógnita se percibe significativamente diferente al testigo.

Para la evaluación de estas hipótesis se empleó un panel no entrenado con un total de 20 evaluadores y un nivel de significación de  $\alpha$  = 0,05. Los evaluadores debieron responder sobre las diferencias globales en una escala graduada desde 0 ("ninguna diferencia") hasta 9 ("diferencia extrema"), en planillas otorgadas para tal fin (Anexo A). Posteriormente debieron evaluar atributos específicos (color de la corteza, cohesividad y cocción) utilizando escalas de 9 puntos centradas y simétricas. Por ejemplo, para la cohesividad, la escala brindada presentaba valores desde -4 (mucho menos cohesiva), pasando por 0 (igual al control), hasta 4 (mucho más cohesiva).

En este ensayo las pruebas se presentaron a los evaluadores de forma codificada como se muestra en la Tabla 2.2.

Muestra	Código
Control (testigo)	К
Control (muestra)	885
HM10	564
HM20	606
HM30	432

Tabla 2.2. Codificación de muestras en la prueba de diferencias con un testigo Muestra

#### 2.3.6.3. Análisis de aceptabilidad por escalas hedónicas

Para el desarrollo de las pruebas de aceptabilidad se añadió un factor adicional al análisis. El mismo fue incluido con el objetivo de evaluar cómo los consumidores percibían las ventajas nutricionales de un sustituto saludable del pan blanco cuando se utiliza una fuente imperceptible de fibra, como lo es el HM. Para esto, la evaluación sensorial fue realizada en dos pasos. En una primera etapa, rodajas codificadas de los panes fueron presentadas a los consumidores junto a la planilla de evaluación (Anexo B) sin ninguna información. En el segundo paso, realizado al día siguiente con otro grupo de evaluadores, las rodajas de pan fueron entregadas junto con un rótulo nutricional conteniendo información acerca de la ingesta diaria recomendada de fibra (IDRF) (Código Alimentario Argentino, Cap. V) y el aporte de fibra de cada pan a la IDRF, además de información acerca del almidón resistente y los ingredientes utilizados en la elaboración de los panes (Anexo C). Un total de 40 consumidores (65% de mujeres y 35% de hombres, con edades entre los 24 y los 55 años) fueron convocados. Más del 83% de los evaluadores declararon consumir productos panificados al menos una vez a la semana. Los evaluadores debieron responder sobre la apariencia, textura, sabor, color y aceptabilidad general de las muestras en una escala hedónica balanceada comprendida entre 1 ("me disgusta mucho") y 9 ("me gusta mucho") (Anexo B).

# 2.4. Estudio del proceso de envejecimiento en panificados elaborados con almidón resistente

#### 2.4.1. <u>Almacenamiento del pan</u>

Cuatro panes provenientes de cuatro panificaciones realizadas el mismo día, como se describió previamente (Sección 2.3.2), fueron cubiertos individualmente con film plástico y luego se almacenaron en bolsas plásticas herméticas a 20 °C (Correa y Ferrero, 2015) por 11 días. Se realizaron evaluaciones de humedad, actividad acuosa, dureza de la miga, cristalinidad y retrogradación de amilopectina en la miga en los días 0, 1, 2, 4, 7, 9 y 11 de almacenamiento. Todo el ensayo fue realizado por duplicado. Los ensayos de TPA y las determinaciones de humedad y  $a_w$  se realizaron como se describió

anteriormente para los panes frescos (Secciones 2.3.3.2, 2.3.3.4 y 2.3.3.5, respectivamente).

## 2.4.2. <u>Cuantificación de la retrogradación de la amilopectina por DSC</u>

A través de ensayos de DSC es posible evaluar indirectamente el proceso de retrogradación de amilopectina en sistemas conteniendo almidón gelatinizado, como es el caso de la miga de pan. La evaluación se realiza midiendo, en los diferentes tiempos de almacenamiento, la entalpía puesta en juego cuando se desestabilizan los cristales de amilopectina retrogradada por aplicación de flujo de calor. Así, si la amilopectina retrograda en mayor o menor proporción durante el almacenamiento, los termogramas evidenciarán transiciones de mayor o menor magnitud, respectivamente.

Para cada día de almacenamiento se extrajeron aproximadamente 10,00 mg de muestra de miga del centro de cada pieza de pan, pesada con exactitud, y se colocaron en cápsulas de DSC, las cuales se sellaron herméticamente. Se calentaron las cápsulas a una velocidad de 10 °C/min desde 5 °C hasta 140 °C en un DSC Q100, empleando una isoterma de 5 min a 5 °C para estabilizar la temperatura. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

# 2.4.3. Cristalinidad de la miga panaria por difractometría de rayos-X

La difractometría de rayos-X es una técnica no invasiva y no destructiva que emplea radiación electromagnética (proveniente de fenómenos de desaceleración de electrones) capaz de interactuar con los cristales presentes en una muestra. Esto es posible ya que la longitud de onda del haz de electrones se encuentra en el rango entre 0,1 y 1 nm, es decir, en el mismo orden de tamaño exhibido por los espaciamientos atómicos en los cristales. Cuando el haz incide con un ángulo 20 sobre una muestra cristalina se produce una difracción del mismo, la cual es registrada por un detector. Un difractómetro de rayos-X consta de tres partes fundamentales: una fuente de rayos-X, un soporte para la muestra y un detector. El equipo puede estar diseñado de dos maneras dependiendo de si permite la rotación del soporte para la muestra y el detector (fuente de rayos-X fija) o de si quienes rotan son la fuente de rayos-X y el detector (soporte para la muestra fijo) (Figura 2.23). Con este diseño es posible realizar un

barrido de ángulos de incidencia  $2\theta$ , ya sea por rotación de la fuente o la muestra. A medida que se realiza el barrido, los haces reflejados por la muestra serán registrados por el detector.



Figura 2.23. a) Difractómetro de rayos-X y b) esquema de funcionamiento (diseño: Arp)

Para que estos puedan ser detectados debe ocurrir una interferencia constructiva entre los diferentes planos paralelos de una red cristalina. Siendo que en un difractómetro la longitud de onda del haz incidente ( $\lambda$ ) es constante y que en una red cristalina la distancia entre planos paralelos ( $d_{hkl}$ ) también es constante, la interferencia constructiva se dará sólo para ángulos  $\theta$  que satisfagan la Ley de Bragg (Ecuación 2.25).

$$\lambda c = 2d_{hkl}sen \,\theta$$
 Ecuación 2.25

donde *c* es un número entero y  $\theta$  es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión. Adicionalmente, el plano normal (plano perpendicular al plano de los átomos) debe ser paralelo al vector de difracción (bisectriz entre los ángulos de los haces incidente y difractado) (Figura 2.24).

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 2.24. Esquema de interferencia constructiva para la difracción según la Ley de Bragg (diseño: Arp)

A diferencia de una muestra monocristalina donde sólo un plano normal paralelo al vector de difracción es posible (Figura 2.25a), en una muestra policristalina existirán, probabilísticamente, tantos planos normales como cristales, por lo que se obtendrá un espectro de intensidades con numerosos picos (Figura 2.25b).

En los difractogramas resultantes (gráficos de intensidad de la señal vs. ángulo 2 $\theta$ ) el número de picos está relacionado con la cantidad de planos cristalinos y la posición de los picos con las distancias interplanares en la red (Jian y Hejing, 2003).

En sistemas almidonosos, el conocimiento de los difractogramas permite caracterizar la estructura cristalina (grado de cristalinidad y tipo de cristales), la cual a su vez está relacionada con su comportamiento térmico y nutricional. Para realizar estos ensayos, porciones de miga del centro de los panes, obtenidas cada día de almacenamiento, fueron liofilizadas y molidas para la evaluación de su cristalinidad en un difractómetro X' Pert PRO (PANanalytical, Países Bajos).



Figura 2.25. Ejemplos de patrones de difracción para muestras a) monocristalinas y b) policristalinas (adaptada de www.slideshare.net/bharathpharmacist)

Adicionalmente, los patrones de difracción del HM, la HT y almidón extraído de la HT y liofilizado fueron adquiridos a 40 V y 40 mA con radiación Cu-K<sub> $\alpha$ </sub> ( $\lambda$  = 1,5406 Å). Las muestras fueron analizadas barriendo en el rango de ángulos 2 $\theta$  entre 4 y 40° a una velocidad de 1°/min.

El análisis de los picos de difracción se llevó adelante con ayuda del programa informático PeakFit v4.12 (SeaSolve Software Inc., Estados Unidos). Los pasos para el análisis incluyeron el suavizado del difractograma mediante convolución y el ajuste de los picos mediante la metodología de residuos. Así, se obtuvieron los datos de posición (en el eje 2 $\theta$ ) de cada pico.

#### 2.4.4. <u>Cinética de envejecimiento mediante modelado de Avrami</u>

Una matriz alimentaria conteniendo almidón gelatinizado se encuentra, inicialmente, en un estado que se puede considerar "desordenado". En este estado, las

cadenas de amilosa y amilopectina que componen al almidón se encuentran distribuidas al azar. Sin embargo, con el paso del tiempo, estas moléculas se reorganizan y estabilizan formando fases cristalinas más "ordenadas". El proceso de formación de estas fases, es decir la cristalización, es función tanto de factores termodinámicos como cinéticos, siendo estos últimos generalmente dominantes. El estudio de estos fenómenos fue realizado en primera instancia para sustancias de bajo peso molecular y, posteriormente, los modelos fueron adaptados para el estudio de en polímeros de gran tamaño (Müller et al., 2016). Una de las adaptaciones más utilizadas es el modelo de Avrami, generalmente resumido en la Ecuación 2.26.

$$1 - V_c(t) = e^{-kt^n}$$
 Ecuación 2.26

donde  $V_c(t)$  es la fracción volumétrica relativa cristalizada a un tiempo t, n es el índice de Avrami (con n = 1, 2, 3 o 4) y k es la constante de velocidad de cristalización global que incluye contribuciones de nucleación y crecimiento (Foubert et al., 2003; Müller et al., 2016).

Si se adopta  $1 - V_c(t) = \theta(t)$ , con  $\theta(t)$  definida como la fracción volumétrica relativa aún por cristalizar, es posible calcular  $\theta(t)$  a un tiempo t utilizando la información que diferentes resultados experimentales puedan brindar sobre el estado cristalino de un sistema (Ecuación 2.27) (Amigo et al., 2016; Sanz-Penella, Wronkowska, Soral-Smietana, Collar, y Haros, 2010).

$$\theta(t) = \frac{P_{\infty} - P_t}{P_{\infty} - P_0}$$
 Ecuación 2.27

donde *P* corresponde al parámetro evaluado y los subíndices  $\infty$ , *t* y *0* corresponden a los valores de tal parámetro para los tiempos  $\infty$ , t y 0, respectivamente. Asumiendo entonces esta definición y combinando la Ecuación 2.26 y la Ecuación 2.27, se obtiene la Ecuación 2.28.

$$\frac{P_{\infty} - P_t}{P_{\infty} - P_0} = e^{-kt^n}$$
 Ecuación 2.28

El proceso de retrogradación de la amilosa y, particularmente, de la amilopectina, es uno de los fenómenos históricamente asociados al envejecimiento y pérdida de la frescura en panificados. Por esta razón, parámetros como la entalpía asociada a la retrogradación en miga de pan son ampliamente utilizados para el estudio de cinéticas de envejecimiento (Santos, Rosell, y Collar, 2008; Sanz-Penella et al., 2010).

Sin embargo, varios autores han reportado que la contribución de las proteínas a este proceso ha sido subestimada, y que la retrogradación del almidón y el envejecimiento del pan no son sinónimos, sino que el segundo es un proceso más general que incluye al primero. En el modelo presentado por Martin, Zeleznak, y Hoseney (1991) se propone que el envejecimiento es el proceso resultante de las interacciones hidrofílicas (principalmente puentes de hidrógeno) entre las proteínas del gluten y los gránulos remanentes del almidón. Bajo este enfoque, el empleo de parámetros que brinden información global sobre el proceso, como la dureza (TPA) o parámetros derivados de los tiempos de relajación  $T_2$  (RMN-<sup>1</sup>H), sería más adecuado (Amigo et al., 2016; Angioloni y Collar, 2011; Kurek, Wyrwisz, y Wierzbicka, 2017; Ottenhof y Farhat, 2004; Seow y Teo, 1996).

Para el estudio de cinéticas de envejecimiento en miga de pan, los parámetros  $\Delta$ H y dureza obtenidos durante el almacenamiento a través de los ensayos de DSC y TPA, respectivamente, fueron usados para construir las curvas "parámetro vs. tiempo de almacenamiento" respectivas. Las curvas se ajustaron entonces al modelo de Avrami (Ecuación 2.28) para su análisis.

# 2.5. Uso de hidrocoloides como mejoradores en la panificación de productos con alto contenido de almidón resistente

# 2.5.1. Formulaciones

Se emplearon dos hidrocoloides de grado alimentario como mejoradores de panificación:

- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Dow Chemical Company, Estados Unidos): Sustituida en un 29,3% por grupos metoxilo y con 6,0% de grupos hidroxipropilo. En solución acuosa al 2% presenta una viscosidad de 4477 cps (20 °C) (USP).
- Carboximetilcelulosa (CMC, Latinoquímica Amtex S.A., Argentina):
  Con una pureza del 99,69% y sustituida en un 0,9% por grupos carboximetilo. En solución acuosa al 1% presenta una viscosidad de 3640 cps (25 °C) (información suministrada por el fabricante).

Las concentraciones de cada hidrocoloide en las formulaciones fueron de 1% y 1,5% p/p (base mezcla harina de trigo/almidón resistente).

# 2.5.2. <u>Ensayos sobre las premezclas</u>

Las mezclas secas conteniendo HPMC o CMC en concentraciones de 1% o 1,5% se analizaron en un farinógrafo de Brabender para extraer los parámetros farinográficos correspondientes, como se detalló en la Sección 2.1.3.1. Asimismo, se empleó un RVA 4500 para realizar los ensayos viscoamilográficos según se describió en la Sección 2.1.3.5.

# 2.5.3. Ensayos sobre las masas panarias

Las masas panarias con hidrocoloides se prepararon como se menciona en la Sección 2.2.1, incorporando los hidrocoloides a la mezcla seca en forma de polvo. Las cantidades de agua destilada y los tiempos de amasado empleados fueron los correspondientes a los parámetros farinográficos.

Las masas panarias con hidrocoloides fueron evaluadas con la misma metodología empleada para las masas con HM. Se realizaron ensayos de determinación de gluten (Sección 2.2.2), humedad (Sección 2.2.3),  $a_w$  (Sección 2.2.4), pH (Sección 2.2.5), reología

oscilatoria de pequeña deformación (Sección 2.2.6.1), relajación (Sección 2.2.7.1), TPA (Sección 2.2.7.2) y observación por CSLM (Sección 2.2.12).

#### 2.5.4. Ensayos sobre los panificados con hidrocoloides

#### 2.5.4.1. Evaluación de los panificados frescos

Sobre las masas preparadas con 3% de levadura se realizaron los ensayos para obtener los tiempos de fermentación óptimos según la Sección 2.3.1. Una vez obtenidos estos tiempos, los panificados conteniendo hidrocoloides fueron preparados como se menciona en la Sección 2.3.2. Dadas las características de las masas formadas y su alto contenido de agua, los pasos correspondientes al laminado fueron omitidos (M. M. Martínez, Román, y Gómez, 2018).

Sobre los panificados se realizaron los ensayos de calidad panadera (volumen específico, TPA de la miga, color de la corteza y la miga, porosidad, humedad y  $a_w$ ) según los métodos descriptos en la Sección 2.3.3.

#### 2.5.4.2. Almacenamiento

Los ensayos de almacenamiento se realizaron de forma similar a como se procedió para los panificados sin hidrocoloides, evaluando las distintas características a los días 1, 2 y 4 posteriores a la panificación. Los ensayos llevados adelante fueron TPA, determinación de humedad y  $a_w$ , según la metodología enunciada en la Sección 2.4.

# 2.6. Obtención y caracterización de almidón resistente tipo 3 por retrogradación de almidón de trigo

#### 2.6.1. Materiales

Se utilizó almidón de trigo nativo (AT) (Bernesa S.A.C.I., Argentina), agua destilada y pululanasa (EC 3.2.1.41, Sigma-Aldrich, Argentina) como enzima desramificante.

#### 2.6.2. Puesta a punto y preparación

Los almidones retrogradados se obtuvieron a través de dos esquemas: por método térmico (Figura 2.26a) y por método enzimático-térmico (Figura 2.26b).



Figura 2.26. Esquema de las metodologías a) térmica y b) enzimático-térmica para la preparación de almidones resistentes tipo 3

Brevemente, se prepararon en vasos de precipitado tipo Berzelius de 600 ml, suspensiones de almidón de trigo nativo en agua destilada en diferentes proporciones (10% o 20% p/v). Las suspensiones fueron calentadas por 30 min en baño termostático a 80-85 °C, con agitación, para inducir la gelatinización del almidón de forma homogénea en todo el volumen de la suspensión. Una vez obtenidas las pastas gelatinizadas, estas atravesaron 4 ciclos térmicos que incluyeron 30 min de calentamiento en autoclave a 121 °C seguidos de 24 hs de enfriamiento en cámara. Las variables de proceso introducidas en los protocolos fueron a) incluir o no un tratamiento enzimático desramificante previo a la introducción de las muestras en los ciclos térmicos, y b) la evaluación de diferentes temperaturas de enfriamiento en cámara. El tratamiento desramificante incluyó la incubación a 59 °C durante 6 hs, con agitación, de la muestra gelatinizada con enzima pululanasa. Se probaron diferentes concentraciones de enzima: 157,4 ASPU/g almidón, 40,96 ASPU/g almidón o 20 ASPU/g almidón, siendo ASPU (*Acid Stable Pullulanase Unit*) la unidad de actividad enzimática definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 mg de glucosa de almidón en 1 min a pH 4,4 y 60 °C (Miao-miao Shi y Gao, 2011). Las temperaturas de refrigeración utilizadas en los ciclos térmicos fueron de 0 °C o 4 °C. Los productos finales de estos procesos se obtuvieron por diferentes métodos de secado: secado en estufa a 50 °C o liofilización.

# 2.6.3. Caracterización fisicoquímica

# 2.6.3.1. Transiciones térmicas

# 2.6.3.1.1. Seguimiento del proceso de obtención

Con el objetivo de estudiar las transformaciones de las fases gelatinizadas y retrogradadas de las suspensiones de almidón a lo largo del proceso de obtención se realizaron experimentos de DSC sobre alícuotas de muestra tomadas en las diferentes etapas del protocolo sin tratamiento enzimático. La toma de muestra se realizó en las siguientes etapas:

- Suspensión de almidón nativo
- Pasta gelatinizada
- Pasta obtenida luego del primer calentamiento en autoclave a 121 °C
- Pasta obtenida luego de la primera refrigeración en cámara a 4 °C
- Pasta obtenida luego del segundo calentamiento en autoclave a 121 °C
- Pasta obtenida luego de la segunda refrigeración en cámara a 4 °C
- Pasta obtenida luego del tercer calentamiento en autoclave a 121 °C
- Pasta obtenida luego de la tercera refrigeración en cámara a 4 °C
- Pasta obtenida luego del cuarto calentamiento en autoclave a 121 °C
- Pasta obtenida luego de la cuarta refrigeración en cámara a 4 °C
- Suspensiones 1:4 de producto seco obtenido en agua bidestilada

# 2.6.3.1.2. Caracterización térmica

Los experimentos de DSC se realizaron en el rango de temperatura entre 5 y 140 °C. Para esto, se pesaron con exactitud, en cápsulas de DSC, aproximadamente 10 mg de las muestras tomadas por duplicado. En el caso de los productos finales obtenidos luego del secado, las muestras se resuspendieron en proporción 1:4 con agua bidestilada. Las cápsulas fueron sometidas a una isoterma de 5 min por 5 °C para lograr la estabilización térmica y, seguidamente, a una rampa de temperatura de 10 °C/min en el rango de temperatura mencionado. Todas las medidas se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido Q100.

# 2.6.3.2. Ensayos con viscoamilógrafo rápido (RVA)

Los perfiles viscoamilográficos y los parámetros correspondientes a estos almidones se obtuvieron según se detalló en la Sección 2.1.3.5.

# 2.6.3.3. Cristalinidad por difractometría de rayos-X

Los almidones retrogradados obtenidos en forma de polvo, así como el AT en su forma nativa, fueron evaluados en un difractómetro X' Pert Pro. Para la obtención de los espectros se realizó un barrido en el rango de ángulos 20 desde 4 hasta 40°, con paso de 0,02° 20 y un tiempo/paso de 3 s. Los difractogramas se analizaron mediante el empleo del programa informático PeakFit.

# 2.6.4. Caracterización microscópica por SEM de bajo vacío

Los polvos de almidón retrogradado fueron observados utilizando un microscopio SEM FEI Quanta 200 en modo bajo vacío (130 Pa). Para esto, las muestras fueron montadas en una base de aluminio empleando cinta adhesiva bifásica. Las imágenes fueron obtenidas a 400× y 1000× utilizando un detector de electrones secundarios.

# 2.6.5. <u>Caracterización nutricional</u>

# 2.6.5.1. Determinación de fibra dietaria

El contenido de fibra dietaria total de los almidones retrogradados se determinó mediante el método AACC 32-05.01 según se describió en la Sección 2.1.3.7.5.

# 2.6.5.2. Digestibilidad in-vitro de almidón

La digestibilidad del almidón se evaluó a través del protocolo adaptado de Goñi et al. (1997) que se describe en la Sección 2.3.5.2.

## 2.7. Análisis estadístico

Se emplearon los programas estadísticos OriginPro 8 SR0 v8.0724 (OriginLab Corp., Estados Unidos) e InfoStat 2018e (Di Rienzo et al., 2018) para realizar los análisis de varianza monofactoriales y bifactoriales, respectivamente. Las comparaciones de media se realizaron a través de pruebas de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%.

La confección de histogramas, así como los ajustes matemáticos a los diversos modelos y sus comparaciones a través de pruebas F con niveles de confianza del 95%, se realizaron también con OriginPro 8 SR0 v8.0724.

**Capítulo 3** 

# Formulación y estudio de las masas panarias
# Capítulo 3: Formulación y estudio de las masas panarias

# 3.1. Caracterización de las materias primas

# 3.1.1. <u>Composición de la harina y el almidón resistente</u>

La composición proximal en base seca de la harina de trigo (HT) y el almidón resistente (HM) empleados en la elaboración de las masas y los panificados a lo largo de este trabajo se exponen en la Tabla 3.1. Asimismo, los valores de humedad obtenidos para HT y HM fueron de  $13,3 \pm 0,3$  y  $11,2 \pm 0,2$  g/100 g, respectivamente.

Componente (g/100 g, bs)	НТ	HM
Lípidos*	1,91 ± 0,03	1,27 ± 0,05
Cenizas*	$0,68 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,00$
Proteínas†	15,85 ± 0,02	$0,78 \pm 0,01$
Fibra†	4,5 ± 0,7	58 ± 8
Carbohidratos‡	77,1 ± 0,7	39 ± 8

Tabla 3.1. Composición proximal de la harina de trigo y el almidón resistente

\* n = 3 † n = 2

‡ Carbohidratos diferentes de fibra, obtenidos por diferencia.

bs = base seca. Promedio ± desvío estándar.

De los resultados se desprende que la harina de trigo cumple con los requerimientos de humedad reglamentados por el Código Alimentario Argentino (CAA) para una harina tipificada como 000 (máximo 15 g/100 g). Sin embargo, su contenido de cenizas es mayor al definido en la normativa (máximo 0,65 g/100 g, bs, tolerancia del 3% sobre los valores establecidos). El CAA establece el valor de cenizas en base a la calcinación de las muestras a temperaturas entre 900 y 920 °C, mientras que la determinación de cenizas en el laboratorio fue realizada en una mufla a 525 °C, pudiendo ser ésta la razón de las diferencias observadas (Código Alimentario Argentino, 2018b). El contenido de proteínas, aunque no puede independizarse de la calidad de las mismas, se relaciona positivamente con la capacidad de la harina para producir panificados de buena calidad. La harina estudiada presentó un contenido proteíco que puede considerarse elevado,

por lo que se espera que logre un buen desempeño en procesos de panificación (Cauvain, 2012).

Por otro lado, el almidón resistente estuvo compuesto principalmente por carbohidratos, ya sea como fibra o como carbohidratos digeribles. Presentó cantidades poco relevantes de cenizas y proteínas, y un bajo contenido de lípidos. Estos resultados fueron los esperados dada la información provista por el fabricante.

#### 3.1.2. *Contenido de gluten de la harina*

La harina de trigo fue evaluada en el contenido y la calidad de sus proteínas formadoras de gluten. Conocer la cantidad de estas proteínas en la harina y sus propiedades, tanto en su relación con el agua (hidratación) como en su contenido relativo de gluteninas y gliadinas (relacionado a la calidad del gluten a formarse), es importante para establecer si una harina permitirá la producción de panificados de calidad. Los resultados encontrados se presentan en la Tabla 3.2.

I	abla 3.2. Características del giuten de la narina de trigo			
	Parámetro	HT		
	GH	31,7 ± 0,9		
	GS	11,5 ± 0,3		
	GI	99,2 ± 0,5		
	GH/GS	$2,76 \pm 0,06$		
	GH-GS	$20.2 \pm 0.7$		

Table 2.2. Canastanísticas del alutan de la havina de triga

Valores expresados en % p/p. Promedio ± desvío estándar (n = 8).

En ella se observan los valores de gluten húmedo (GH), gluten seco (GS) y gluten index (GI) obtenidos y, además, parámetros derivados de estos: la relación GH/GS y la diferencia GH-GS. Del análisis de estos parámetros se pudo concluir que la harina utilizada es una harina particularmente fuerte ya que posee un valor de GI superior a 95. En general, se considera que las harinas adecuadas para la panificación presentan valores de *GI* mayores a 55 (Bonfil, Abbo, y Svoray, 2015).

Por otro lado, el análisis de la relación del gluten con el agua indicó que la harina contiene proteínas formadoras de gluten de muy buena calidad, ya que son capaces de absorber hasta cerca de dos veces su peso en agua. La capacidad de hidratación del gluten es importante ya que es a partir del proceso de absorción de agua que el gluten puede desarrollar sus características viscoelásticas.

# 3.1.3. Perfil del tamaño de partículas

El tamaño de las partículas de los ingredientes utilizados en panadería es, en general, determinante de la calidad final de los productos. Contar con un adecuado tamaño de partícula (ya sea de harinas de trigo, harinas proteicas, fibras, etc.) es crítico a la hora de desarrollar un panificado de buen volumen y con una miga bien aireada, como se espera de un pan francés tradicional. El efecto del tamaño de partícula en la calidad de los panificados ha demostrado ser variable, dependiendo tanto de la composición química y el tipo de ingrediente utilizado como del nivel empleado en la formulación (Hemdane et al., 2016).



Figura 3.1. Distribución en %volumen del tamaño de partículas del almidón de HT y del almidón HM

Las distribuciones en %volumen para el almidón de la harina de trigo y el HM se presentan en la Figura 3.1. Estas distribuciones mostraron un patrón tetramodal para el almidón de la harina (picos a 1,10; 3,31; 22,91 y 158,49  $\mu$ m) y uno trimodal para el almidón HM (picos a 1,44; 11,48 y 79,43  $\mu$ m). Los parámetros característicos del análisis de la distribución de tamaños están resumidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros de la distribución de tamaños de partícula del almidón de la harina de trigo y el almidón HM

		F	Årea		
Almidón	D[4,3] (µm)	D(0,1)	D(0,5)	D(0,9)	superficial específica (m²/m³)
HT	30,5 ± 0,4	3,646 ± 0,025	20,56 ± 0,07	46,00 ± 1,13	0,677 ± 0,004
HM	$14,7 \pm 0,1$	4,263 ± 0,004	10,95 ± 0,01	22,98 ± 0,05	0,969 ± 0,000
	•				

HT: Harina de trigo.

HM: Almidón resistente.

Promedio ± desvío estándar (n = 2).

El diámetro de De Broucker, D[4,3], muestra que los gránulos del almidón HM presentaron menor tamaño que los gránulos del almidón de la harina de trigo. En el mismo sentido, el valor del percentil D(0,9) para el HM indicó que con un diámetro máximo de 22,98 µm se abarca el 90% del volumen de la muestra, mientras que en el caso de la harina de trigo el máximo diámetro debajo del cual se encuentra el 50% del volumen de la muestra fue 20,56 µm (D(0,5) en la Tabla 3.3). Además, los valores de los percentiles indicaron que para el HM la mayoría de los diámetros de los gránulos estaban entre 4,26 y 22,98 µm, mientras que para la harina de trigo estuvieron entre 3,65 y 46,00 µm. Estos resultados llevarían a una mayor área superficial específica para los gránulos de HM que para los de la harina de trigo.

Los patrones de distribución de tamaños obtenidos en este trabajo se encuentran en congruencia con los resultados previamente reportados por Xu et al. (2016) para almidones de diferentes cultivos de trigo y por Wang et al. (2017) para almidón resistente Hi-Maize 260.

#### 3.1.4. Capacidad de retención de solventes (SRC) de la harina

La *SRC* es un ensayo empírico que permite determinar el uso más adecuado para una harina de trigo en base a las interacciones que ésta establece con diferentes solventes:

agua (*WaRC*), solución de sacarosa 50% p/p (*SuRC*), solución de carbonato de sodio 5% p/p (SCRC), solución de ácido láctico 5% p/p (LARC). Teniendo en cuenta que cada solvente revela la importancia de diferentes componentes en la harina (gluteninas, almidón dañado, pentosanos) a la hora de establecer interacciones con el agua, y que estas interacciones serán más deseadas para la obtención de un producto u otro (galletitas, panificados, etc.). La combinación de los distintos comportamientos que la harina presente ante cada solvente puede utilizarse como indicador de uso (AACC International, 2000b). Asimismo, es posible calcular un parámetro adicional a partir de la relación entre LARC y la suma de SuRC y SCRC, el Índice de Desempeño del Gluten o *IDG* (Kweon et al., 2011). Los resultados encontrados se presentan en la Tabla 3.4.

abla 3.4. Parametros de la SRC de la harina de trigo			
Parámetro	НТ		
WaRC	66,9 ± 0,6		
SuRC	$110 \pm 2$		
SCRC	82,1 ± 0,9		
LARC	107 ± 1		
IDG	$0,56 \pm 0,01$		

Tabla 3.4. Parámetros de la SRC de la barina de tri

Valores expresados en % p/p (bs). Mezclas preparadas sin NaCl. Promedio ± desvío estándar (n = 5).

El método establece que las harinas tendrán un buen desempeño en panificación cuando presenten valores de *WaRC*  $\leq$  57%, *SuRC*  $\leq$  96%, *SCRC*  $\leq$  72% y *LARC*  $\geq$  100%. En el caso de la harina analizada, sólo el parámetro *LARC* (relacionado a las gluteninas) cumple con el perfil definido por el método y suma evidencia de que la harina presenta un gluten fuerte y de buena calidad. Se espera que la presencia de un gluten de estas características sea una ventaja dado que la harina está pensada para utilizarse en un sistema cargado, es decir uno en el cual se emplearán ingredientes que no contribuirán a la formación de la red, pero deberán ser sostenidos por ésta, lo cual suele perjudicar el buen desarrollo del gluten. En el mismo sentido, las harinas para panificación en general requieren una elevada absorción de agua, así como un contenido relativamente alto de arabinoxilanos (pentosanos) y almidón dañado (Kweon et al., 2011). En este caso, la harina analizada presenta valores elevados para los parámetros relacionados con estas propiedades y componentes (*WaRC*, *SuRC* y *SCRC*, respectivamente), por lo que se espera que su desempeño en la panificación mediante una metodología de reemplazo de harina de trigo sea exitoso.

El *IDG* hallado para la harina analizada es de los más bajos reportados en literatura, comprendidos entre 0,62 y 0,83 (Hammed, Ozsisli, Ohm, y Simsek, 2015). Sin embargo, esto podría deberse a la diferencia en las características que presentan las harinas locales respecto a harinas norteamericanas. En el caso de la harina utilizada en este trabajo, tanto el *LARC* como el *SuRC* y el *SCRC* son elevados. Así, si bien el gluten tendría gran peso en las características de la masa, su comportamiento estaría influenciado fuertemente por los demás componentes de la matriz (almidón dañado y arabinoxilanos).

#### 3.1.5. Propiedades farinográficas de la harina

A partir de los ensayos farinográficos realizados sobre la harina de trigo se obtuvieron farinogramas como el que se presenta en la Figura 3.2. En el mismo se puede observar un rápido incremento de la consistencia, aproximadamente dentro de los 2 primeros minutos, debido a la hidratación del almidón (hinchamiento). El descenso posterior estaría relacionado con una redistribución del agua en la mezcla, la cual comienza a hidratar a las proteínas del gluten. A partir de este punto, el gluten puede comenzar a desarrollarse mediante el trabajo mecánico aplicado, lo cual se evidencia aproximadamente entre los 7 y los 12 min.

Respecto a los parámetros farinográficos de la harina (Tabla 3.5), se encontró que los valores de absorción de agua (A), tiempo de desarrollo (TD) y estabilidad (E) fueron elevados, mientras que el aflojamiento (F) fue relativamente pequeño. El parámetro A está fuertemente vinculado con la hidratación de las proteínas, por lo que el elevado valor que presentó esta harina estaría asociado a su alto contenido proteico (Cauvain y Young, 2007). En el mismo sentido, una harina con alto contenido de gluteninas en general presenta TD extensos. Para que la red de gluten pueda desarrollarse, los enlaces disulfuro de las gluteninas deben romperse y reorganizarse. Un mayor contenido de

gluteninas implicará entonces un mayor requerimiento de energía mecánica para producir esta reorganización (Cauvain y Young, 2007).



Figura 3.2. Farinograma representativo de la harina de trigo

Tabla 3.5. Parámetros farinográficos de la harina de trigo

Parámetro	НТ
A (g H <sub>2</sub> O/100 g)	58,8 ± 0,3
TD (min)	9,8 ± 1,3
E (min)	21,0 ± 0,9
F (UF)	32 ± 6

Promedio ± desvío estándar (n = 3).

### 3.1.6. Perfil viscoamilográfico de las materias primas

Las propiedades de formación de pasta de la harina de trigo y el almidón resistente fueron evaluadas empelando un RVA. Este tipo de ensayos reológicos permite determinar y comparar el comportamiento de harinas y almidones cuando son sometidos a un proceso de calentamiento y enfriamiento en condiciones de agitación constante y exceso de agua. Durante este proceso ocurren, de ser posibles, todos los cambios físicos asociados al comportamiento térmico de suspensiones de almidón: hinchamiento de los gránulos, gelatinización, desagregación de la estructura granular y retrogradación de la amilosa. Estos cambios son registrados a través de la viscosidad de la suspensión analizada, generando diferentes perfiles.

A partir de los perfiles se obtienen los parámetros de empaste. La temperatura y el tiempo de empaste (T<sub>e</sub> y t<sub>e</sub>, respectivamente) son los parámetros que indican el punto en el cual se produce un aumento en la viscosidad de la suspensión durante el calentamiento, sugiriendo el comienzo de la gelatinización. La viscosidad de pico ( $\eta_p$ ) es la máxima viscosidad alcanzada por la suspensión antes de producirse la disgregación de los gránulos por efecto de la agitación, proceso que da lugar a una disminución importante de la viscosidad y que se registra a través de la viscosidad mínima ( $\eta_{mín}$ ). La diferencia entre la  $\eta_p$  y la  $\eta_{mín}$ , denominada inestabilidad, se relaciona con la capacidad de los almidones de resistir el efecto del esfuerzo de corte y el calentamiento. Una vez atravesada esta etapa, el enfriamiento produce nuevamente un aumento en la viscosidad debido a la retrogradación de la amilosa, llegando a un valor de viscosidad final ( $\eta_f$ ) al terminar el ensayo. Los asentamientos 1 y 2 ( $\eta_f - \eta_{mín} y \eta_f - \eta_p$ , respectivamente) son parámetros que se relacionan entonces con el proceso de retrogradación (Mudgil, Barak, y Khatkar, 2016; Ragaee y Abdel-Aal, 2006).

La Figura 3.3 muestra perfiles representativos obtenidos para la harina de trigo (HT) y el almidón resistente (HM). La harina de trigo presentó un perfil viscoamilográfico típico, en el cual todos los cambios sufridos por el almidón se encuentran bien diferenciados (M. Martínez, Oliete, y Gómez, 2013).

Por el contrario, el almidón resistente no desarrolló perfil alguno, manteniendo su viscosidad a un valor constante cercano al cero a lo largo de todo el ensayo. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores (Aravind et al., 2013; H Liu, Ramsden, y Corke, 1999). La resistencia a la digestión de este almidón estaría relacionada directamente a la incapacidad de gelatinizar que exhiben sus suspensiones, incluso en exceso de agua y con aplicación de esfuerzos de corte.

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 3.3. Perfiles viscoamilográficos representativos de la harina de trigo (HT) y el almidón resistente (HM, superpuesto con el eje x)

Los parámetros de empaste obtenidos para la harina de trigo se muestran en la Tabla 3.6.

Parámetro	HT
T <sub>e</sub> (°C)	89,2 ± 0,5
t <sub>e</sub> (min)	$4,23 \pm 0,04$
η <sub>p</sub> (cP)	$2705 \pm 109$
η <sub>mín</sub> (cP)	1716 ± 70
$\eta_p - \eta_{min}$ (cP)	948 ± 68
η <sub>f</sub> (cP)	3385 ± 68
$\eta_{f} - \eta_{min} (cP)$	$1647 \pm 84$
$\eta_{f} - \eta_{p} (cP)$	680 ± 50

Tabla 3.6. Parámetros viscoamilográficos de la harina de trigo

Promedio ± desvío estándar (n = 5).

En un estudio que relaciona diferentes caracterizaciones de harinas provenientes de distintas variedades de trigo con el volumen específico de pan, los autores encontraron una correlación positiva significativa entre la suma de los factores "contenido proteico + absorción farinográfica de agua + P/L" y un mayor volumen específico del pan. Usando un modelo de regresión lineal múltiple, los autores hallaron que el volumen de pan predicho por el modelo se ajustó a los datos experimentales de volumen con un  $r^2$  = 0,80, estableciéndose así una relación directa entre los parámetros evaluados y el

desempeño de la harina (Van Bockstaele, De Leyn, Eeckhout, y Dewettinck, 2008). En este sentido, los resultados obtenidos en los ensayos para caracterizar la harina del presente trabajo permitirían anticipar que la misma presentará un adecuado desempeño en la panificación, permitiendo obtener piezas de pan de buen volumen.

## 3.1.7. Caracterización térmica de las materias primas

El comportamiento térmico del almidón presente en la harina de trigo, así como el del almidón resistente, se evaluó mediante DSC sobre suspensiones de cada almidón en agua destilada (1:3 almidón:agua). Los termogramas obtenidos se muestran en la Figura 3.4. El almidón de la harina de trigo exhibió una endoterma pronunciada, la cual evidencia un proceso de gelatinización (G en la Figura 3.4). El termograma presentó una segunda endoterma menos pronunciada, asociada a la disociación del complejo amilosa-lípido (A-L en la Figura 3.4). Los parámetros térmicos extraídos del termograma se presentan en la Tabla 3.7.



Figura 3.4. Termogramas representativos del almidón de la harina (HT) y del almidón resistente (HM). G y A-L indican los procesos de gelatinización y disociación del complejo amilosa-lípido, respectivamente

En el caso del almidón HM, no se encontraron picos entre los 5 y los 140 °C, aunque logró visualizarse lo que podría ser considerado como el comienzo de una transición a T > 105 °C aproximadamente (Barros, Telis, Taboga, y Franco, 2018). Estos resultados confirman aquellos observados en los experimentos viscoamilográficos, demostrando que en condiciones de exceso de agua los gránulos de almidón resistente no gelatinizaron incluso a mayores temperaturas.

	Parámetro	Almidón HT	
Gelatinización	Ti (°C)	55,39 ± 0,05	
	T <sub>p</sub> (°C)	61,1 ± 0,4	
	T <sub>f</sub> (°C)	84,8 ± 0,6	
	$\Delta H_{gel} (J/g)$	$12,4 \pm 0,3$	
	T <sub>i</sub> (°C)	91 ± 1	
Disociación del complejo	T <sub>p</sub> (°C)	$100 \pm 1$	
amilosa-lípido	T <sub>f</sub> (°C)	110 ± 1	
	$\Delta H_{A-L} (J/g)$	1,3 ± 0,3	

Tabla 3.7. Parámetros térmicos del almidón de la harina de trigo

Promedio ± desvío estándar.

# 3.2. Caracterización de las premezclas

Con el objetivo de establecer cómo los reemplazos de harina de trigo por HM afectan la calidad panadera de las premezclas, se realizaron las caracterizaciones anteriormente descriptas para la harina sobre las formulaciones con 2% de NaCl y conteniendo distintas proporciones de HM (Sección 2.1.2). Para el caso de los ensayos de *SRC* se omitió la adición de NaCl a las formulaciones debido a que el agregado de componentes solubles que puedan quedar retenidos en el sobrenadante introduciría error en los cálculos y conduciría interpretaciones incorrectas de las características de las muestras.

# 3.2.1. <u>Contenido de gluten de las premezclas</u>

Para la evaluación del contenido de gluten de las premezclas se prepararon las masas correspondientes a cada formulación empleando los parámetros farinográficos A y TD de cada premezcla (Sección 3.2.4, más adelante). Así, se analizó tanto el contenido de gluten como su calidad y sus propiedades de hidratación (Tabla 3.8).

En todos los casos se observó una disminución significativa del contenido de *GH* y *GS* de las premezclas respecto a la harina de trigo (p < 0,05; n = 8). Sin embargo, no se evidenciaron cambios en el valor de *GI*. Por otro lado, el gluten de la harina de trigo

presentó una menor hidratación que el de las premezclas (menor *GH/GS*). Se sugiere que este efecto estaría relacionado con la adición de NaCl, lo que produce modificaciones en la estructuración y movilidad del agua (Yovchev et al., 2017). El análisis comparativo de las premezclas indicó que el contenido de gluten disminuyó progresivamente con la concentración de HM. Este efecto se relacionaría directamente con la metodología de reemplazo utilizada para formular las premezclas, donde el contenido de gluten se diluyó por el empleo de un ingrediente sin gluten, el almidón resistente. Sin embargo, como demostraron los valores de *GI* y los parámetros *GH/GS* y *GH-GS* respecto al control, la calidad del gluten y su capacidad de hidratarse no se vieron afectadas.

Parámetro	Control	HM10	HM20	HM30
GH	$21,4 \pm 0,4^{d}$	19,8 ± 0,6°	17,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	16,1 ± 0,5 <sup>a</sup>
GS	$7,2 \pm 0,1^{d}$	$6,7 \pm 0,4^{c}$	$5,8 \pm 0,2^{b}$	$5,5 \pm 0,3^{a}$
GI	99,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	99,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	99,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	99,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
GH/GS	2,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	<b>2,97 ± 0,07</b> <sup>a</sup>	<b>2,98 ± 0,03</b> <sup>a</sup>	2,94 ± 0,07 <sup>a</sup>
GH-GS	$13,8 \pm 0,3^{d}$	13,2 ± 0,3°	$11,7 \pm 0,3^{b}$	10,6 ± 0,6 <sup>a</sup>

Tabla 3.8. Características del gluten de las premezclas

\* Valores expresados en % p/p. Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 8).

A pesar de esto, el menor contenido total de gluten en las formulaciones con HM podría influir negativamente en las características de los productos finales (Dhingra y Jood, 2004; Sabanis y Tzia, 2009).

### 3.2.2. Distribución de tamaños de partícula de las premezclas

Las distribuciones de tamaño teóricas correspondientes a las premezclas fueron calculadas usando la distribución en volumen de los almidones de la harina y el HM (Sección 3.1.3), teniendo en cuenta las proporciones respectivas de harina y HM en cada formulación. Las distribuciones obtenidas (Figura 3.5) sugieren que la sustitución de harina por HM provocaría un desplazamiento progresivo de los picos principales hacia

menores tamaños y también a una disminución de los picos encontrados a 3,31, 22,91 y 158,49  $\mu$ m, con un pequeño incremento en el pico a 1,10  $\mu$ m.



Figura 3.5. Distribución teórica de los tamaños de partícula para las premezclas. Las flechas señalan la progresión de las distribuciones a mayor contenido de HM

Tabla 3.9. Parámetros de la distribución de tamaños de partícula de las premezclas

		F	Area		
Muestra*	D[4,3] (µm)	D(0,1)	D(0,5)	D(0,9)	superficial específica (m²/m³)
HM10	28,9 ± 0,4	3,708 ± 0,025	19,60 ± 0,07	43,70 ± 1,14	0,706 ± 0,004
HM20	27,3 ± 0,4	3,769 ± 0,026	18,64 ± 0,07	41,40 ± 1,15	0,735 ± 0,004
HM30	25,8 ± 0,4	3,831 ± 0,026	17,68 ± 0,07	39,09 ± 1,18	0,765 ± 0,004
					· · · ·

\* Los valores para las premezclas fueron calculados teóricamente empleando las distribuciones de tamaño de HT y HM. Promedio ± desvío estándar.

Como era esperado, la sustitución de harina por HM en las premezclas produjo distribuciones de volumen desplazadas hacia diámetros más pequeños, un menor valor de D[4,3] y un incremento en el área superficial específica (Tabla 3.9). De esta forma, el efecto principal sobre la distribución de tamaños al reemplazar HT por HM en las premezclas sería el incremento en el número de gránulos de almidón de menor tamaño.

# 3.2.3. <u>Capacidad de retención de solventes de las premezclas</u>

Los valores de capacidad de retención de solventes de las premezclas se presentan en la Tabla 3.10. Se observó un aumento significativo de *WaRC* en las muestras con HM respecto a la harina de trigo (p < 0,05; n = 5). Si bien este parámetro fue similar entre las formulaciones HM10 y HM20, se encontró un aumento significativo al realizarse reemplazos del 30%. Este aumento estaría relacionado con la mayor proporción de almidón en las formulaciones, como se observó también en los ensayos farinográficos. Adicionalmente, la mayor cantidad de gránulos de HM incrementó el área superficial específica promedio de las partículas en las premezclas, permitiendo una mayor interacción entre éstas y las moléculas de agua.

Por otro lado, el *SuRC* disminuyó significativamente en las muestras con HM en comparación con la harina (p < 0,05; n = 5), y fue aún menor en las muestras con mayor porcentaje de reemplazo (HM20 y HM30). En este caso, la metodología de reemplazo estaría produciendo una dilución de los pentosanos en las formulaciones.

Tabla 5.10. Capacidad	i de recención de son	entes de las premez	las
Parámetro*	HM10	HM20	HM30
WaRC	68,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	68,5 ± 0,9ª	$70,2 \pm 0,2^{b}$
SuRC	$107 \pm 2^{b}$	$104 \pm 2^{a}$	$102 \pm 1^{a}$
SCRC	81,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	81,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	$82,0 \pm 0,5^{a}$
LARC	100,4 ± 1,5°	90,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	86,0 ± 0,6 <sup>a</sup>
IDG	0,533 ± 0,007°	0,489 ± 0,006 <sup>b</sup>	<b>0,468 ± 0,005</b> <sup>a</sup>

Tabla 3.10. Capacidad de retención de solventes de las premezclas

\*Valores expresados en % p/p (bs). Mezclas preparadas sin NaCl. Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 5).

En el mismo sentido, el parámetro *LARC* (relacionado con la hidratación de las gluteninas) presentó una disminución marcada y progresiva a medida que el contenido de HM aumentó, lo cual sería producto de un efecto de dilución de las proteínas del gluten, como demostraron resultados anteriores.

Por su parte, el *SCRC* no presentó cambios significativos y, dado que este parámetro se relaciona con la proporción de almidón dañado, podría considerarse que el HM con

el que se prepararon las premezclas presenta un porcentaje de daño similar al de la harina.

Por otro lado, el *IDG* disminuyó progresivamente a medida que aumentó el contenido de HM. Si bien la influencia de los pentosanos se ve disminuida en las premezclas (menores valores de *SuRC*), el peso del efecto del almidón dañado se mantiene constante en todas las premezclas (valores constantes de *SCRC*) y disminuye drásticamente el de las gluteninas (menores valores de *LARC*).

# 3.2.4. Ensayos farinográficos sobre las premezclas

En la Figura 3.6 se presentan farinogramas representativos de los ensayos realizados sobre las premezclas. En ellos se puede observar cómo la zona de la curva relacionada con la absorción de agua por parte del almidón (primeros 2 min) se hace más pronunciada a medida que aumenta el contenido de HM en la formulación. Este efecto se relacionaría con el mayor contenido total de almidón que tienen las premezclas respecto al control. El mismo efecto fue previamente observado en mezclas de harina de trigo y almidón resistente químicamente modificado (Arp, Correa, Zuleta, y Ferrero, 2017).



Figura 3.6. Farinogramas representativos de mezclas a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30

En la Tabla 3.11 se presentan los parámetros farinográficos obtenidos a partir de los ensayos. Al comparar los resultados obtenidos para la harina de trigo con los de la muestra control (harina con adición de 2% de NaCl) se pudo apreciar una disminución significativa en el parámetro A y un aumento muy marcado en E, sin observarse modificaciones en TD y F (p < 0,05, n = 3). Ambos efectos podrían asociarse a un mayor entrecruzamiento entre las proteínas del gluten causado por interacciones iónicas entre sus proteínas.

Tabla 3.11. Parámetros farinográficos de las premezclas

Muestra	A (ml)	TD (min)	E (min)	F (UF)*
Control	55,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	9,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	30,0 ± 3,2°	19 ± 8 <sup>a</sup>
HM10	$58,2 \pm 0,2^{b}$	8,6 ± 1,6 <sup>ab</sup>	22,3 ± 1,7 <sup>b</sup>	$30 \pm 1^{a}$
HM20	60,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	$6,8 \pm 0,2^{a}$	15,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	$57 \pm 13^{b}$
HM30	$63,1 \pm 0,4^{d}$	$6,7 \pm 0,2^{a}$	$12,2 \pm 0,4^{a}$	85 ± 11 <sup>c</sup>

\* UF = Unidades farinográficas.

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 3).

Ukai, Matsumura, y Urade (2008) estudiaron el efecto de la incorporación de NaCl sobre la conformación y las interacciones de las proteínas del gluten, encontrando que su empleo produce tanto un aumento en la hidratación de las  $\alpha/\beta$ -gliadinas y las  $\gamma$ -gliadinas en agua destilada como un aumento en su agregación. Además, este efecto estaría asociado a interacciones iónicas entre los aniones Cl- y aminoácidos específicos de las proteínas del gluten, y no a un efecto de fuerza iónica. Sin embargo, Abedi, Majzoobi, Farahnaky, Pourmohammadi, y Mahmoudi (2018) estudiaron la influencia de la fuerza iónica en diferentes propiedades funcionales del gluten, gliadinas y gluteninas a través del uso de NaCl. Sus resultados indicaron que concentraciones crecientes de NaCl producen un aumento progresivo tanto de la capacidad de retención de agua como de la absorción de agua por parte de estas proteínas. En este caso, los autores propusieron que los iones incorporados como sal producirían un efecto de apantallamiento entre los aminoácidos iónicos de las proteínas, disminuyendo la repulsión o atracción electrostáticas y causando agregaciones por interacciones hidrofóbicas. Adicionalmente, los iones alterarían la forma en la que se estructura el

agua alrededor de las proteínas a través del aumento de interacciones ion-dipolo mediante dos mecanismos: modificando el grado de hidratación y alterando la orientación del agua alrededor de los residuos no polares de las cadenas polipeptídicas. En cualquier caso, la mayor agregación de las proteínas produce un aumento de la consistencia que, en ensayos farinográficos, compensaría los requerimientos de agua para alcanzar las 500 UF definidas por el método.

Al analizar el efecto del HM sobre las propiedades farinográficas de las premezclas pudo observarse un efecto de la concentración en el parámetro A, el cual aumentó significativamente a medida que el contenido de HM fue mayor. Este fenómeno también quedó de manifiesto en los aumentos de consistencia observados en los primeros dos minutos de ensayo mencionados anteriormente al describir los farinogramas (Figura 3.6). El aumento de la proporción de gránulos de almidón de menor tamaño de partícula sería responsable de los valores crecientes de A, ya que al exhibir una mayor área superficial específica éstos podrían ser capaces de interactuar en mayor extensión con las moléculas de agua.

De la tabla también es posible observar una disminución tanto en TD como en E. Varios autores han informado resultados similares en sistemas preparados por la metodología de reemplazo (Barros et al., 2018; Bigne, Puppo, y Ferrero, 2016; Dhingra y Jood, 2004; Fu, Tian, Sun, y Li, 2008; Sanz-Penella et al., 2010). Al formular los productos de esta manera se produce una disminución absoluta del contenido de gluten en la formulación (Tabla 3.8), lo que podría dar lugar a menores tiempos de desarrollo y menor estabilidad farinográficos. Sin embargo, Sabanis, Makri, y Doxastakis (2006) y Sabanis y Tzia (2009) encontraron un efecto contrario en formulaciones de lasagna y pan, respectivamente, preparadas reemplazando harina de trigo por diferentes harinas sin gluten en varios niveles, aunque sin llegar a conclusiones claras respecto a este efecto. De todas formas, estos resultados indicarían que los mecanismos que intervienen en el desarrollo de masas preparadas en presencia de ingredientes sin gluten están regulados por diferentes fenómenos (Yang, Song, y Zheng, 2011).

#### 3.2.5. <u>Perfil viscoamilográfico de las premezclas</u>

Los perfiles viscoamilográficos de las premezclas fueron obtenidos de la misma forma en la que se realizaron para las materias primas. Los perfiles correspondientes a las diferentes formulaciones se presentan en la Figura 3.7.



Figura 3.7. Perfiles viscoamilográficos de las premezclas

La viscosidad exhibida por las muestras preparadas con HM se desplazó, en todo el rango del ensayo, hacia valores cada vez menores a medida que el contenido de almidón resistente fue mayor en la formulación. Para cada perfil fue posible extraer los parámetros de empaste correspondientes, los cuales se presentan en la Tabla 3.12.

Como se puede observar, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros  $T_e$  y  $t_e$ , pero sí se registró una disminución significativa y progresiva en todos los demás parámetros a medida que aumentó el contenido de HM. Estos resultados sugieren que la disminución de la viscosidad se debió principalmente a un efecto de dilución del almidón gelatinizable (el proveniente de la harina) debido al reemplazo de éste por uno no gelatinizable (el almidón resistente). Este comportamiento es el esperado según los resultados obtenidos a través de los ensayos

viscoamilográficos de las materias primas donde el almidón resistente, a diferencia de la HT, no exhibió propiedades de empaste.

Tubla 5.12.1 arametros de empaste de las premezenas					
Parámetro	Control	HM10	HM20	HM30	
Te (°C)	$90,0 \pm 0,6^{a}$	90,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	90,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	91,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	
t <sub>e</sub> (min)	$4,3 \pm 0,1^{a}$	$4,3 \pm 0,1^{a}$	$4,3 \pm 0,1^{a}$	$4,4 \pm 0,0^{a}$	
η <sub>p</sub> (cP)	$2685 \pm 49^{d}$	1975 ± 30°	$1376 \pm 0^{b}$	$829 \pm 5^{a}$	
η <sub>mín</sub> (cP)	$1620 \pm 18^{d}$	1220 ± 52°	$927 \pm 3^{b}$	$593 \pm 6^{a}$	
$\eta_p - \eta_{min} (cP)$	$1066 \pm 30^{d}$	755 ± 23°	$449 \pm 3^{b}$	236 ± 1 <sup>a</sup>	
η <sub>f</sub> (cP)	$3313 \pm 71^{d}$	2550 ± 35°	$1862 \pm 6^{b}$	$1255 \pm 2^{a}$	
η <sub>f</sub> – η <sub>mín</sub> (cP)	$1693 \pm 52^{d}$	1330 ± 17°	$935 \pm 8^{b}$	$662 \pm 8^{a}$	
$\eta_{f} - \eta_{p} (cP)$	$628 \pm 22^{d}$	575 ± 6°	$486 \pm 6^{b}$	$426 \pm 7^{a}$	

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 2).

### 3.3. Reología de masas panarias

#### 3.3.1. <u>Reometría oscilatoria de pequeña amplitud</u>

Tabla 3 12 Parámetros de empaste de las premezclas

Se realizaron barridos de esfuerzo ( $\sigma$ ) a frecuencia constante sobre porciones de masa para evaluar el rango de viscoelasticidad lineal (RVL), es decir, el rango en el cual la muestra exhibe una respuesta (deformación) independiente del esfuerzo aplicado (Figura 3.8). Esta independencia se produce cuando la muestra es sometida a esfuerzos de pequeña amplitud, tales que no afectan irreversiblemente la microestructura de la matriz. En todos los casos, las curvas correspondientes a *G*' exhibieron valores más elevados que las correspondientes para *G*'' en todo el rango de ensayo, y ambas presentaron desplazamientos progresivos hacia mayores valores al incrementarse los niveles de reemplazo.

El análisis de las curvas para obtener el RVL de cada muestra fue realizado sobre las curvas de *G*' debido a que éstas evidenciaron una disrupción de la matriz a menores valores de  $\sigma$  que las de *G*''. Para obtener el valor límite ( $\sigma_{crítico}$ ) de cada RVL se ajustaron los datos de *G*' ubicados en la zona lineal de las curvas a un modelo lineal para obtener

la ordenada al origen (en todos los casos los ajustes se realizaron con  $r^2 \ge 0.7457$ ). Como punto de corte, se consideró como  $\sigma_{crítico}$  al valor de  $\sigma$  al cual se registró una disminución de G' mayor al 5% del valor de la ordenada al origen (Uthayakumaran, Newberry, Phan-Thien, y Tanner, 2002). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.13. En todos los casos el RVL se extendió hasta valores de  $\sigma \ge 7$  Pa. Asimismo, se encontró que los valores de  $\sigma_{crítico}$  aumentaron significativamente en las masas preparadas con 30% de reemplazo por HM. En este sentido, Yang et al. (2011) han sugerido que la elevada proporción de almidón en harinas de trigo permite la formación de una red continua de partículas en conjunto con la red macromolecular de gluten, produciendo un efecto de refuerzo.





adia 3.13. Estuerzos de corte críticos del RVL de las masas		
Muestra $\sigma_{crítico}$ (Pa)		
Control 8 ± 1 <sup>a</sup>		
HM10 7 ± 1 <sup>a</sup>		
HM20 $9 \pm 0^a$		
HM30 11 ± 1 <sup>b</sup>		

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 4).

Los espectros mecánicos fueron obtenidos a un  $\sigma$  constante de 5 Pa (menor al  $\sigma_{crítico}$ ) y son mostrados en la Figura 3.9. Como puede observarse, en todos los casos el módulo de almacenamiento fue superior a su respectivo módulo de pérdida en todo el rango de frecuencias estudiado, indicando así una predominancia del carácter sólido. Se registró además una dependencia de los módulos elásticos con la frecuencia en todo el rango estudiado. Sin embargo, los módulos viscosos mostraron una ligera independencia con la frecuencia a valores de  $\omega < 0,05$  Hz, aproximadamente. Este efecto fue aún más notorio en la masa HM30, en la cual la independencia se extiende hasta valores de  $\omega \approx 0,1$  Hz.



Figura 3.9. Espectros mecánicos de las masas

Los espectros de G' fueron progresivamente desplazados hacia mayores valores a medida que el contenido de HM aumentó en la formulación, efecto que fue más notorio a los valores de  $\omega \le 1$  Hz. Al aumentar la frecuencia se evidenció un solapamiento de todos los espectros excepto el de HM30, el cual se mostró desplazado a valores más elevados al resto de las muestras en todo el rango de frecuencias.

Un efecto similar fue encontrado en los espectros de G''. En este caso, el solapamiento de los espectros del control, HM10 y HM20 parece tener lugar a partir de valores de  $\omega$ 

 $\approx$  0,1 Hz, mientras que HM30 presenta valores de *G*<sup>"</sup> superiores en todo el rango de  $\omega$ , especialmente a bajas frecuencias.

Con el objetivo de analizar el peso relativo entre los comportamientos viscoso y elástico de las masas se evaluó el comportamiento de tan  $\delta$  en función de  $\omega$  (Figura 3.10).



Figura 3.10. Gráfico de los valores de tan $\delta$  en función de  $\omega$ 

En él es posible notar que en la zona de bajas frecuencias del gráfico se produjo un descenso de los valores de tan  $\delta$ , los cuales atravesaron un mínimo a frecuencias intermedias para luego aumentar su valor progresivamente. Esto sugiere que, a bajas frecuencias, el aumento de la  $\omega$  de deformación produjo incrementos del módulo elástico en mayor proporción que los producidos sobre el módulo viscoso. Sin embargo, este comportamiento se invirtió luego de superar valores de  $\omega \ge 0,1$  Hz, donde el módulo viscoso comenzó a aumentar a mayor velocidad que el elástico. Los mínimos fueron registrados a valores de  $\omega \simeq 0,1$  hasta  $\omega \approx 0,5$  para el control y HM30, respectivamente). Este hecho se relaciona con el período de independencia de *G*" con  $\omega$ 

(para  $\omega \le 0,1$  Hz), donde este módulo permanece prácticamente constante mientras G' aumenta.

Por otro lado, si bien a valores de  $\omega \le 0,1$  Hz las curvas de tan  $\delta$  de las diferentes masas se encontraron solapadas, para valores de  $\omega \ge 0,1$  Hz las curvas se mostraron bien diferenciadas entre muestras. Éstas se desplazaron a valores menores a medida que el contenido de HM aumentó en todo el rango de frecuencias estudiado. Dado que la tan  $\delta$  puede interpretarse como la relación entre *G*" y *G*' (Ecuación 2.15), el desplazamiento hacia menores valores de tan  $\delta$  indicaría que en las muestras con mayor contenido de HM aumenta el peso que tiene el comportamiento elástico sobre el viscoso.

Adicionalmente, las curvas de *G*' y *G*" pudieron ser ajustadas a la ley de la potencia (Ecuación 2.16 y Ecuación 2.17, respectivamente). Mientras que en el caso de *G*' se logró un ajuste exitoso en todo el rango de frecuencias ( $r^2 \ge 0,9776$ ), en el caso de *G*", el ajuste fue realizado en el rango de frecuencias  $\omega \ge 1$  Hz ( $r^2 \ge 0,9324$ ) debido al comportamiento no lineal observado a bajas frecuencias. Los parámetros obtenidos son listados en la Tabla 3.14.

	<i>G'</i> v	s. ω	
	$\log a^*$	n (Pa Hz <sup>-1</sup> )	Prueba F
Control	4,076 ± 0,007	0,217 ± 0,005	а
HM10	4,123 ± 0,004	0,200 ± 0,003	b
HM20	4,175 ± 0,004	0,181 ± 0,003	С
HM30	4,383 ± 0,005	0,158 ± 0,004	d
	<i>G"</i> vs	s. ω†	
	$\log b^*$	<i>m</i> (Pa Hz <sup>-1</sup> )	Prueba F
Control	3,55 ± 0,02	0,32 ± 0,01	а
HM10	3,55 ± 0,01	0,31 ± 0,01	а
HM20	3,55 ± 0,01	0,31 ± 0,01	а
111400			

Tabla 3.14. Parámetros del modelado de los espectros mecánicos

\* Valores de *a* y *b* se encuentran en Pa.

† Valores de *G*" para  $\omega \ge 1$  Hz.

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas en los conjuntos de datos ajustados (p < 0,05; n = 6).

En el caso de *G*' se observó una disminución significativa de la pendiente a concentraciones crecientes de HM, así como también un desplazamiento de la curva a valores mayores, como puede ser deducido del incremento en el log *a*. Disminuciones en la pendiente por incrementos en la cantidad de fibra fueron reportados previamente por Ahmed, Almusallam, Al-Salman, AbdulRahman, y Al-Salem (2013), y este comportamiento se ha relacionado con el aumento en las propiedades sólidas de las masas, ya que muestras con una pendiente de valor cero en el modelo de la ley de la potencia son considerados como geles verdaderos (autoportantes).

Para G'', sólo la muestra HM30 se desplazó hacia mayores valores, como indican los valores de log *b*. No se encontraron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas para G''.

Adicionalmente, se construyó un gráfico de *G*' vs. *G*" (Figura 3.11) ya que este tipo de representación se ha utilizado con éxito para analizar posibles diferencias microestructurales cuando se estudia la incorporación de nuevos ingredientes a la formulación (Ahmed et al., 2013; M. Salinas, Carbas, Brites, y Puppo, 2015).



Figura 3.11. Gráfico de valores de G' en función de G"

Las curvas para el control, HM10 y HM20 se mostraron solapadas, lo cual es indicativo de características microestructurales similares. Sin embargo, HM30 presentó un desplazamiento a mayores valores tanto para *G*' como para *G*'', y su gráfico no se superpuso con los de las demás muestras estudiadas. Este comportamiento indicaría que la matriz de la masa HM30 presenta características microestructurales distintivas, lo que da lugar a un comportamiento viscoelástico diferente.

Estas curvas también fueron ajustadas a la ley de la potencia linealizada usando los valores de *G*' y *G*" a  $\omega \ge 1$  Hz ( $r^2 \ge 0.9523$ ) (Tabla 3.15). Los valores de las ordenadas al origen y las pendientes sugieren que todas las muestras presentaron diferencias en la microestructura de la matriz respecto al control. El efecto, sin embargo, sería mucho más evidente para HM30 dado el marcado aumento registrado en la ordenada al origen para esta muestra.

Tabla 3.15. Parámetros del ajuste de las curvas G'vs. G" a un modelo lineal

	G' VS. G''*		
	Ord. orig.†	Pendiente	Prueba F
Control	1,34 ± 0,06	0,76 ± 0,02	а
HM10	$1,50 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,01$	b
HM20	$1,76 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,01$	С
HM30	2,17 ± 0,07	0,59 ± 0,02	d

\* Valores de *G*' y *G*" para  $\omega \ge 1$  Hz.

† Ordenada al origen.

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas en los conjuntos de datos ajustados (p < 0,05; n = 6).

Genovese (2012) describió un modelo compuesto de tipo relleno-matriz en el cual las partículas (el relleno), consideradas como esferas viscoelásticas, llenan una matriz continua, isotrópica y viscoelástica. El efecto reológico que este relleno provoca en el sistema es el refuerzo del módulo elástico, debido a que las partículas actuarían como una carga sólida. Por otro lado, también se produciría un incremento en el módulo viscoso debido a procesos de disipación de energía por la fricción entre partículas. Este "efecto de carga sólida" podría explicar lo observado en la Figura 3.9, donde las muestras con mayor contenido de HM presentaron valores mayores de *G*' en todo el rango de frecuencias. Particularmente, la masa HM30 exhibió el mayor incremento en el comportamiento sólido, probablemente porque la estructura de la matriz ha cambiado drásticamente. A este nivel de reemplazo, la red de gluten parece estar fuertemente afectada.

Basados en los conceptos anteriores, el diferente comportamiento de *G*" a bajas y altas frecuencias podría ser explicado por las principales interacciones que tienen lugar entre los componentes de la masa. A bajas frecuencias, la reología es gobernada principalmente por las interacciones partícula-partícula. Bajo estas condiciones, la fricción entre partículas sería responsable de una disipación de energía adicional que llevaría a un incremento en el módulo de pérdida a niveles crecientes del relleno (HM). En cambio, a mayores frecuencias, las interacciones partícula-matriz son dominantes (Rueda et al., 2016). Esto podría explicar la superposición observada para *G*" entre el control, HM10 y HM20. Sin embargo, ya que HM30 es una matriz altamente cargada, el fenómeno de fricción en esta muestra podría encontrarse acentuado, dando lugar a un aumento de *G*" sobre todo el rango de frecuencias respecto a los sistemas menos cargados.

El modelo compuesto relleno-matriz podría entonces explicar tanto el incremento marcado de G', como el comportamiento a diferentes frecuencias de G'' y los cambios micro estructurales observados para HM30 respecto a las demás muestras.

#### 3.3.2. <u>Relajación de la masa</u>

Se obtuvieron las curvas de esfuerzo en función del tiempo de las diferentes masas, las cuales ajustaron con éxito a un modelo de Maxwell constituido por dos elementos de Maxwell en paralelo y un resorte también en paralelo. Para esta configuración el modelo se representa como se muestra en la Figura 3.12. En este caso, los polímeros que otorgan sus propiedades viscoelásticas a la masa están representados por los dos elementos de Maxwell en paralelo, mientras que el resorte restante está asociado al esfuerzo de equilibrio exhibido por la masa. Este último elemento es necesario debido a que las masas analizadas se comportaron como sólidos viscoelásticos, almacenando parte de su energía en los enlaces de los polímeros que la conforman. Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 3.12. Esquema del modelo de relajación de una masa

Bajo el modelo propuesto, la ecuación general utilizada para describir la relajación de sistemas viscoelásticos (Ecuación 2.18) se reescribe como (Ecuación 3.1):

$$\varepsilon(x) = \varepsilon_1 e^{-x/t_1} + \varepsilon_2 e^{-x/t_2} + \varepsilon_e$$
 Ecuación 3.1

donde  $\varepsilon$  (*x*) es el esfuerzo, *x* es el tiempo,  $\varepsilon_1$  y  $\varepsilon_2$  son los esfuerzos de decaimiento de cada componente de Maxwell,  $t_1$  y  $t_2$  son los diferentes tiempos de relajación para cada uno de esos elementos, respectivamente, y  $\varepsilon_e$  es el esfuerzo de equilibrio que alcanzaría la masa tras un tiempo de relajación  $x \to \infty$ .

En la Figura 3.13 se presenta, a modo ilustrativo, una curva de relajación obtenida a partir de la masa control ajustada al modelo de Maxwell (Ecuación 3.1). Para todas las muestras analizadas fue posible realizar el ajuste, a partir de 6 replicados, con un  $r^2$  *ajustado*  $\geq 0,74014$ . A partir de los mismos se obtuvieron los tiempos de relajación ( $t_1$  y  $t_2$ ) y los coeficientes pre-exponenciales ( $\varepsilon_1$  y  $\varepsilon_2$ ) para cada elemento de Maxwell, y el esfuerzo de equilibrio ( $\varepsilon_e$ ) para el resorte. Los mismos se presentan en la Tabla 3.16.



Figura 3.13. Curva de relajación representativa ajustada al modelo de Maxwell

Al elaborar una masa panaria, la hidratación de las proteínas del gluten es responsable de las propiedades viscoelásticas emergentes características de este tipo de sistemas. El ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 3.1 sugiere que estos polímeros pueden diferenciarse en dos fracciones bien definidas según su comportamiento ante la aplicación de una deformación constante en el tiempo. En este sentido, el comportamiento viscoelástico de las masas se conforma de una fracción que relaja a tiempos cortos (ver  $t_1$  en la Tabla 3.16), con esfuerzos de decaimiento ( $\varepsilon_1$ ) elevados y progresivamente mayores a medida que aumenta el contenido de HM desde 10% hasta 30%. En un sistema compuesto en el cual se modifica marcadamente la proporción de almidón respecto a los demás componentes de la harina, el aumento de  $\varepsilon_1$  en esta fracción se relaciona con el mayor carácter sólido que aportan los gránulos de almidón, como se describiera anteriormente en los ensayos de reometría oscilatoria.

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Tabla 5.10. Tatametros de relajación de las masas				
Parámetro	Control	HM10	HM20	HM30
ε <sub>e</sub> (Pa)	2,93 ± 0,01	2,41 ± 0,01	3,79 ± 0,01	5,95 ± 0,01
ε1 (Pa)	$44 \pm 0$	$44 \pm 1$	50 ± 1	87 ± 1
<i>t</i> <sub>1</sub> (s)	7,12 ± 0,04	5,86 ± 0,09	6,61 ± 0,05	5,33 ± 0,05
ε2 (Pa)	5,67 ± 0,01	4,78 ± 0,02	6,39 ± 0,01	8,42 ± 0,02
$t_{2}(s)$	$301 \pm 1$	275 ± 2	311 ± 1	293 ± 2
r² ajustado	0,91844	0,74014	0,88873	0,84196
Prueba F	а	b	С	d

Tabla 3.16. Parámetros de relajación de las masas

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas en los conjuntos de datos ajustados (p < 0.05; n = 6).

La segunda fracción, por el contrario, relaja a tiempos más extensos (ver  $t_2$  en la Tabla 3.16), pero presenta también mayores valores de  $\varepsilon_2$  a medida que el contenido de HM aumenta desde 10% a 30%. Varios autores han relacionado los cortos tiempos de relajación con la presencia de proteínas de bajo peso molecular, por lo que la presencia de tiempos de relajación extensos se asociaría a fracciones de mayor tamaño, como pueden ser las HMW-GS (Chen, Shiau, y Fu, 2016; Jekle y Becker, 2015).

Por otra parte, los esfuerzos de equilibrio ( $\varepsilon_e$ ) encontrados en las masas también fueron mayores a medida que aumentó la proporción de HM. Estos esfuerzos están relacionados con la componente elástica (relacionado a los sólidos) del sistema (Akbarian, Koocheki, Mohebbi, y Milani, 2016). A su vez,  $\varepsilon_1$  y  $\varepsilon_2$  se relacionan con el comportamiento elástico de cada elemento de Maxwell (resortes asociados a  $E_1$  y  $E_2$  en la Figura 3.12). Entonces, el aumento progresivo en todos los esfuerzos analizados indicaría que el empleo de almidón resistente efectivamente produce un aumento global del carácter sólido de la masa, el cual no se puede asociar directamente a alguna de las fracciones poliméricas presentes.

#### 3.3.3. <u>Análisis del perfil de textura</u>

En análisis del perfil de textura (TPA) de las masas panarias es un ensayo reológico empírico que, al igual que los ensayos reológicos de pequeña amplitud, puede ser útil a la hora de establecer relaciones entre las características reológicas de la masa y la calidad del producto final obtenido a partir de ella. La Figura 3.14 muestra un perfil típico representativo de las muestras analizadas.

En el perfil se puede observar un primer pico que representa el primer ciclo de compresión (descenso y parte del ascenso de la sonda), seguido de un pico de fuerza negativa (ascenso y detención de la sonda) y otro pico positivo (segundo ciclo de compresión). A partir de los perfiles se obtuvieron los parámetros texturales como se describió en la Sección 2.2.7.2.



Figura 3.14. TPA típico de las masas panarias analizadas

Los parámetros extraídos de los perfiles de textura se muestran en la Tabla 3.17. A partir de ellos se pudo observar un incremento significativo en la dureza de las masas cuando estas fueron preparadas mediante reemplazos del 20% y el 30%, siendo más notorio el efecto en esta última. Este parámetro está asociado directamente a la fuerza que es necesario aplicar a la masa para producir una deformación por compresión, en este caso, del 40% respecto a la altura original de la muestra. Un aumento en este parámetro estaría asociado a una masa más firme.

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Tubla 5.17. Tut ameti os textar ares de las masas panarias				
	Control	HM10	HM20	HM30
Dureza (N)	$1,3 \pm 0,2^{a}$	1,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	$1,6 \pm 0,4^{b}$	2,0 ± 0,3 <sup>c</sup>
Consistencia (N.s)	8,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	9,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	9,9 ± 1,1°
Cohesividad	0,75 ± 0,02 <sup>b</sup>	$0,74 \pm 0,02^{a}$	<b>0,74 ± 0,02</b> <sup>a</sup>	$0,74 \pm 0,02^{a}$
Adhesividad (N.s)	$3,5 \pm 0,5^{a}$	$3,6 \pm 0,6^{a}$	$4,5 \pm 0,7^{b}$	$4,5 \pm 0,6^{b}$
Elasticidad	<b>0,92 ± 0,01</b> <sup>a</sup>	<b>0,91 ± 0,01</b> <sup>a</sup>	<b>0,91 ± 0,02</b> <sup>a</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>b</sup>
Resiliencia	0,076 ± 0,009 <sup>d</sup>	$0,070 \pm 0,008^{\circ}$	$0,061 \pm 0,008^{b}$	0,054 ± 0,009 <sup>a</sup>
Gomosidad (N)	$1,0 \pm 0,2^{a}$	$1,0 \pm 0,2^{a}$	$1,2 \pm 0,3^{b}$	1,5 ± 0,3°

Tabla 3.17. Parámetros texturales de las masas panarias

Promedio ± desvío estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 32).

En el mismo sentido, la consistencia de la masa también se caracterizó por un aumento significativo en las masas HM20 y HM30, nuevamente con un incremento más marcado en esta última. Estos resultados son coherentes con los incrementos observados en los valores de *G*' de las masas con HM, y podrían estar relacionados con el mayor número de partículas discretas presentes en la masa (gránulos de almidón).

Respecto a la cohesividad, si bien se encontró que la masa control presentó un valor significativamente más elevado para este parámetro que las masas preparadas con HM, se espera que las diferencias observadas no den lugar a modificaciones tecnológicas importantes. La cohesividad es un parámetro que se obtiene de la relación entre las áreas del segundo y primer pico del TPA, por lo que se relaciona con la capacidad de los componentes de la masa para permanecer unidos entre sí. Masas con buena cohesividad tendrán entonces la capacidad de deformarse sin romperse, mientras que una baja cohesividad sería indicadora de una masa más débil y menos tolerante a la deformación.

La adhesividad de la masa se incrementó en las masas HM20 y HM30. Este efecto podría relacionarse con varios efectos: la disminución en la cantidad de proteínas, el menor desarrollo de la red de gluten y la mayor cantidad de agua utilizada para elaborar estas masas (mayor A en ensayos farinográficos). El resultado de estos efectos sería la disminución de la proporción de agua ligada. Así, el agua tendrá mayor libertad para migrar hacia la zona superficial de la masa e interactuar con la superficie de mesadas e instrumentos, dificultando su manipulación. Algunos autores han sugerido además que

los productos obtenidos a partir de masas muy adhesivas pueden gozar de menor aceptabilidad por parte de los consumidores debido a que parte de su adhesividad puede trasladarse al producto final, dando como resultado migas más duras, que se adhieren al paladar y pueden parecer poco cocidas (Yi, Kerr, y Johnson, 2009).

La elasticidad mostró un aumento significativo en HM30, aunque, al igual que lo observado sobre la cohesividad, no se espera que las masas presenten diferencias notables en su manipulación ya que en todos los casos los valores obtenidos fueron elevados.

Por otro lado, los valores de resiliencia presentaron una disminución progresiva con el incremento de la concentración de HM. Dado que la resiliencia es un parámetro relacionado con la velocidad de recuperación de la masa mientras está siendo deformada, el efecto que las concentraciones crecientes de HM tienen en la disminución de este parámetro podría explicarse por medio de dos mecanismos que ocurrirían simultáneamente. Por un lado, mayor proporción de HM en las masas da lugar a menos contenido de gluten en las mismas, por lo que estas perderían capacidad para recuperar rápidamente su estructura. Por el otro lado, como se describió en los ensayos de reología oscilatoria a la luz del modelo compuesto relleno-matriz, en muestras con HM la recuperación de la masa se vería afectada debido a una mayor disipación de energía producida por la fricción de las partículas.

Finalmente, los valores de gomosidad fueron en el mismo sentido que la dureza, principalmente debido a que este parámetro es calculado como el producto de la dureza y cohesividad.

El análisis del perfil de textura de las masas indicó que, en general, el uso de HM en la elaboración de las mismas da como resultado masas más firmes, más adhesivas y menos resilientes, sin afectar en gran medida los demás parámetros. Los resultados mostraron que todas las masas presentaron propiedades texturales aptas para su manipulación durante el proceso de panificación.

# 3.4. Propiedades fisicoquímicas de las masas

# 3.4.1. <u>Humedad</u>

El contenido de humedad en las masas tiene una gran influencia en el comportamiento reológico de las mismas. Por esto, la cantidad de agua utilizada en la formación de la masa tendrá implicancias en la mayor o menor facilidad para su manipulación durante el proceso de panificación y determinará la capacidad de la matriz viscoelástica para retener el gas generado por las levaduras durante la fermentación (Cauvain y Young, 2008).

La Tabla 3.18 presenta los valores de humedad de las diferentes masas estudiadas. En ella se puede verificar que la humedad de las masas aumenta significativamente y de forma progresiva a medida que se incrementa el contenido de HM, lo cual está directamente asociado con la cantidad de agua utilizada para su elaboración según los resultados de los ensayos farinográficos (Sección 3.2.4).

Tabla 3.18. Contenido de humedad de las masas panarias

Muestra	Humedad (g/100 g, bh)
Control	$43,6 \pm 0,1^{a}$
HM10	$44,2 \pm 0,3^{\rm b}$
HM20	44,7 ± 0,3°
HM30	$45,1 \pm 0,4^{d}$

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

Dado que el contenido de gluten fue progresivamente menor cuando se utilizaron concentraciones crecientes de HM en la formulación y que no se detectaron modificaciones en la capacidad de hidratación del mismo (Sección 3.2.1), los resultados indicarían que el aumento en el contenido de humedad está directamente relacionado con el mayor contenido de almidón resistente.

#### 3.4.2. Actividad acuosa

La actividad acuosa, *a<sub>w</sub>*, de un alimento es una medida la movilidad que las moléculas de agua presentan en la matriz del alimento, lo cual se relaciona a su vez con la disponibilidad que tiene el agua para participar en reacciones químicas.

Las  $a_w$  encontradas para las masas de las diferentes formulaciones se enumeran en la Tabla 3.19.

abia 5.19. Activitati actiosa de las masas panarias		
Muestra	$a_w$	
Control	$0,978 \pm 0,004^{a}$	
HM10	$0,980 \pm 0,004^{a}$	
HM20	$0,979 \pm 0,003^{a}$	
HM30	$0,979 \pm 0,003^{a}$	

Table 2.10 Activided equese de les mases paparies

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

Como puede apreciarse, todas las masas presentaron valores de  $a_w$  elevados, sin evidencia de que el empleo de HM haya producido cambios en la disponibilidad del agua en el sistema.

#### 3.4.3. pH de las masas

El pH de una masa panaria está modulado esencialmente por los pKa de los aminoácidos que componen a las proteínas del gluten, los cuales otorgan a la masa un pH cuyo valor ronda entre 5 y 6 (M. V. Salinas, 2013). El pH de la masa será determinante en dos etapas críticas del proceso de panificación: el amasado y la fermentación. Durante el amasado se produce el entrecruzamiento de las proteínas del gluten, dando lugar a la formación del macropolímero de gluteninas. Un pH muy bajo podría llevar a la protonación de algunos grupos carboxílicos presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos aumentando la carga positiva neta de las proteínas del gluten. Esta situación debilita las interacciones intercatenarias por repulsión iónica (Stauffer, 2007). Asimismo, para una óptima fermentación es preferible un pH  $\approx$  5. Los valores de pH encontrados en las masas se presentan en la Tabla 3.20.

## Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Tabla 3.20. pH de las masas	
Muestra	pН
Control	$5,88 \pm 0,04^{d}$
HM10	5,83 ± 0,02 <sup>c</sup>
HM20	5,71 ± 0,01 <sup>b</sup>
HM30	5,65 ± 0,04 <sup>a</sup>

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

El aumento de la concentración de HM llevó a una disminución significativa y progresiva del pH de las masas debido posiblemente al aumento de la proporción de almidón resistente, cuyo pH en solución 20% p/p fue de 5,5.

#### 3.4.4. <u>Movilidad molecular por RMN-1H</u>

Los ensayos de RMN de protones pueden utilizarse para evaluar la movilidad molecular de los sistemas. Las curvas de decaimiento obtenidas por esta técnica guardan información acerca de los diferentes entornos que rodean a los protones, afectando su movilidad.

Para su análisis se realizó el ajuste de estas curvas al modelo exponencial para n = 1, 2 o 3, siendo n el número de términos en el modelo general (Ecuación 2.21). El éxito de cada modelo fue evaluado comparativamente a través de pruebas F con un nivel de significación de  $\alpha$  = 0,05. En todos los casos, el modelo con dos términos (n = 2, Ecuación 3.2) presentó la mayor probabilidad de ser correcto.

$$I = I_0 + A_1 * e^{-x/T_{21}} + A_2 * e^{-x/T_{22}}$$
 Ecuación 3.2

donde *I* es la intensidad de la señal de los protones en la muestra (en voltios),  $I_0$  es la intensidad residual de decaimiento,  $A_1$  y  $A_2$  representa la proporción de protones en el estado  $T_{21}$  y  $T_{22}$ , respectivamente (en voltios), y  $T_{21}$  y  $T_{22}$  son los tiempos de relajación transversal de cada población de protones (en milisegundos).

La Figura 3.15 muestra, a modo de ejemplo, el resultado del ajuste realizado para la masa HM30. Por otro lado, los parámetros obtenidos del ajuste se presentan en la Tabla 3.21.



Figura 3.15. Ajuste de los datos obtenidos por RMN-<sup>1</sup>H para la masa HM30 al modelo propuesto (Ecuación 3.2)

Dado que el número de términos está relacionado con las poblaciones de protones con diferente movilidad, los resultados indicaron que las masas estudiadas contienen poblaciones de protones con dos entornos diferentes. Se observó una disminución progresiva del valor de  $A_1$  cuando el nivel de reemplazo superó el 10%, y un aumento progresivo de  $A_2$  en todos los niveles estudiados.

Por otro lado, los tiempos de relajación transversales  $T_{21}$  y  $T_{22}$  están relacionados con la mayor o menor movilidad de los protones en cada entorno. Mayores valores de  $T_2$  indican mayor movilidad. Como se puede ver en la tabla, no se encontraron variaciones importantes respecto al control para los valores de  $T_{21}$  o  $T_{22}$ . Esto indicaría que las dos poblaciones están rodeadas por entornos que son similares en todas las masas.
	Control	HM10	HM20	HM30
Io (V)	0,216 ± 0,006	0,224 ± 0,005	0,235 ± 0,006	0,220 ± 0,003
$A_1$ (V)	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,03	$0,17 \pm 0,01$
<i>T</i> <sub>21</sub> (ms)	2,5 ± 0,5	$2,6 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,3$
<i>A</i> <sub>2</sub> (V)	0,38 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,51 ± 0,01
<i>T22</i> (ms)	13 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	$12 \pm 0$
<i>r</i> ² ajustado	0,9830	0,9898	0,9867	0,9956
Prueba F	а	b	С	d
$(A_1 + A_2)$	0,58 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,65 ± 0,04	0,68 ± 0,01

Tabla 3.21. Parámetros del ajuste de los datos de RMN-1H al modelo exponencial

Promedio  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en la prueba F indican diferencias significativas entre los conjuntos de datos (p < 0.05; n = 6).

Asimismo, dado que los valores de  $A_1$  y  $A_2$  indican la proporción de protones en cada uno de los entornos, la suma  $(A_1 + A_2)$  sería un indicativo de la cantidad total de éstos en la muestra. El valor de  $(A_1 + A_2)$  fue progresivamente mayor a medida que aumentó el contenido de HM por encima del 10%, y esto estaría relacionado con la mayor cantidad de agua utilizada en la preparación de las masas. Sin embargo, el agua no estaría distribuida de la misma manera en todas las muestras, según lo demostraron los valores individuales de  $A_1$  y  $A_2$  previamente descriptos. Así, analizando los pares  $A_1:T_{21}$ v  $A_2:T_{22}$ , los resultados indicaron que hubo una disminución en la proporción de protones con menor movilidad (relacionados al agua más ligada) y aumento en la proporción de protones con mayor movilidad (relacionados al agua más libre) cuando el nivel de reemplazo con HM se incrementa desde 0 hasta 30%. Este fenómeno se debería a la disminución de la cantidad de proteínas del gluten, ya que estas son capaces de ligar fuertemente al agua, y al aumento del contenido de almidón resistente, el cual no sería tan eficaz al momento de inmovilizar el agua. Los resultados serían consistentes con aquellos reportados en los farinogramas y los ensayos de SRC (Secciones 3.1.4 y 3.2.3). En éstos últimos fue posible observar una mayor capacidad de retener agua en las premezclas con mayor contenido de almidón resistente y menor contenido de gluten. Sin embargo, si bien el HM presentó gran capacidad para retener agua, la ausencia de evidencia de hinchamiento observada para este almidón en los experimentos realizados en el RVA (Sección 3.1.6) indicaría que el agua estaría ligada

de forma más superficial. Así, la capacidad de aumentar la retención de agua en las premezclas al emplear concentraciones crecientes de HM estaría relacionada con su pequeño tamaño de partícula y su elevada área superficial específica (Secciones 3.1.3 y 3.2.2).

El comportamiento de las poblaciones de protones encontradas en el presente trabajo es coherente con los resultados observados por Doona y Baik (2007), quienes estudiaron los tiempos de relajación spin-spin y sus dependencias con el contenido de humedad de masas panarias y sistemas modelo compuestos por gluten y almidón de trigo. Los autores reportaron dos poblaciones de protones distinguibles en masas panarias con un rango de humedad entre 33,1 y 47,2%. La primera población, pequeña y localizada a  $T_2 = 0,1$  ms, no mostró una dependencia fuerte con el contenido de humedad. La segunda población, en cambio, fue dependiente del contenido de humedad y se ubicó entre valores de  $T_2$  de 3 y 10 ms de acuerdo a valores de humedad crecientes. A su vez, al máximo valor de humedad estudiado se encontraron indicios de un solapamiento de picos en el rango de  $T_2$  de esta última población. Esta tercera población se ubicaría entre las dos poblaciones descriptas anteriormente, evidenciándose por la presencia de un hombro en la región izquierda del pico ubicado a  $T_2 = 10$  ms.

Al analizar los patrones de  $T_2$  para los sistemas modelo almidón:agua y gluten:agua (41,1% de humedad) los autores confirmaron que ambos presentaron 3 poblaciones de protones. Éstas se encontraron ubicadas en valores de  $T_2$  similares a los encontrados en la masa con mayor contenido de humedad y fueron más fácilmente distinguibles en el sistema gluten:agua, encontrándose más solapadas la segunda y tercera población en el sistema almidón:agua. Los resultados encontrados por estos autores indicaron que no sería posible asociar cada población de protones a uno u otro componente de la masa en forma directa ya que en ambos sistemas modelo se encontraron poblaciones de protones ubicadas en valores de  $T_2$  similares, observándose diferencias sólo en la intensidad y en la forma de los picos.

En el presente trabajo, las dos poblaciones de protones halladas estarían asociadas a entornos de diferente movilidad tanto en el gluten como en el almidón.

#### 3.5. Transiciones térmicas de la masa

Las masas fueron evaluadas a través de ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con el objetivo de estudiar las transiciones térmicas que tienen lugar durante la cocción, proceso que permite la transformación de la masa panaria en miga de pan. Este fenómeno involucra principalmente transiciones térmicas a nivel de la fracción almidonosa. La energía involucrada en el proceso y las temperaturas a las cuales tienen lugar estas transiciones se obtuvieron mediante el análisis de los termogramas (Figura 3.16).



Figura 3.16. Termogramas representativos de masas a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30. P1 y P2 indican los picos relacionados al proceso de gelatinización y A-L a la disociación de los complejos amilosa-lípido.

Los termogramas mostraron el comportamiento típico esperado para la gelatinización bajo condiciones de restricción de agua, dando endotermas dobles correspondientes a un proceso que ocurre en dos pasos (Figura 3.16, P1 y P2). Esto difiere de lo observado durante la caracterización de las materias primas (Sección

3.1.7), donde las suspensiones de almidón fueron preparadas con un nivel de hidratación del almidón de 75% (bh). En estos sistemas la presencia de un solo pico con menores temperaturas de transición y mayores entalpías fue atribuida a la mayor disponibilidad de agua por parte del almidón (Eliasson, 1980).

En función de la cantidad de almidón presente en la harina y las premezclas, y a las cantidades de agua empleadas para la elaboración de las masas según los ensayos farinográficos, la hidratación del almidón en las masas estuvo comprendida entre 45,3 y 46,7 g H<sub>2</sub>O/100 g de almidón (bh) para el control y HM30, respectivamente. Kovrlija y Rondeau-Mouro (2017) reportaron endotermas de forma similar a las encontradas en este trabajo cuando analizaron por DSC suspensiones de almidón de trigo con niveles de hidratación desde 34,71 hasta 49,82% (bh).

En la Tabla 3.22 se presentan los parámetros térmicos extraídos de los termogramas de las diferentes masas. Como puede observarse en ella, no hubo diferencias significativas en las  $T_i$  para las diferentes formulaciones, pero se detectaron desplazamientos progresivos hacia temperaturas menores en  $T_{p1}$  y, especialmente, en  $T_{p2}$  y  $T_f$  a medida que el contenido de HM aumentó. Este comportamiento estuvo, a su vez, acompañado de un descenso progresivo en la entalpía de gelatinización evaluada en base al almidón total en la muestra (almidón de trigo y almidón resistente). Sin embargo, cuando las entalpías fueron expresadas en base al almidón gelatinizable, es decir, al almidón de trigo, no se observaron diferencias significativas entre muestras. Esto indica que el empleo de HM no altera la capacidad de gelatinización del almidón de trigo.

En el caso de la disociación del complejo amilosa-lípido (A-L en la Figura 3.16) la disminución fue evidente en todos los parámetros.

Evans y Haisman (1982) propusieron que, en un primer paso, los cristales más débiles interactúan con el agua disponible y pueden fundirse, dando un primer pico (correspondiente a P1 en la Figura 3.16). Luego, los cristales más estables que tienen menos agua disponible para interactuar gelatinizan a mayores temperaturas, donde aparece el segundo pico (correspondiente a P2 en la Figura 3.16). Los autores también

informaron que este fenómeno fue particularmente evidente para la T<sub>f</sub> más que para la  $T_i$ , lo cual es consistente con los resultados presentados en el presente trabajo.

	Gelatinización del almidón					
	T <sub>i</sub> (°C)	T <sub>p1</sub> (°C)	T <sub>p2</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	$\Delta H_{gel} (J/g)$	ΔH <sub>AT</sub> (J/g)
Control	62,82 ± 0,64 <sup>a</sup>	70,35 ± 0,30 <sup>b</sup>	92,36 ± 0,43 <sup>d</sup>	103,66 ± 0,57 <sup>d</sup>	8,68 ± 0,23 <sup>d</sup>	8,68 ± 0,23
HM10	62,98 ± 0,36 <sup>a</sup>	69,92 ± 0,49 <sup>b</sup>	89,97 ± 0,46 <sup>c</sup>	102,29 ± 0,23 <sup>c</sup>	7,10 ± 0,47°	8,34 ± 0,56
HM20	62,77 ± 0,56 <sup>a</sup>	69,26 ± 0,08 <sup>a</sup>	88,19 ± 0,23 <sup>b</sup>	98,10 ± 0,48 <sup>b</sup>	$6,18 \pm 0,24^{b}$	8,30 ± 0,32
HM30	62,34 ± 0,34 <sup>a</sup>	<b>69,00 ± 0,15</b> <sup>a</sup>	<b>86,28 ± 1,34</b> <sup>a</sup>	96,23 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,44 ± 0,21 <sup>a</sup>	8,55 ± 0,32
	Disociación del complejo amilosa-lípido					
	T <sub>i</sub> (°C)		T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔI	H <sub>A-L</sub> (J/g)
Control	106,77 ± 0	,19 <sup>d</sup> 11'	7,76 ± 0,42 <sup>d</sup>	127,72 ± 0,1	1 <sup>d</sup> 0,7	76 ± 0,07°
HM10	105,26 ± 0	,54 <sup>c</sup> 11	5,54 ± 0,40°	125,82 ± 0,9	92° 0,6	54 ± 0,03 <sup>b</sup>
HM20	103,73 ± 0	,25 <sup>b</sup> 11	3,47 ± 0,16 <sup>b</sup>	123,19 ± 0,4	ł3 <sup>b</sup> 0,5	6 ± 0,05 <sup>ab</sup>
HM30	101,65 ± 1	,11 <sup>a</sup> 11	1,42 ± 0,42 <sup>a</sup>	120,82 ± 0,2	20a 0,5	50 ± 0,06ª

Tabla 3.22. Parámetros térmicos de masas obtenidos por DSC

 $T_i, T_p \ y \ T_f \ corresponden \ a \ las \ temperaturas \ de \ inicio, \ pico \ y \ final \ de \ las \ transiciones, \ respectivamente. \\ \Delta H_{gel} = \ entalpía \ de \ gelatinización \ expresada \ en \ J/g \ de \ almidón \ total, \ base \ seca.$ 

 $\Delta H_{AT}$  = entalpía de gelatinización expresada en J/g de almidón de trigo, base seca.

 $\Delta H_{A-L}$  = entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido expresada en J/g de masa, base seca. Promedio ± desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 3).

De esta manera, el decrecimiento progresivo de  $T_{p2}$  y  $T_f$  estaría causado por el aumento progresivo de la cantidad de agua presente en las mismas a medida que se emplea mayor cantidad de HM.

Los resultados encontrados en los experimentos de DSC son consistentes con los hallados durante los ensayos en RVA tanto de las materias primas como de las premezclas (Secciones 3.1.6 y 3.2.5) y, en conjunto, confirman la incapacidad del HM para gelatinizar incluso en condiciones de exceso de agua. De esta forma, la presencia de almidón resistente no contribuye a la aparición de las endotermas exhibidas por las masas compuestas. En tal caso, las endotermas observadas se atribuirían exclusivamente a la gelatinización del almidón de trigo.

Por otro lado, y teniendo en cuenta también los resultados hallados en los ensayos de RMN-<sup>1</sup>H (Sección 3.4.4), se sugiere que, dado que el almidón resistente es capaz de ligar gran cantidad de agua y no la utiliza posteriormente para gelatinizar, esta interacción ocurriría entonces a nivel de la superficie de los gránulos. Así, durante el

calentamiento, el agua ligada superficialmente sería más móvil y escaparía de la superficie de los gránulos de HM, pudiendo ser captada por los gránulos de almidón de la harina. De esta manera, el almidón de trigo contaría con mayor disponibilidad de agua para su gelatinización, reforzando los efectos antes mencionados para  $T_{p2}$  y T<sub>f</sub>.

Adicionalmente, la metodología de reemplazo utilizada para formular las premezclas estaría produciendo un efecto de dilución de la fracción de almidón gelatinizable. Esta sería la causa de la disminución observada en las entalpías de gelatinización a niveles crecientes de HM. Sin embargo, la presencia de almidón no gelatinizado en productos panificados sería ventajoso si se tiene como objetivo elaborar productos panificados con digestibilidades de almidón e índices glicémicos disminuidos (Burton, Monro, Alvarez, y Gallagher, 2011; M. M. Martínez et al., 2018).

#### 3.6. Análisis microestructural

#### 3.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se tomaron imágenes de las diferentes masas a 300× y 600×. Las imágenes SEM revelaron, para la masa control, la presencia de una red de gluten bien desarrollada, formando una estructura cerrada y con gránulos de almidón embebidos en ella. En esta muestra, la red de gluten se presentó como elementos estructurales en forma de hebras y films (Figura 3.17a y b).

Las imágenes de la masa HM10 mostraron una estructura más abierta, donde la fracción proteica se encontró formando una red compuesta principalmente por hebras de gluten entrecruzadas (Figura 3.17c y d).

A mayores niveles de reemplazo, como en el caso de HM20, la masa mostró menor evidencia de una red de gluten bien desarrollada (Figura 3.18a y b). Sin embargo, dado que para HM30 fue posible observar películas y hebras de gluten alineadas y ligeramente entrecruzadas (Figura 3.18c y d), es posible que en HM20 no se hayan detectado dado el campo seleccionado para la observación. En el caso de la harina de trigo, las proteínas de gluten, junto a una parte de la fracción almidonosa, se encuentran circunscriptas a las partículas de endospermo partidas durante la molienda. Sin embargo, una fracción de gránulos de almidón puede ser expulsada de las particulas de endospermo, encontrándose libres (Scheuer et al., 2011).



Figura 3.17. Imágenes de SEM de masa a) control a 300× y b) 600×, y c) HM10 a 300× y d) 600×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten.

La Figura 3.19 muestra micrografías obtenidas por SEM en modo de bajo vacío (130 Pa) para la harina de trigo (Figura 3.19a) y el HM (Figura 3.19b) mediante la detección de electrones secundarios. En ella se puede observar la presencia de las partículas de endospermo ricas en proteínas (PP en la Figura 3.19a), las partículas de endospermo conteniendo tanto proteína como gránulos de almidón (PPA en la Figura 3.19a) y los gránulos de almidón libre (GAL en la Figura 3.19a). Por otro lado, las flechas rojas señalan huecos de forma y tamaño coincidente con los gránulos de almidón de trigo tipo A, es decir, aquellos de tamaño mayor a 10 µm y de forma lenticular.



Figura 3.18. Imágenes de SEM de masa a) HM20 a 300× y b) 600×, y c) HM30 a 300× y d) 600×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten.

Por su parte, en la Figura 3.19b se muestran los gránulos de almidón resistente empleado en el desarrollo de este trabajo, los cuales se presentan en forma esférica y con una distribución de tamaños más homogénea.

Al realizar reemplazos de harina por almidón, se enriquece la fracción almidonosa no encapsulada en las partículas de endospermo, lo cual se evidencia en la mayor proporción de gránulos de menor tamaño observada en las micrografías de las masas con contenido creciente de HM. Estos gránulos de almidón libres son los primeros en hidratarse durante el amasado, produciendo los picos de hidratación observados en los primeros minutos de los ensayos farinográficos (Sección 3.2.4). Por otro lado, el hecho de que las proteínas estén encapsuladas en las partículas de endospermo produce, durante el amasado, zonas de mayor concentración de red de gluten (regiones circundantes a las partículas de endospermo) y zonas de menor concentración de la misma (regiones ricas en la fracción almidonosa libre). Esta falta de uniformidad en la matriz, reflejada en la toma de muestra, sería la causa del contenido de red de gluten aparentemente mayor en algunas muestras (como HM10 o HM30) respecto a otras (como HM20), ya que durante la observación microscópica se busca capturar campos de interés para el estudio de los sistemas.



Figura 3.19. Micrografías SEM en modo bajo vacío de a) harina de trigo y b) almidón resistente Hi-Maize 260. PP = partículas proteicas; PPA = partículas proteicas con gránulos; GAL = gránulos de almidón libres. 600×. Flechas rojas señalan huecos dejados por gránulos de almidón.

### 3.6.2. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

Al utilizar la técnica de ESEM, a diferencia de lo que ocurre en SEM, la muestra no sufre modificaciones operativas previas a la observación, por lo que mantiene su integridad estructural y sus características morfológicas tal cual se presentan en la masa utilizada durante la panificación. Sin embargo, dadas estas condiciones, sólo es posible realizar una observación superficial de las muestras.

En la Figura 3.20 se presentan las micrografías obtenidas para la masa control y para HM10 a 600×, 1000× y 2000×. En ellas pudo apreciarse la presencia de los gránulos de almidón embebidos y protruyendo de la red de gluten. A diferencia de SEM, donde la deshidratación de las muestras produce que el gluten se muestre en forma de estructuras sólidas y discretas, en ESEM el gluten permanece hidratado, observándose en forma de láminas suaves, de apariencia desenfocada y transparente.

Las imágenes ESEM de HM20 y HM30 a 600×, 1000× y 2000× se muestran en la Figura 3.21. En ellas se pudo apreciar una mayor cantidad de gránulos de almidón, principalmente de menor tamaño. La presencia de gluten en estas muestras es menos evidente, y se mostró como pequeños islotes rodeados por el elevado número de gránulos.

Esta distribución confirmaría lo descripto en SEM acerca de la falta de uniformidad dada por las partículas de endospermo. La presencia de regiones más o menos ricas en gluten en la masa panaria podría ser la causa de los diferentes entornos observados en RMN-<sup>1</sup>H. Las zonas más ricas en gluten tendrían gran influencia de estas proteínas, pero también de los gránulos de almidón cercanos, sobre la movilidad de agua; en las zonas más ricas en almidón la influencia del gluten sobre la movilidad sería menor.



Figura 3.20. Imágenes de ESEM de masa a) control a 600×, b) 1000× y c) 2000×, y d) HM10 a 600×, e) 1000× y f) 2000×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten



Figura 3.21. Imágenes de ESEM de masa a) HM20 a 600×, b) 1000× y c) 2000×, y d) HM30 a 600×, e) 1000× y f) 2000×. GA = gránulo de almidón; HG = hebra de gluten; FG = film de gluten

Por otro lado, HM20 y HM30 presentaron una superficie de apariencia más lisa, con menor cantidad de gránulos sobresaliendo de la misma. Este efecto estaría relacionado con el mayor número de gránulos pequeños (Sección 3.1.3 y Sección 3.2.2), lo cual permitiría una mejor capacidad de empaquetamiento de las partículas sólidas. Así, los espacios intersticiales entre los gránulos de mayor tamaño son ocupados con los de menor tamaño, formando estructuras más compactas, como también ha sido reportado por otros autores (Rueda et al., 2016). La confirmación de que las masas con elevados niveles de reemplazo de HT por HM presentaron una estructura más compacta estaría en concordancia con lo discutido en los ensayos de reología fundamental (Sección 3.3.1). Un empaquetamiento más eficiente de los gránulos de almidón produciría mayor superficie de contacto entre los gránulos, aumentando así la disipación de energía por rozamiento entre ellos (fricción) y dando lugar al aumento del módulo de pérdida (*G''*) observado.

# 3.6.3. Microscopía confocal láser de barrido (CSLM)

Se obtuvieron imágenes de CSLM de las masas teñidas con FITC y rodamina B a 10× y 20× para complementar el análisis del efecto de la incorporación de concentraciones crecientes de HM en la microestructura de la masa.

La Figura 3.22 muestra micrografías representativas a 10× de las diferentes masas, presentadas a través de las señales de FITC y rodamina B por un lado (Figura 3.22, columna izquierda), y de la señal de rodamina B exclusivamente por el otro (Figura 3.22, columna derecha). Estas micrografías tomadas a menor magnificación, particularmente las del canal rojo (rodamina B), permiten observar globalmente el entramado de la red de gluten. Así, la masa control presentó una red de gluten extensamente desarrollada, muy orientada y entrecruzada (Figura 3.22a y b), mientras que HM10 exhibió nuevamente una red más abierta y filamentosa, con entrecruzamiento notable (Figura 3.22c y d). En el caso de HM20, la red de gluten se encontró bien desarrollada y entrecruzada, pero de apariencia menos orientada (Figura 3.22e y f), mientras que la muestra con mayor nivel de reemplazo (HM30) exhibió una

red pobremente formada, la cual se mostró más discontinua y localizada en forma de manchas (Figura 3.22g y h).

Por el otro lado, las micrografías a 20× se emplearon principalmente para evaluar cuantitativamente la complejidad de la matriz a través del parámetro dimensión fractal (*DF*). Las mismas se muestran en la Figura 3.23, nuevamente presentadas a través de ambas señales (Figura 3.23, columna izquierda) y también sólo para la correspondiente a rodamina B (Figura 3.23, columna derecha). Cualitativamente, las características microestructurales observadas a este nivel de magnificación fueron similares a las descriptas en las micrografías obtenidas a 10×, presentando una disminución progresiva de la calidad de la red de gluten a medida que aumenta la concentración de almidón resistente. Sin embargo, en estas imágenes se hizo más notorio el aumento en la proporción de la población de gránulos de almidón de menor tamaño, en particular en las muestras HM20 y HM30.

La *DF* refleja la complejidad de la matriz, de manera que una disminución en este parámetro revelaría un menor desarrollo de la red de gluten. Los valores de *DF* obtenidos para las masas estudiadas se muestran en la Tabla 3.23.

musus obser vulus en domin	
Muestra	DF
Control	1,50 ± 0,07°
HM10	1,35 ± 0,09 <sup>b</sup>
HM20	$1,21 \pm 0,06^{a}$
HM30	$1,28 \pm 0,12^{a}$

Tabla 3.23. Valores de la dimensión fractal de la red de gluten de las masas observadas en CSLM

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 5).

La *DF* decreció significativamente con el uso de HM, aunque, no se encontraron diferencias significativas entre HM20 y HM30. Estos resultados indicarían que con niveles de reemplazo del 20 y el 30% el desarrollo de la red de gluten se ve similarmente obstaculizado.

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 3.22. Imágenes de CSLM a 10× de masas a y b) control, c y d) HM10, e y f) HM20, y g y h) HM30, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha)



Figura 3.23. Imágenes de CSLM a 20× de masas a y b) control, c y d) HM10, e y f) HM20, y g y h) HM30, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha)

### 3.7. Conclusiones parciales

Todas las premezclas formuladas con HM fueron aptas para la obtención de masas con buenas características de manipulación, las cuales serían capaces de atravesar un proceso de panificación. El efecto del reemplazo de harina de trigo por HM en las premezclas modificó los requerimientos de agua para la formación de la masa. Además, el uso de mayores concentraciones de HM, con la consecuente disminución del contenido de gluten, llevó no sólo a un incremento en la absorción de agua sino a un aumento en la dureza y el comportamiento elástico de la masa. Estos efectos fueron particularmente marcados en niveles elevados de reemplazo. Sin embargo, la masa HM20 mostró un desempeño equilibrado respecto a sus características reológicas.

Los mecanismos involucrados en los cambios de las características de la masa estarían relacionados al efecto de dilución del gluten, la modificación de los perfiles de tamaño de partícula del almidón presente en las masas y la falta de uniformidad en la formación de la red de gluten producida por la distribución de las partículas proteicas de la harina. Todos estos efectos son amplificados a medida que aumentan los niveles de reemplazo. Los gránulos de almidón de HM tienen una distribución de tamaños desplazada hacia diámetros más pequeños y, por lo tanto, pueden llenar los espacios intersticiales entre los gránulos de mayor tamaño del almidón de la harina, dando lugar a una matriz más compacta. Sin embargo, estos mecanismos no explicarían completamente los particulares efectos reológicos y microestructurales observados para HM30. En este sentido, el modelo compuesto relleno-matriz proveería una aproximación para los mecanismos intervinientes en esta muestra, incluso aunque el gluten no forme una red isotrópica como requiere el modelo.

# Capítulo 4 Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón resistente

# <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de</u> <u>almidón resistente</u>

#### 4.1. Ensayos de fermentación

El comportamiento de las masas durante la etapa de levado fue evaluado a través de ensayos de fermentación para obtener los tiempos óptimos de fermentación de cada formulación. Es importante optimizar los tiempos de permanencia de la masa en cámara a 30 °C durante el levado para evitar el colapso de la estructura por fermentación excesiva (sobreproducción de gas) o durante el aumento de volumen que se produce en la etapa de horneado posterior. Para este propósito, se registró el incremento de volumen de las masas en el tiempo, y se ajustaron las curvas de  $\Delta V$  vs. tiempo obtenidas a la ecuación de Chapman de 3 parámetros (Ecuación 4.1).

$$\Delta V = \Delta V_{max} (1 - e^{-bt})^c$$
 Ecuación 4.1

donde  $\Delta V$  es el incremento de volumen registrado durante el ensayo (en ml), t es el tiempo de ensayo (en min),  $\Delta V_{máx}$  (en ml) es el máximo incremento alcanzado a  $t \rightarrow \infty$ , y b y c son parámetros relacionados a la velocidad de incremento y a la forma de la curva, respectivamente (Burkhart y Tomé, 2012).



Figura 4.1. Ajuste de los datos de fermentación para HM10, indicando el TFO

#### Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón resistente

En la Figura 4.1 se presenta, a modo de ejemplo, el ajuste realizado para la muestra HM10. Los tiempos de fermentación óptimos (TFO) fueron entonces calculados como el 75% del tiempo requerido por la masa para alcanzar su  $\Delta V_{max}$  a 30 °C.

A modo comparativo, y para facilitar el análisis, se muestran los ajustes realizados sobre todas las muestras (Figura 4.2).



Figura 4.2. Ajustes de los ensayos de fermentación para a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30

Los parámetros surgidos del ajuste se muestran en la Tabla 4.1. En general, se observó una disminución del  $\Delta V_{máx}$  obtenido, especialmente a niveles de reemplazo mayores al 10%. Esto se vio acompañado, a su vez, de una diminución en la velocidad de incremento, lo cual se refleja en el parámetro b. Estos resultados sugieren que las masas con mayor contenido de almidón resistente (HM20 y HM30) presentan dificultades durante el proceso de fermentación.

	$\Delta V_{max}$ (ml)	b	С	r² ajustado	TFO (min)
Control	121 ± 2	0,025 ± 0,002	1,13 ± 0,07	0,9387	61
HM10	123 ± 2	0,017 ± 0,001	0,92 ± 0,04	0,9562	80
HM20	117 ± 4	0,013 ± 0,001	0,88 ± 0,05	0,9657	101
HM30	110 ± 4	0,012 ± 0,002	0,78 ± 0,05	0,9280	100

Tabla 4.1. Parámetros de ajuste de las curvas de fermentación y tiempos de fermentación óptimos

Valor  $\pm$  error estándar (n = 9).

TFO = Tiempo de fermentación óptimo

Los tiempos de fermentación óptimos calculados fueron en aumento a medida que el contenido de HM fue mayor, siendo los correspondientes a HM20 y HM30 similares entre sí.

Los resultados hallados en estos experimentos podrían relacionarse al comportamiento reológico de las masas. Como se describió anteriormente (Sección 3.3), el mayor contenido de HM en la formulación dio lugar a masas de mayor carácter sólido y con mayor dureza, elasticidad y gomosidad. Masas con estas características verían dificultada su expansión durante la fermentación debido a que se necesitaría lograr una mayor presión de los gases para expandir la matriz.

Por otro lado, a estos efectos se sumaría el de la dilución del almidón de trigo debido a su reemplazo por HM, ya que las levaduras podrían ver limitado el acceso a sustratos fermentables (como la fracción de almidón de trigo dañado) debido a la mayor proporción de gránulos de almidón con una estructura más cristalina y compacta (HM).

#### 4.2. Calidad de panes frescos

#### 4.2.1. Volumen específico de pan

El volumen específico de las piezas cocidas es el parámetro más utilizado a la hora de evaluar la calidad comercial del pan, ya que aporta información rápida y fácilmente accesible de las características globales del pan y su capacidad final de retención de aire. La mayoría de las características texturales y de palatabilidad de la miga de pan están relacionadas en cierta medida a su volumen (Cauvain, 2012).

### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

Los valores de volumen específico para el control y los panes con HM se presentan en la Figura 4.3. El uso de HM no afectó el volumen específico de los panes hasta un 20% de reemplazo. Sólo reemplazos muy elevados, como 30%, llegaron a producir una disminución significativa del volumen de hasta un 30% aproximadamente, respecto al control. Los resultados demostraron que el almidón resistente presentó un muy buen desempeño en panificación incluso a niveles tan elevados como 20%, en mayores concentraciones el efecto sobre el volumen específico podrá relacionarse con las características reológicas de las masas panarias, tal como fue observado en los ensayos oscilatorios dinámicos, en el TPA y en los ensayos de fermentación.



Se sugiere que la brusca disminución del volumen específico en los panes HM30 estaría relacionada con el aumento marcado de G' exhibido por la masa en los ensayos de reología oscilatoria. En dichos experimentos la masa HM30 presentó también el valor de tan  $\delta$  más bajo, indicando el dominio de la componente elástica sobre la viscosa. Asimismo, la masa correspondiente a esta formulación presentó los mayores valores de dureza, elasticidad y gomosidad en los ensayos de TPA. La mayor elasticidad de esta

masa sería responsable de dificultar la expansión de la matriz, dando lugar a volúmenes de pan menores (Ishwarya, Desai, Naladala, y Anandharamakrishnan, 2017).

#### 4.2.2. <u>Textura de la miga</u>

La textura de la miga es otro de los parámetros de calidad más importantes para los consumidores a la hora de evaluar un producto panificado. Una miga esponjosa, suave, cohesiva y resiliente se relaciona con productos frescos y es determinante para una buena aceptabilidad (Rashidi, 2016). Un perfil de textura típico exhibido por la miga de pan se presenta a modo de ejemplo en la Figura 4.4.



Figura 4.4. Perfil de textura representativo de la miga del pan

El primer pico está relacionado al primer ciclo de compresión-descompresión de la miga por la sonda, y su máximo indica la máxima fuerza que debe ser aplicada para provocar una deformación del 40% respecto a la altura de la pieza. Luego de este ciclo sigue un período de reposo de la sonda cuyo objetivo es permitir la recuperación elástica de la estructura de la muestra previo al comienzo del segundo ciclo de compresión-descompresión (segundo pico).

# <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

En la Figura 4.5 se muestran los parámetros texturales de muestras de miga evaluados por TPA. La dureza (Figura 4.5a) aumentó con el uso de HM respecto al control. Reemplazos del 10 y 20% produjeron un aumento significativo de este parámetro, aunque no se observó efecto de la concentración en estas muestras. En cambio, a un nivel de reemplazo de 30% la dureza aumentó drásticamente respecto al resto de las muestras, duplicado en valor al control. Un efecto similar fue encontrado para la consistencia (Figura 4.5b).



Figura 4.5. Parámetros texturales de la miga de pan. Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 16; p < 0.05)

Por otro lado, la cohesividad (Figura 4.5c) fue progresivamente menor a concentraciones crecientes de HM, siendo la muestra HM30 fue la más afectada. Una menor cohesividad en la miga implica que estas se desgranen más fácilmente, lo cual podría relacionarse con la menor integración del HM en la matriz viscoelástica de la red de gluten observada en las microscopías SEM, ESEM y CSLM de las masas panarias.

En el caso de la elasticidad (Figura 4.5d) la tendencia fue menos clara. Si bien hubo un aumento significativo para este parámetro al realizar reemplazos del 10%, para reemplazos mayores la tendencia se invierte, disminuyendo progresivamente su valor. En este caso, reemplazos de hasta un 20% produjeron resultados similares a los hallados para el control.

La resiliencia (Figura 4.5e) presentó una tendencia similar a la elasticidad, con un valor significativamente mayor en la muestra HM10, y una posterior disminución progresiva a mayores niveles de reemplazo (HM20 y HM30).

Finalmente, la masticabilidad (Figura 4.5f) siguió el mismo comportamiento que la dureza y la consistencia ya que es un parámetro derivado del primero y estrechamente relacionado al último.

En todos los parámetros las muestras HM10 y HM20 presentaron modificaciones moderadas respecto al control. Por el contrario, la muestra HM30 fue la más afectada, con los valores de dureza, consistencia y masticabilidad más elevados, y los menores valores de cohesividad, elasticidad y resiliencia. La cohesividad está asociada a la capacidad de la matriz para mantenerse unida, mientras que la elasticidad y la resiliencia representan recuperaciones elásticas de la miga. La elasticidad se relaciona con la capacidad de recuperación de la forma entre los dos ciclos de compresión consecutivos, y la resiliencia está relacionada con la recuperación inmediatamente después de aplicada la primera compresión. Por lo tanto, presentar una disminución simultánea en la cohesividad, la elasticidad y la resiliencia daría como resultado una matriz más alterable y desmenuzable, lo que implicaría que las deformaciones aplicadas sobre la miga darían lugar a mayor compactación y desprendimiento de migajas (Armero, 1997).

# 4.2.3. Porosidad de la miga

El análisis de la porosidad en la miga de pan es útil para la evaluación del desempeño de la masa durante el leudado y la implicancia de incorporar diferentes ingredientes a las formulaciones, ya que sus efectos estarían reflejados en la distribución, tamaño y forma de los alveolos. Los parámetros de porosidad extraídos de las imágenes digitales de las rodajas de pan se muestran en la Tabla 4.2.

Las muestras con almidón resistente desarrollaron, en todos los casos, un 25% menos de alveolos, como se refleja en el valor de N. Además, se produjo una reducción

Tabla 4.2. Para	ámetros de la	porosidad	de la miga
-----------------	---------------	-----------	------------

	N*	Fracción de aire (%)	AAM (cm <sup>2</sup> )†	Perímetro (cm)	Circularidad
Control	$208 \pm 50^{b}$	36 ± 3°	0,016 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>
HM10	$157 \pm 29^{a}$	$33 \pm 4^{b}$	0,020 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,06°	0,54 ± 0,03 <sup>a</sup>
HM20	$151 \pm 29^{a}$	$32 \pm 3^{b}$	0,020 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,05 <sup>bc</sup>	$0,55 \pm 0,03^{ab}$
HM30	$156 \pm 19^{a}$	27 ± 2ª	0,016 ± 0,002 <sup>a</sup>	<b>0,53 ± 0,03</b> <sup>a</sup>	0,57 ± 0,02 <sup>b</sup>

\*N = número total de alveolos en la imagen.

†AAM = área alveolar media.

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (n = 16; p < 0.05).

significativa en la fracción de aire en todas las formulaciones con HM, especialmente marcada para HM30. A pesar de esto, los valores de área alveolar media (AAM) para HM10 y HM20 fueron significativamente mayores que los del control y HM30.

Por otra parte, los parámetros perímetro y circularidad indicaron mínimos cambios en la forma de los alveolos. Las muestras control, HM10 y HM20 presentaron poros levemente más irregulares que los de HM30, ya que sus valores de perímetro fueron ligeramente mayores. En el mismo sentido, HM30 presentó alveolos más circulares que el control y HM10, como se deduce de su valor ligeramente más cercano a 1.

Por otro lado, para profundizar el análisis de la porosidad de la miga es útil, además de realizar la comparación de medias, utilizar histogramas que presenten la distribución de los alveolos en función de su área (Figura 4.6). Estos gráficos permiten observar si se produjeron modificaciones en la forma de la distribución al emplear

almidón resistente en la formulación. Del análisis de los histogramas se obtuvieron los parámetros de cada distribución, los cuales se presentan en la Tabla 4.3.



Figura 4.6. Histogramas de la distribución del área alveolar y curvas de frecuencia acumulada de la miga de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30, con imágenes representativas del corte transversal de las piezas

	Asimetría	Moda (cm <sup>2</sup> )	P50 (cm <sup>2</sup> )	P90 (cm <sup>2</sup> )	P99 (cm <sup>2</sup> )
Control	4,7	0,003	0,008	0,035	0,102
HM10	4,2	0,003	0,009	0,046	0,138
HM20	4,1	0,003	0,009	0,045	0,139
HM30	7,3	0,003	0,008	0,035	0,126

P50, P90 y P99 se refiere al 50°, 90° y 99° percentil, respectivamente.

### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

Como es habitual en la miga, todas las distribuciones presentaron asimetría positiva, lo que se evidencia por la acumulación de la frecuencia en el lateral izquierdo de la distribución y una larga cola hacia la región de mayores áreas. En estos casos, la media (AAM en la Tabla 4.2) difiere notablemente del valor de tamaño alveolar más frecuente (la moda) debido al peso desigual que una pequeña cantidad de alveolos grandes puede tener sobre una gran cantidad de alveolos pequeños. Por esta razón, el análisis que se haga sólo a partir de AAM no comprendería toda la información acerca del sistema, por lo que resulta útil complementar su estudio con un análisis de su distribución.

En este sentido, los percentiles permiten analizar los desplazamientos de la distribución hacia mayores o menores tamaños alveolares. Dado que estos parámetros indican el valor de área al que es necesario llegar para contabilizar un porcentaje determinado del total de alveolos, un desplazamiento de los mismos hacia mayores áreas indica una mayor proporción de alveolos de mayor tamaño. Así, el análisis conjunto de los datos expuestos en la Tabla 4.2 y los histogramas permitiría concluir que, si bien la miga de los panes HM10 y HM20 contiene un menor número total de alveolos que la miga del pan control, estas muestras presentaron una distribución desplazada hacia mayores tamaños compensando en parte la disminución de la fracción de aire. Por el contrario, en el caso de HM30, los resultados sugieren que, aunque esta muestra presenta una distribución de tamaños alveolares similar a la del control, contiene una cantidad de alveolos significativamente menor. Estos resultados serían congruentes entonces con las diferencias encontradas en el volumen específico de los panes, ya que una menor fracción de aire implica un menor volumen de aire retenido en la miga.

El efecto del alto contenido de almidón resistente en la calidad alveolar del pan HM30 era esperable dadas las características reológicas que presentó la masa de esta formulación (Sección 3.3). Ishwarya et al. (2017) estudiaron el efecto de incorporar distintas cantidades de salvado de trigo en el comportamiento reológico de las masas, así como su desempeño en la fermentación y la panificación. Los autores reportaron que la presencia de la fibra produjo una disminución en la velocidad de crecimiento de las burbujas durante la fermentación, y encontraron una relación inversa entre el módulo elástico (*G'*) y el tamaño de las burbujas. Esto estaría relacionado con un aumento en la viscosidad compleja de las lamelas interalveolares, lo que disminuye el crecimiento de las burbujas por coalescencia.

# 4.2.4. <u>Humedad y actividad acuosa de la miga de pan</u>

El contenido de agua de las masas panarias y los panificados es crítica para la mayoría de las características de la miga de pan. En las masas, el agua permite el hinchamiento de los gránulos de almidón, hidrata los polisacáridos no almidonosos (como los pentosanos) y las proteínas del gluten, posibilitando por medio de trabajo mecánico la formación de una matriz viscoelástica responsable de retener burbujas de gas. Durante el horneado, el agua permite la gelatinización del almidón que, en menor o mayor extensión, aporta suavidad a la textura de la miga. En los panes, sin embargo, el contenido de humedad y la actividad acuosa ( $a_w$ ) están principalmente relacionadas con la crocancia de la corteza, la firmeza y palatabilidad de la miga y también los procesos de envejecimiento por medio de la regulación de la movilidad molecular (Lai y Lin, 2007; M. M. Martínez et al., 2018; Yi et al., 2009).

Los valores de humedad y  $a_w$  se listan en la Tabla 4.4. La humedad de la miga fue progresivamente mayor con el aumento del contenido de HM, probablemente debido al aumento en las cantidades de agua necesarias para preparar cada formulación, como indicaron los farinogramas correspondientes. Sin embargo, aun cuando la miga de los panes con almidón resistente presentó mayor proporción de humedad, la influencia del agua en el mejoramiento de la textura de la miga no fue evidente. En este caso, los resultados sugieren que los cambios texturales estarían más influenciados por la presencia del almidón resistente.

Por otro lado, la  $a_w$  no varió significativamente entre las muestras, excepto en la miga de los panes HM30, que presentó un valor mayor. Este efecto reflejaría una menor capacidad del HM para inmovilizar agua en panes con elevado contenido de la misma. Esto sería coherente con lo observado en los ensayos de DSC, donde se sugirió que el almidón resistente, al no gelatinizar, no sería capaz de ligar fuertemente al agua.

Tabla 4.4. Val	l'abla 4.4. Valores de humedad y <i>a</i> w de la miga					
	Humedad (% p/p)	$a_w$				
Control	43,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	$0,966 \pm 0,001^{a}$				
HM10	$44,9 \pm 0,2^{b}$	$0,966 \pm 0,003^{a}$				
HM20	45,3 ± 0,3°	$0,966 \pm 0,002^{a}$				
HM30	$46,4 \pm 0,3^{d}$	0,970 ± 0,001 <sup>b</sup>				

. .

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 6).

#### 4.2.5. Color de la corteza y la miga

\_ . . . . . . .

. .

Los valores de los parámetros del espacio CIE 1976 L\*a\*b\* para la corteza y la miga se presentan en la Tabla 4.5. Respecto a la corteza, el incremento de la concentración de HM implicó un aumento en el parámetro de luminosidad, L\*, dando panes con apariencia más blanca. El parámetro de cromaticidad rojo-verde, a\*, mostró una reducción progresiva en el rojo con el uso de HM. El parámetro b\*, relacionado con la cromaticidad amarillo-azul, presentó un comportamiento variable, aumentando (aumento del amarillo) con un 10% de reemplazo y disminuyendo con reemplazos del 30%.

Por su parte, el índice de pardeamiento, *BI*, no mostró diferencias al reemplazar un 10% de harina por HM, pero luego siguió un decrecimiento progresivo con el incremento en la concentración de HM, fuertemente influenciado por los valores de L\*. La disminución del *BI* estaría relacionada con la menor disponibilidad de azúcares reductores y aminoácidos aminados con potencial para participar en reacciones de Maillard durante el horneado, siendo el reemplazo de la harina, y consecuentemente sus fracciones almidonosas y proteicas, por almidón resistente a las  $\alpha$ -amilasas de las levaduras responsable de esta reducción. Así, las masas tendrían menor cantidad de los componentes involucrados en la reacciones de pardeamiento y los panes ganarían menos color marrón (Hidalgo y Brandolini, 2011).

#### Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

	Corteza†				
	L*	a*	b*	BI	
Control	65 ± 3 <sup>a</sup>	$10 \pm 1^{d}$	27 ± 1 <sup>b</sup>	64 ± 6 <sup>c</sup>	
HM10	$72 \pm 4^{b}$	7 ± 1°	$33 \pm 6^{c}$	67 ± 13°	
HM20	75 ± 3°	$4 \pm 2^{b}$	$26 \pm 2^{b}$	45 ± 7 <sup>b</sup>	
HM30	81 ± 3 <sup>d</sup>	1 ± 1ª	$22 \pm 3^{a}$	$31 \pm 6^{a}$	
	 Miga‡				
	L*	a*	b*	BI	
Control	75 ± 2 <sup>b</sup>	$-1,2 \pm 0,2^{b}$	13 ± 1ª	17 ± 1 <sup>a</sup>	
HM10	$75 \pm 4^{b}$	-1,3 ± 0,1ª	$14 \pm 2^{b}$	$18 \pm 2^{b}$	
HM20	71 ± 2 <sup>a</sup>	-1,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	$12 \pm 1^{a}$	17 ± 1ª	
HM30	$73 \pm 4^{a}$	$-1,1 \pm 0,2^{c}$	13 ± 1 <sup>a</sup>	17 ± 1ª	
+ m - 14					

Tabla 4.5. Parámetros de color de la corteza	a y la r	niga (	de los	panes
		~		

n = 14n = 8

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05).

Respecto a la miga, se observó una disminución en la luminosidad para reemplazos del 20 y 30%. Se encontró una tendencia hacia valores más negativos de a\* para HM10 y HM20, mientras que en el caso de b\* y *BI* se registraron aumentos para HM10. No obstante, el efecto del almidón resistente no fue tan evidente en estos casos, ya que a pesar de las diferencias encontradas todos los valores fueron muy cercanos. En este caso, la miga de los panes con HM se percibiría igual que la del pan control. El *BI* de la miga tampoco se vio demasiado afectado por el uso de HM debido a que, durante el horneado, el interior de la pieza no reúne las condiciones necesarias para propiciar las reacciones de Maillard ( $a_w \approx 0,6$  y temperatura > 100 °C).

#### 4.3. Análisis microestructural por ESEM

Se realizaron observaciones por ESEM de muestras de miga de pan con la finalidad de analizar la microestructura de las paredes alveolares. Se obtuvieron las correspondientes micrografías a 500× y 1500×, las cuales se presentan en las Figura 4.7 y Figura 4.8, respectivamente.



Figura 4.7. Micrografías obtenidas por ESEM de miga de pan a) control a 500×, b) control a 1500×, c) HM10 a 500× y d) HM10 a 1500×. El rectángulo blanco indica la zona de magnificación



Figura 4.8. Micrografías obtenidas por ESEM de miga de pan a) HM20 a 500×, b) HM20 a 1500×, c) HM30 a 500× y d) HM30 a 1500×. El rectángulo blanco indica la zona de magnificación

### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

En las imágenes es posible apreciar que los gránulos de almidón conservaron parte de su estructura granular tras el proceso de horneado. Además, los mismos se encuentran embebidos en la matriz estructural formada por el gluten coagulado y la amilosa lixiviada. En las micrografías correspondientes al control (Figura 4.7a y b) y a HM10 (Figura 4.7c y d) se observa que estas muestras presentaron migas con superficies de apariencia más regular, suave y plana, en contraposición con HM20 (Figura 4.8a y b) y HM30 (Figura 4.8c y d). Estas últimas mostraron una considerable cantidad de gránulos de almidón pequeños proyectándose hacia el exterior desde la superficie, dando una apariencia más rugosa. Se sugiere que la apariencia más irregular presentada por estas muestras se debe a que contienen una mayor proporción de almidón no gelatinizado (HM). Por el contrario, en las migas control y HM10 la mayor proporción de almidón gelatinizado sería responsable de su superficie más suave (M. M. Martínez et al., 2018).

Por otra parte, la creciente proporción de almidón respecto al contenido de gluten en las muestras con mayor contenido de HM produciría una saturación de la red de gluten debido al mayor contenido de relleno de la matriz, como se podría sugerir a partir del modelo compuesto relleno-matriz (Sección 3.3.1).

El análisis comparativo de las micrografías indicaría que, más allá de la importancia del contenido de agua en la mayoría de las características del pan, como la textura, el volumen específico e incluso la gelatinización del almidón, la creciente cantidad de partículas de almidón en la estructura podría tener una influencia mayor, incluso que la del agua, en el desempeño de la textura. Stokes y Donald (2000) realizaron compresiones sobre miga de pan con diferentes grados de hidratación dentro de la cámara de observación de un ESEM. De esta forma pudieron registrar en micrografías el comportamiento de la miga mientras le es aplicada una deformación. Sus observaciones permitieron detectar que los gránulos de almidón parcialmente gelatinizados no sufrieron los efectos de la compresión, siendo los films y hebras de gluten las que perdieron su integridad, evidenciándose fracturas especialmente a bajos niveles de hidratación. Cuando analizaron migas con una hidratación del 30%, la matriz de gluten exhibió mayor capacidad para recuperarse elásticamente una vez que el
esfuerzo aplicado fue retirado. Sus resultados sugieren que, en el presente trabajo, el efecto de la incorporación cantidades crecientes de HM (acompañado de una disminución en el contenido de gluten) sería más importante al momento de afectar las propiedades mecánicas de la miga que los aumentos en la humedad observados, lo cual podría explicar el descenso de la cohesividad y la resiliencia, así como el aumento en la dureza, la consistencia y la masticabilidad.

# 4.4. Análisis nutricional y digestibilidad de almidón

# 4.4.1. <u>Composición nutricional</u>

La composición nutricional de los diferentes panificados se presenta en la Tabla 4.6. No se observaron cambios en el contenido de lípidos entre las diferentes formulaciones, aunque se encontró una disminución leve pero progresiva de las cenizas a medida que la concentración de HM fue mayor.

Tabla 4.6. Composición nutricional de los panificados

	Lípidos	Cenizas	Proteínas	Fibra	Carbohidratos*
Control	1,90 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,04°	16,02 ± 0,07 <sup>d</sup>	6,6 ± 0,1ª	$72,7 \pm 0,2^{d}$
HM10	1,89 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,03 <sup>bc</sup>	15,14 ± 0,04°	9,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	$70,7 \pm 0,2^{\circ}$
HM20	1,82 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,03 <sup>ab</sup>	13,46 ± 0,06 <sup>b</sup>	17,0 ± 0,7°	65,0 ± 0,7 <sup>b</sup>
HM30	1,81 ± 0,02 <sup>a</sup>	$2,65 \pm 0,03^{a}$	11,83 ± 0,08 <sup>a</sup>	26,6 ± 1,8 <sup>d</sup>	57,1 ± 1,8 <sup>a</sup>

\*Carbohidratos diferentes de fibra, obtenidos por diferencia.

Valores expresados como promedio en base seca ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05).

Por otro lado, dada la poca contribución nutricional del HM en cuanto a proteínas (Tabla 3.1, Sección 3.1.1), los productos finales formulados a través de reemplazos cada vez mayores con HM mostraron una disminución progresiva de este nutriente.

Sin embargo, los carbohidratos digeribles (distintos de fibra) también sufrieron una disminución muy marcada, siendo en este caso un efecto beneficioso para la salud. Además, los contenidos de fibra se elevaron un 42, 151 y 284% para HM10, HM20 y HM30, respectivamente, en relación al control. Este considerable aumento en la fibra dietaria, sumado al reducido contenido de carbohidratos digeribles, permitiría obtener un producto final más saludable.

#### 4.4.2. Digestibilidad in-vitro del almidón e índice glucémico estimado

Con el objetivo de estimar el impacto del consumo de panificados con HM en la salud, se realizaron ensayos de digestibilidad sobre rodajas de pan, empleando una proteasa (pepsina) y  $\alpha$ -amilasa. La tasa de hidrólisis del almidón, definida como los mg de maltosa expresada como almidón por g de almidón, se presenta en la Figura 4.9.



Figura 4.9. Digestibilidad in-vitro del almidón en los panificados (promedio ± error estándar, n = 4)

Al momento de comenzar la hidrólisis (t = 0 min), los panes presentaron valores progresivamente menores de azúcares libres a medida que el contenido de HM fue aumentando. Luego, a tiempos mayores, el comportamiento general mostró una tendencia de mayores tasas de liberación de azúcares para el control, seguido de HM10, HM20 y HM30.

Para lograr un mejor análisis de los resultados las curvas fueron normalizadas y ajustadas al modelo exponencial propuesto por Goñi et al. (1997), el cual se presenta en la Ecuación 4.2.

$$C = C_{inf}(1 - e^{-at})$$
 Ecuación 4.2

donde *C* es la concentración de maltosa liberada a los diferentes tiempos de ensayo, *t* es el tiempo de ensayo, *C*<sub>inf</sub> representa el valor de *C* alcanzado a  $t \rightarrow \infty$ , y *a* podría ser considerado como la constante de velocidad de la hidrólisis (Goñi et al. 1997).

En la Figura 4.10 se muestran los ajustes realizados sobre las diferentes curvas. Los parámetros derivados de los ajustes se presentan en la Tabla 4.7.



Figura 4.10. Ajuste de los resultados de digestibilidad de los panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30

#### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

	Cinf*	<i>a</i> (min <sup>-1</sup> )	r² ajustado	Prueba F	IG estimado
Control	511 ± 10	0,0520 ± 0,005	0,9666	а	100
HM10	469 ± 8	0,0398 ± 0,003	0,9814	b	88,6
HM20	410 ± 7	0,0381 ± 0,003	0,9791	С	76,7
HM30	351 ± 7	$0,0404 \pm 0,004$	0,9713	d	66,5

Tabla 4.7. Parámetros del ajuste de los resultados de digestibilidad e índices glucémico.	S
estimados	

\* expresado en mg maltosa/g almidón, maltosa expresada como almidón. Valor ± desvío estándar.

La liberación máxima de azúcares reductores ( $C_{inf}$ ) mostró un efecto de concentración, siendo progresivamente menor a medida que el contenido de HM fue mayor. Los resultados demostraron que el almidón resistente empleado en las formulaciones es capaz de resistir el ataque de las  $\alpha$ -amilasas incluso luego de haber atravesado el proceso de horneado. Esto se encontraría relacionado con la estabilidad térmica que presentan los gránulos de almidón resistente (HM), los cuales, según se observó en los ensayos de RVA (Sección 3.1.6) y DSC (Sección 3.1.7), fueron incapaces de gelatinizar. Por ende, las menores tasas de hidrólisis observadas a mayor contenido de HM son consecuencia de la presencia de una mayor cantidad de estos gránulos no gelatinizados.

Adicionalmente, el control presentó un valor de *a* marcadamente mayor al presentado por las demás formulaciones, las cuales fueron más similares entre sí. Esto sugiere que la digestión en las muestras elaboradas con almidón resistente no sólo produce una menor liberación de azúcares, sino que la misma progresa más lentamente que en la formulación control, siendo este efecto beneficioso para la salud (Montonen et al., 2003; Willett et al., 2002a). Gráficamente, esto puede observarse a través de la pendiente inicial de las diferentes curvas.

Por otra parte, las curvas de ajuste se emplearon para estimar el índice glucémico (*IG*) in-vitro de cada formulación, tal como se describió en la Sección 2.3.5.2. Los resultados obtenidos indicaron una disminución marcada en los *IG* estimados a medida que el contenido de HM se incrementó (Tabla 4.7), alcanzando reducciones respecto al control de 11, 23 y 34% para HM10, HM20 y HM30, respectivamente. Estos resultados sugieren que los panificados adicionados con almidón resistente tipo II serían efectivos

al momento de reducir el impacto negativo que la ingesta de carbohidratos provenientes del pan tiene en la salud humana, contribuyendo además a aumentar la ingesta de fibra en la dieta.

Penn-Marshall, Holtzman, y Barbeau (2010) evaluaron el efecto de incorporar 12 g de almidón resistente Hi-Maize 260 por día, en forma de panificados, sobre marcadores relacionados con la diabetes mellitus tipo 2 en personas afroamericanas, una población con elevada prevalencia de esta patología. Sus hallazgos indicaron que la cantidad de almidón resistente administrada no sería suficiente para observar cambios en los valores de glucosa plasmática en ayunas ni en los de fructosamina, relacionados con el control de glucosa a corto y largo plazo respectivamente. Sin embargo, Gargari et al. (2015) y Karimi et al. (2016) encontraron que una ingesta de 10 g de almidón resistente Hi-Maize 260 por día, ingerido como suspensión en un vaso de agua, sí resultó en una mejora de varios marcadores de salud en poblaciones de mujeres que ya padecían diabetes mellitus tipo 2, disminuvendo significativamente los valores de hemoglobina glicosilada, malonaldehído y los triglicéridos, entre otros, e incrementando los valores de capacidad antioxidante total, glutatión peroxidasa y lipoproteínas de alta densidad (HDL-c). Estos resultados, en conjunto con los hallados en el presente trabajo, indicarían que los panificados elaborados con almidón resistente serían adecuados para incorporarse a una dieta con requerimientos nutricionales especiales.

#### 4.5. Evaluación sensorial y percepción nutricional

#### 4.5.1. Ensayo de discriminación: prueba de diferencias con un testigo

El ensayo de discriminación está pensado para determinar si los evaluadores son capaces de diferenciar un producto de otro en base a sus características sensoriales. Estas pruebas suelen ejecutarse en forma previa a las evaluaciones de aceptabilidad ya que la realización de estas últimas sólo tendrá sentido si los consumidores perciben las diferencias entre los productos.

Los evaluadores valoraron la magnitud de las diferencias, en caso de apreciarlas, entre muestras codificadas (panes de las formulaciones control, HM10, HM20 y HM30) comparándolas con una muestra testigo ciega (pan de la formulación control). La

#### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

evaluación fue realizada respecto a las diferencias globales y, en particular, al color de la corteza, la cohesividad de la miga y el grado de cocción de la miga. Los resultados se presentan en la Figura 4.11.



Figura 4.11. Puntajes de la prueba de diferencia con un testigo en relación a a) diferencias globales, b) color de la corteza y c) grado de cocción (promedio  $\pm$  error estándar). Letras diferentes entre las columnas de cada gráfico indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 20)

Como fue mencionado anteriormente, la muestra testigo correspondía a la formulación control y, como era esperado, la muestra control no fue percibida como diferente de la muestra testigo, como indicaron sus puntajes tan cercanos al valor cero.

Por otro lado, el empleo de concentraciones cada vez mayores de HM produjo, en general, un aumento progresivo en la magnitud de las diferencias que los evaluadores percibieron respecto al testigo.

El color de la corteza fue percibido progresivamente menos tostado que el control, siendo esto coherente con los resultados observados para los parámetros L\* y *BI* (Sección 4.2.5). Por otro lado, la miga de pan presentó una tendencia importante a ser

considerada como menos cocida a medida que el contenido de HM fue mayor. Esto podría deberse a varios factores, entre los que se destacarían la mayor humedad de la miga y la creciente proporción de almidón no gelatinizado a concentraciones mayores de HM, además de un posible sesgo por parte de los evaluadores relacionado al color menos tostado que presentó la corteza de los panes con elevado contenido de HM.

Por otro lado, la cohesividad no presentó diferencias entre ninguna de las muestras. Para este atributo la dispersión de las respuestas obtenidas fue muy importante, oscilando entre los extremos de la escala (-4 para "mucho menos cohesiva" y 4 para "mucho más cohesiva", Anexo A) de forma indistinta. A pesar de la definición concisa presentada en la planilla de evaluación para este atributo, se cree que la dispersión observada pudo deberse a la falta de familiaridad por parte de los evaluadores respecto a un parámetro textural como la cohesividad y, principalmente, el desconocimiento sobre cómo se percibe sensorialmente una miga más o menos cohesiva.

A pesar de esto, la prueba de diferencias con un testigo permitió establecer que los consumidores son capaces de percibir diferencias, tanto globales como particulares, cuando las muestras codificadas son presentadas contra una muestra de pan común. Por lo tanto, posteriormente se realizó un ensayo de aceptabilidad empleando escalas hedónicas para determinar si las diferencias percibidas entre los productos se traducirían o no en diferencias de aceptabilidad, y si estas diferencias favorecerían o no a los panificados formulados con almidón resistente.

# 4.5.2. <u>Ensayo de aceptabilidad y percepción nutricional: prueba con escalas</u> <u>hedónicas</u>

La evaluación de la aceptabilidad en los panificados con almidón resistente se realizó sobre las formulaciones control y HM20. Si bien HM30 presentó las características nutricionales más beneficiosas para la salud, también mostró un marcado descenso de su calidad. Por el contrario, la formulación HM10 tuvo un desempeño similar a HM20 en la mayoría de los parámetros de calidad evaluados, pero su consumo no ofrecería tantos beneficios para la salud como la formulación con 20% de HM. Por su parte, esta última mostró un buen desempeño en la panificación y adecuadas características de

## <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

calidad tecnológica (principalmente en relación a su volumen específico, textura y alveolado) y nutricional (elevado contenido de fibra y baja digestibilidad). Por esta razón, se consideró que HM20 presentaba un balance adecuado entre calidad tecnológica y nutricional, por lo que fue seleccionada para ser comparada con el control en las pruebas de aceptabilidad.

La evaluación procedió en dos etapas. En la primera, las muestras fueron entregadas a los evaluadores de forma codificada. En la segunda etapa, en cambio, los evaluadores realizaron la apreciación de las muestras rotuladas y con información nutricional (Anexo C).

La mayoría de los consumidores puntuaron a ambas muestras por encima de 6 en los diferentes atributos. Los resultados fueron analizados en forma bifactorial, siendo los factores "formulación" e "información". El análisis no mostró interacción entre ambos factores (p < 0,05) y tampoco se encontraron diferencias significativas cuando el puntaje promedio para cada atributo fue comparado entre muestras. Estos puntajes se reflejan en la Tabla 4.8.

	Con	trol	HM20			
Atributo	Sin	Con	Sin	Con		
Allibuto	información	información	información	información		
Apariencia	8 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	8 ± 1		
Textura	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1		
Sabor	7 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	8 ± 1		
Color	7 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	7 ± 1		
Aceptabilidad general	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	8 ± 1		

Tabla 4.8. Puntaje promedio de las muestras evaluadas sin y con información nutricionalControlHM20

Promedio ± desvío estándar.

Esto indicaría que, si bien los evaluadores son capaces de percibir las diferencias entre los productos, como quedó de manifiesto según los resultados de la prueba de discriminación, su nivel de agrado hacia las diferentes características de los mismos no se ve afectado.

Los puntajes que los evaluadores dieron sobre los diferentes atributos de las muestras se presentan en los histogramas de la Figura 4.12. En ellos se presenta la frecuencia porcentual de cada respuesta para cada atributo. A pesar de que el efecto de aportar información nutricional junto con las muestras no produjo modificaciones en el puntaje promedio, es posible extraer cierta información adicional de los histogramas.



Figura 4.12. Histogramas de los puntajes en la prueba de escalas hedónicas realizada sin o con información nutricional para los atributos a) apariencia, b) textura, c) sabor, d) color y e) aceptabilidad general

En el caso de la apariencia, la textura y el sabor (Figura 4.12a, b y c), la inclusión del rótulo nutricional produjo un desplazamiento desde 7 hasta 8 y 9 para HM20. El color de la corteza (Figura 4.12d) fue el atributo con mayor dispersión en los puntajes ya que la elección cortezas más blancas o más tostadas depende fuertemente de las

### <u>Capítulo 4: Calidad de panificados frescos con diferentes niveles de almidón</u> <u>resistente</u>

preferencias individuales de cada consumidor, tal como fue comentado por varios evaluadores en las planillas entregadas. En el caso de la aceptabilidad general (Figura 4.12e) la muestra HM20 fue puntuada más frecuentemente con 8 y 9 respecto al control cuando la información nutricional fue incluida.

Estos efectos podrían estar asociados al tipo de producto evaluado y a las declaraciones nutricionales presentadas. Muchos trabajos han vinculado las preferencias sensoriales, intención de compra y voluntad de probar el producto no sólo con el tipo de alimento ni con el ingrediente funcional presente en él, sino con la combinación de ambos: el alimento vehículo del ingrediente funcional y el ingrediente mismo.

Ares y Gámbaro (2007) encontraron que el tipo de "alimento vehículo" fue el principal factor en la percepción de qué tan saludable es el alimento y en la voluntad de probarlo, pero que también la interacción "tipo de vehículo" × "ingrediente funcional" afectaba positivamente los resultados cuando el ingrediente adicionado era uno que el alimento vehículo podía ya contener por sí mismo, como serían los alimentos farináceos con mayor contenido de fibra, en el caso del presente trabajo, en forma de almidón resistente. En el mismo sentido, Grunert (2010) encontró que los alimentos basados en cereales, como barras de granola y panes de centeno, presentaron mayor intención de compra cuando estaban enriquecidos en ingredientes como la fibra, en contraposición con los productos lácteos o elaborados a partir de carne de pescado, donde los enriquecimientos con vitaminas o aceites de pescado y omega-3 son respectivamente preferidos. Además, Carrillo, Varela y Fiszman (2012) reportaron que los consumidores tienden a darle mayor importancia a ciertas declaraciones nutricionales que a otras, siendo "fuente de fibra", "fuente de cereales" y "sin azúcar agregado" las declaraciones más importantes para los consumidores cuando evaluaron diferentes galletitas mediante la observación de su envase. De hecho, el efecto de incluir información nutricional no fue evidente para la muestra control ya que esta muestra no sufrió modificación alguna respecto a la idea de lo que se espera de un pan blanco tradicional, por lo que produciría ninguna sensación de mejorar la salud del consumidor.

La importancia de este estudio preliminar fue la corroboración de que los panificados formulados con almidón resistente serían una alternativa adecuada para la sustitución de panes blancos de trigo, ya que las puntuaciones de los evaluadores demostraron una buena aceptabilidad y los consumidores tienden a preferir productos fortificados de forma coherente, como lo son los productos basados en cereales adicionados con ingredientes derivados de cereales.

#### 4.6. Conclusiones parciales

La utilización de premezclas obtenidas a través del reemplazo de harina de trigo por almidón resistente de alta amilosa para el desarrollo de panificados saludables en este trabajo dio lugar a productos finales con menor contenido de carbohidratos digeribles y menores índices glucémicos estimados in-vitro.

Los productos formulados mantuvieron características sensoriales aceptables y similares a las del producto control. Reemplazos de hasta un 20% permitieron obtener panes con volúmenes específicos tan buenos como los de la muestra control, con cambios en las características texturales y alveolares de la miga que, si bien fueron perceptibles, no afectaron la aceptabilidad de los productos según fue corroborado a través de análisis sensoriales.

Los estudios a través de DSC, ESEM y los experimentos de digestibilidad in-vitro sugieren que los menores índices glucémicos estimados encontrados en las muestras fueron causados por la incapacidad del almidón resistente de gelatinizar bajo las condiciones de horneado.

Los resultados de este trabajo indicaron entonces no sólo que los panificados adicionados con almidón resistente serían un alimento diario adecuado para personas con requerimientos nutricionales especiales, sino que sería pertinente mejorar la calidad de productos elaborados mediante reemplazos aún mayores, como 30%, debido a la importante cantidad de fibra dietaria prebiótica que estos panificados serían capaces de vehiculizar.

El envejecimiento del pan involucra principalmente dos fenómenos. Por un lado, se encuentra la migración de humedad de la miga hacia la corteza, mientras que por el otro está la retrogradación del almidón. Esta produce tanto una liberación de agua adicional, que entonces estaría disponible para migrar, como el endurecimiento de la miga. Particularmente, esto último se da por el aumento de la rigidez de los gránulos gelatinizados al retrogradar la amilopectina en su interior. Se analizarán a continuación los fenómenos mencionados.

# 5.1. Humedad y $a_w$ de la miga

El contenido de agua y la actividad acuosa son los parámetros más importantes en relación al proceso de envejecimiento en productos panificados ya que la movilidad molecular está fuertemente influenciada por el efecto plastificante del agua. La disminución en el contenido de agua favorece la formación de puentes de hidrógeno entre los polímeros del almidón, y entre el almidón y la proteína, conduciendo a una mayor dureza (Giannone et al., 2016). Los valores de la humedad y la  $a_w$  de la miga se muestran en la Tabla 5.1.

Las muestras de miga fresca (día 0) mostraron un incremento progresivo en el contenido de agua a mayores niveles de HM, probablemente debido a la mayor cantidad de agua agregada a las formulaciones con este ingrediente (Sección 3.2.4, Tabla 3.11). Sin embargo, el contenido de agua de la miga decreció progresivamente durante el almacenamiento hasta alcanzar humedades estadísticamente similares entre las distintas formulaciones a partir del día 7.

Respecto a la  $a_w$ , los resultados mostraron una tendencia similar a la encontrada para la humedad. En este caso, todas las muestras partieron con valores iguales de  $a_w$  al inicio del almacenamiento, excepto HM30, la cual presentó un valor ligeramente mayor. A medida que el almacenamiento progresó, se registró una disminución de los valores de  $a_w$  hasta alcanzarse valores de alrededor de 0,94. No se evidenció, a un nivel de significación de  $\alpha$  = 0,05, que existieran interacciones significativas entre los factores "formulación" y "tiempo de almacenamiento" en ninguno de los parámetros evaluados.

	Día	Control	HM10	HM20	HM30
	0	$43,8 \pm 0,3^{dA}$	$44,9 \pm 0,2^{dB}$	45,3 ± 0,3 <sup>eC</sup>	46,4 ± 0,3 <sup>eD</sup>
	1	41,5 ± 1,8 <sup>cA</sup>	$42,6 \pm 0,9^{cAB}$	$43,0 \pm 0,4^{dB}$	$44,4 \pm 0,7^{dC}$
Humedad*	2	39,3 ± 1,9 <sup>bA</sup>	$40,9 \pm 1,5^{\text{cAB}}$	41,3 ± 0,9 <sup>cB</sup>	41,7 ± 0,9 <sup>cB</sup>
	4	$35,0 \pm 1,3^{aA}$	37,6 ± 2,1 <sup>ьв</sup>	$38,0 \pm 1,4^{\text{bB}}$	$38,4 \pm 1,8^{\text{bB}}$
	7	$35,4 \pm 0,7^{aA}$	$36,3 \pm 2,5^{abA}$	$35,9 \pm 1,4^{aA}$	36,5 ± 1,8 <sup>aA</sup>
	9	$34,4 \pm 1,7^{aA}$	35,7 ± 1,5 <sup>abAB</sup>	$36,0 \pm 0,5^{aAB}$	$36,5 \pm 1,0^{aB}$
	11	$34,5 \pm 1,7^{aA}$	35,3 ± 1,8 <sup>aA</sup>	35,7 ± 1,1 <sup>aA</sup>	35,9 ± 1,6 <sup>aA</sup>
<i>a</i> <sub>w</sub> †	0	0,966 ± 0,001 <sup>fA</sup>	$0,966 \pm 0,003^{dA}$	0,966 ± 0,002 <sup>cA</sup>	0,970 ± 0,001 <sup>eB</sup>
	1	0,960 ± 0,002 <sup>eA</sup>	0,963 ± 0,001 <sup>dAB</sup>	$0,963 \pm 0,002^{cAB}$	0,964 ± 0,005 <sup>dB</sup>
	2	$0,953 \pm 0,005^{dA}$	0,954 ± 0,005 <sup>cA</sup>	$0,957 \pm 0,005^{\text{bAB}}$	0,961 ± 0,005 <sup>dB</sup>
$a_w^+$	4	0,946 ± 0,003 <sup>cA</sup>	0,948 ± 0,003 <sup>bA</sup>	$0,948 \pm 0,005^{aA}$	0,953 ± 0,003 <sup>cB</sup>
	7	$0,940 \pm 0,003^{abA}$	$0,945 \pm 0,006^{abAB}$	$0,944 \pm 0,006^{aAB}$	$0,947 \pm 0,003^{abAB}$
	9	0,942 ± 0,004 <sup>bA</sup>	$0,944 \pm 0,003^{abAB}$	$0,945 \pm 0,006^{aAB}$	0,948 ± 0,003 <sup>bAB</sup>
	11	0,937 ± 0,002 <sup>aA</sup>	$0,941 \pm 0,004^{aB}$	$0,945 \pm 0,002^{aC}$	$0,943 \pm 0,003^{\text{aBC}}$

\* Porcentaje p/p. Promedio ± desvío estándar.

† Medido a 25 °C. Promedio ± desvío estándar.

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para una misma formulación (p < 0,05; n = 6). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre formulaciones

para el mismo día de almacenamiento (p < 0,05; n = 6).

#### 5.1.1. <u>Análisis cinético de la pérdida de humedad de la miga</u>

Con el objetivo de estudiar el fenómeno de la migración del agua en la miga durante el almacenamiento se obtuvieron curvas de humedad en función del tiempo y se propuso un modelo de decaimiento exponencial para el ajuste de los datos experimentales (Ecuación 5.1).

%*Humedad* 
$$(g/100g) = y_{\infty} + Ae^{-t/k}$$
 Ecuación 5.1

donde *t* es el tiempo de almacenamiento (en días),  $y_{\infty}$  es el valor de equilibrio del *%Humedad* dado para  $t \rightarrow \infty$ , *k* es la constante de velocidad de migración del agua y, para valores de t > 0 se cumple que: *A* representa la proporción de agua que migra

durante el almacenamiento, calculada como la diferencia entre el valor de *%Humedad* a t = 0 y el valor de equilibrio,  $y_{\infty}$ .

En la Figura 5.1 se presenta una explicación gráfica del modelo propuesto ejemplificando el comportamiento del mismo a diferentes valores de *k*. Como surge a partir del mismo, menores valores de *k* corresponden a velocidades mayores de pérdida de humedad en miga.



Figura 5.1. Ejemplo del modelo empleado para el ajuste de los datos de humedad de la miga durante el almacenamiento

A partir de este modelo se obtuvieron dos parámetros adicionales derivados de los anteriores. Por un lado, la relación -A/k representa la pendiente de la curva a t = 0. Por el otro, el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se relaciona con el tiempo de almacenamiento que debe transcurrir para que la miga disminuya su humedad en un 50% respecto al valor total de pérdida de humedad que tendría lugar tras un almacenamiento durante un tiempo  $t \rightarrow \infty$ . Este parámetro fue calculado a través de las Ecuación 5.2 y Ecuación 5.3.

Para 
$$t = t_{1/2} \rightarrow \%$$
Humedad =  $y_{\infty} + 0,5A$ Ecuación 5.2 $t_{1/2}(días) = -k \ln 0,5$ Ecuación 5.3

Las curvas de ajuste para cada una de las muestras estudiadas se presentan en la Figura 5.2.



Figura 5.2. Ajustes realizados sobre los datos experimentales de humedad de la miga durante el almacenamiento de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30

Los parámetros extraídos de los ajustes se presentan en la Tabla 5.2, mientras que la Tabla 5.3 lista los valores de los parámetros derivados (-A/k y  $t_{1/2}$ ).

En general, las muestras preparadas con HM tuvieron menores diferencias en el comportamiento migratorio del agua entre ellas que con el control. Por otro lado, en la Tabla 5.2 se observa que los valores de  $y_{\infty}$  fueron coherentes con las humedades registradas a partir del día 7 de almacenamiento (Tabla 5.1). Respecto al valor de k, relacionado con la velocidad de decaimiento de la curva, se encontró que todas las muestras con HM presentaron valores similares entre sí, pero significativamente mayores al del control, lo que se relaciona con una pérdida de humedad más lenta.

Tabla 5.2. Parámetros del ajuste de los datos de humedad al modelo exponencial										
Muestra	A (% p/p)	y∞ (% p/p)	k (días)	r² ajustado	Prueba F*					
Control	$10,0 \pm 0,7$	34,2 ± 0,5	2,5 ± 0,5	0,8505	а					
HM10	$10,2 \pm 0,8$	34,9 ± 0,7	3,5 ± 0,8	0,8351	b					
HM20	10,5 ± 0,5	35,0 ± 0,5	3,5 ± 0,5	0,9327	bc					
HM30	11,3 ± 0,6	35,4 ± 0,5	3,3 ± 0,5	0,9060	С					

\* Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas entre los conjuntos de datos ajustados (p < 0.05; n = 6).

En el mismo sentido, cuando se evaluó la pendiente inicial de la curva de decaimiento (-A/k en la Tabla 5.3) se encontró que el control presentó una pendiente más pronunciada, indicando una mayor velocidad en la pérdida de humedad. Por otro lado, HM10 y HM20 exhibieron las pendientes menos pronunciadas, lo que se relaciona con una mayor lentitud en el proceso. En las migas con HM30 la velocidad de pérdida de humedad resultó intermedia entre las encontradas para el control y las muestras HM10 y HM20. El  $t_{1/2}$ , relacionado con el valor de k, indicó que todas las muestras con HM requirieron más tiempo que el control para alcanzar el 50% de pérdida de la humedad, observándose valores similares para las muestras con HM.

Fabla 5.3. Parámetros adicionales derivados del aju	uste
---	------

Muestra	-A/k (% p/p/día)	t <sub>1/2</sub> (días)
Control	$-4,0 \pm 0,4$	1,7 ± 0,3
HM10	-2,9 ± 0,5	2,4 ± 0,6
HM20	$-3,0 \pm 0,3$	2,4 ± 0,3
HM30	$-3,4 \pm 0,3$	2,3 ± 0,3

Valor ± error estándar.

Estos resultados sugieren que, aunque los niveles de humedad alcanzados al final del almacenamiento son similares entre el control y las muestras con HM, el agua se movilizaría con más dificultad en las matrices que contienen HM.

#### 5.2. Retrogradación de amilopectina

#### 5.2.1. <u>Patrones de difracción de rayos-X y cristalinidad de la miga</u>

Los difractogramas obtenidos para la harina de trigo, el almidón resistente (HM) y el almidón extraído de la harina de trigo se muestran en las Figura 5.3a, b y c, respectivamente. La harina exhibió fuertes picos de cristalinidad a ángulos 20 de 15,01° y 23,32°, incluyendo también un doblete a 17,38° y 18,10°, los cuales son típicos de estructuras cristalinas tipo A existentes en cereales. Otro pico más pequeño fue encontrado a los 20,40°, correspondiéndose este último con estructuras cristalinas tipo V relacionadas al complejo amilosa-lípido (Figura 5.3a). Estos picos en harinas de trigo y almidones de alta amilosa de maíz fueron reportados también por Román, Dura, Martínez, Rosell, y Gómez (2016) y por Shamai, Bianco-Peled, y Shimoni (2003), respectivamente. Por otro lado, el patrón correspondiente al HM presentó picos intensos a ángulos 20 de 13,01°, 17,14° y 19,74°, con un pequeño pico en 15,21° y un doblete de baja intensidad en el rango de 22,55-23,68°, lo cual podría ser atribuido a una combinación de estructuras tipo B y V (Figura 5.3b). Este resultado fue coherente con el informado previamente por Miao, Jiang, y Zhang (2009). Además, el almidón extraído de la harina de trigo presentó un difractograma con fuertes picos a 15,03° y 22,91°, con un doblete de gran intensidad a 16,98° y 18,12°, mostrando un patrón tipo A. La muestra exhibió también un pequeño pico adicional a 19,67° que se relacionaría a estructuras tipo V (Figura 5.3c).

Cuando las materias primas son utilizadas en el proceso de la panificación, el cual incluye etapas de hidratación, hidrólisis y horneado, las estructuras cristalinas presentes en ellas son modificadas. Si bien algunos cambios en la cristalinidad son rápidamente reversibles, como el restablecimiento del complejo amilosa-lípido, otros son irreversibles, y requieren de tiempos prolongados para volver a establecerse o se reorganizan formando otras estructuras. Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 5.3. Patrones de difracción de rayos-X de a) harina de trigo, b) almidón resistente (HM) y c) almidón extraído de la harina de trigo

La retrogradación es un proceso en el cual las moléculas de polisacárido que componen al almidón, que luego del calentamiento se encuentran interactuando con el agua, se reorganizan formando cristales debido al aumento de las interacciones amilosa-amilosa, amilopectina-amilopectina y amilosa-amilopectina. Estas estructuras cristalinas son capaces de interactuar con los haces de rayos-X que inciden sobre ellas, dando patrones con picos de cristalinidad característicos. Esto significa que la retrogradación debe ir acompañada de un aumento en la intensidad de los picos asociados a tales arreglos cristalinos.

Para analizar posibles cambios en la retrogradación y en el establecimiento de los arreglos cristalinos de los panificados estudiados durante el almacenamiento, se obtuvieron los difractogramas de muestras de miga cada formulación en el día de la panificación (día 0) y en el último día de almacenamiento a 20 °C (día 11). Los mismos se muestran en la Figura 5.4.



Figura 5.4. Patrones de difracción de rayos-X al inicio (línea negra) y luego de 11 días de almacenamiento (línea azul) de migas a-b) control, c-d) HM10, e-f) HM20 y g-h) HM30. Las líneas punteadas indican la posición de los picos analizados.

En todos los casos se observó que todos los difractogramas presentaron patrones de forma amplia y de aspecto gaussiano, lo cual se relacionaría a un elevado contenido de material en estado amorfo. Sin embargo, también fue posible detectar, en todos los casos, picos asociados a la presencia de material cristalino. En todas las muestras se detectaron los mismos tipos de picos, es decir, ubicados a ángulos  $2\theta$  equivalentes. Sin embargo, dependiendo la formulación y su tiempo de almacenamiento, estos picos exhibieron distintos patrones de intensidad relativa.

En general, todas las muestras manifestaron al día 0 picos de cristalinidad alrededor de los 20° debido a la presencia del complejo amilosa-lípido, el cual se encuentra asociado a este pico. Sin embargo, se observó que aquellas formulaciones con HM presentaron, también al día 0, mayor intensidad de los picos a 13°, 15° y 17° que el control. Además, las formulaciones con mayor nivel de reemplazo (HM20 y HM30) presentaron un aumento más marcado en el pico a 22°. En todos los casos el patrón exhibido fue de tipo B, el cual se manifiesta como un pico intenso simple a 17° y picos de menor intensidad a 13°, 15° y 22°.

La manifestación de patrones tipo B estaría asociada a la pérdida de la estructura cristalina nativa tipo A característica del almidón de la harina de trigo durante la gelatinización, a la cual le siguen la recristalización de los componentes almidonosos amorfos en un nuevo arreglo (Ribotta, Cuffini, León, y Añón, 2004). Mientras que, por otro lado, el aumento en los picos de cristalinidad en las formulaciones con almidón resistente estaría directamente asociada a la fase cristalina aportada por el HM.

Por otra parte, al finalizar el almacenamiento, todas las muestras presentaron picos a 13°, 15°, 17° y 22° con mayor intensidad que los correspondientes al día 0, y siempre exhibiendo patrones asociados a estructuras tipo B. Esto indicaría que durante el almacenamiento a 20 °C ocurrió una reestructuración de las cadenas de polisacárido que dio lugar a un aumento en la fase cristalina. Estos resultados fueron coherentes con aquellos reportados por Ribotta et al. (2004), donde el almacenamiento de miga de pan durante 24, 72 y 168 hs produjo un aumento en la intensidad de los picos ubicados a 15°, 17° y 22°, sin cambios aparentes en el correspondiente a estructuras tipo V asociadas al complejo amilosa-lípido (ubicado a los 20°).

#### 5.2.2. <u>Análisis cinético de la retrogradación de la amilopectina</u>

Las muestras de miga de pan almacenado se analizaron a través de ensayos de DSC para evaluar los cambios sufridos por la amilopectina durante su retrogradación. Las

temperaturas características de la miga de pan para cada día de almacenamiento se muestran en la Tabla 5.4. La Figura 5.5 es presentada con el objetivo de facilitar el análisis y comparar visualmente estos comportamientos.

En ninguna de las muestras fue posible detectar transiciones térmicas asignables a la fusión de la amilopectina retrogradada en el día 0. Las endotermas correspondientes a la disociación del complejo amilosa-lípido se registraron a partir de los 105 °C para el control, de los 109 °C para HM10, 101 °C para HM20 y 102 °C para HM30.

Luego del primer día de almacenamiento comenzaron a evidenciarse endotermas relacionadas a la fusión de los cristales de la amilopectina retrogradada. Si se analizan las temperaturas de la endoterma en el día 1, se observa que el control mostró una temperatura inicial (T<sub>i</sub>) y de pico (T<sub>p</sub>) más altas que las muestras con HM. En general, las temperaturas se desplazaron a valores más altos durante el almacenamiento. El grado de desplazamiento de la endoterma a valores más altos varió de acuerdo a la formulación, lo que se vio particularmente bien reflejado en la T<sub>p</sub>. Esta temperatura resulta más adecuada para la evaluación de estos corrimientos ya que su determinación es más precisa que la de las T<sub>i</sub> y las T<sub>f</sub>. La T<sub>p</sub> del control se desplazó 5,2 °C hacia temperaturas mayores entre el día 1 y el día 11 de almacenamiento, mientras que las muestras con HM presentaron desplazamientos, entre los valores al día 1 y los del día 11, que fueron decrecientes a medida que aumentó la concentración de HM en la formulación (3,8; 1,8 y 0,6 °C para HM10, HM20 y HM30, respectivamente). El análisis bifactorial indicó la existencia de interacciones significativas entre el factor "formulación" y el factor "tiempo de almacenamiento" en todos los casos. Esto significa que la concentración de HM en el sistema influye en cómo evoluciona el proceso de retrogradación. El desplazamiento a mayores temperaturas de una endoterma de fusión cristalina, como lo es la retrogradación de la amilopectina, indica una mayor estabilidad de los cristales debido a la recristalización ocurrida durante el almacenamiento (Shujun Wang, Li, Copeland, Niu, y Wang, 2015).

Tabla 5.4. Temperaturas características de la miga de pan a lo largo del almacenamiento									
Muestra	Día	T <sub>i</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)					
	0	nd	nd	nd					
	Transpace of the second seco	$80,7 \pm 0,5^{bcdef}$							
	2	$51,5 \pm 1,0^{hij}$	de la iniga de pair a lo largo del annacentamiento(°C)Tp (°C)Tf (°C)ndndnd $\pm 1,1^{fghij}$ $65,9 \pm 0,3^{f}$ $80,7 \pm 0,5^{bcdef}$ $\pm 1,0^{hij}$ $64,5 \pm 0,7^{def}$ $83,6 \pm 1,1^{defgh}$ $\pm 0,5^{ijk}$ $68,5 \pm 0,3^{g}$ $85,0 \pm 0,1^{fghij}$ $\pm 2,2^{ghij}$ $68,1 \pm 1,2^{g}$ $87,5 \pm 1,1^{hijk}$ $\pm 0,6^{ik}$ $69,2 \pm 0,7^{gh}$ $93,0 \pm 3,9^{ij}$ $0 \pm 2,4^{k}$ $71,1 \pm 2,4^{h}$ $90,4 \pm 0,2^{k}$ ndndnd $82,0,4 \pm 0,4^{a}$ $60,5 \pm 1,2^{a}$ $82,4 \pm 1,4^{cdefg}$ $\pm 2,6^{defgh}$ $62,1 \pm 1,3^{ab}$ $80,0 \pm 0,1^{bc}$ $\pm 0,9^{defgh}$ $62,5 \pm 0,4^{abcd}$ $81,3 \pm 0,6^{bcd}$ $\pm 0,8^{cdef}$ $61,8 \pm 0,4^{ab}$ $81,3 \pm 1,8^{bcde}$ $\pm 0,6^{cde}$ $61,9 \pm 0,9^{ab}$ $87,6 \pm 3,6^{i}$ $\pm 1,4^{efghij}$ $64,3 \pm 1,0^{cdef}$ $85,1 \pm 0,4^{ghij}$ ndndnd $\pm 2,7^{ab}$ $60,6 \pm 0,9^{a}$ $82,7 \pm 0,3^{cdefg}$ $\pm 1,4^{cdefg}$ $62,2 \pm 1,0^{ab}$ $80,8 \pm 1,4^{bcd}$ $\pm 0,5^{bcd}$ $62,2 \pm 1,0^{ab}$ $80,8 \pm 1,4^{bcd}$ $\pm 0,3^{ijk}$ $64,9 \pm 1,1^{ef}$ $84,1 \pm 1,0^{efghi}$ $\pm 2,5^{abc}$ $62,4 \pm 0,2^{abcd}$ $85,5 \pm 0,1^{ghij}$ ndndnd $\pm 2,6^{ab}$ $62,2 \pm 1,5^{abc}$ $76,0 \pm 0,6^{a}$ $\pm 0,7^{cd}$ $61,6 \pm 0,3^{ab}$ $79,2 \pm 0,7^{b}$ $\pm 3,33^{bcd}$ $62,6 \pm 1,8^{bcd}$ $79,4 \pm 2,6^{b}$ $\pm 0,7^{efghij}$						
Control	4	51,8 ± 0,5 <sup>ijk</sup>	68,5 ± 0,3 <sup>g</sup>	$85,0 \pm 0,1^{\text{fghij}}$					
	7	51,2 ± 2,2 <sup>ghij</sup>	68,1 ± 1,2 <sup>g</sup>	87,5 ± 1,1 $^{hijk}$					
	9	53,0 ± 0,6 <sup>jk</sup>	69,2 ± 0,7 <sup>gh</sup>	93,0 ± 3,9 <sup>ij</sup>					
	11	$54,9 \pm 2,4^{k}$	71,1 ± 2,4 <sup>h</sup>	$90,4 \pm 0,2^{k}$					
	0	nd	nd	nd					
	1	$41,8 \pm 0,4^{a}$	60,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	82,4 $\pm$ 1,4 <sup>cdefg</sup>					
	2	48,4 ± 2,6 <sup>defgh</sup>	62,1 ± 1,3 <sup>ab</sup>	$80,0 \pm 0,1^{bc}$					
HM10	4	$48,8 \pm 0,9^{\text{defgh}}$	$62,5 \pm 0,4^{abcd}$	81,3 ± 0,6 <sup>bcd</sup>					
	7	47,9 ± 0,8 <sup>cdef</sup>	61,8 ± 0,4 <sup>ab</sup>	81,3 ± 1,8 <sup>bcde</sup>					
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	9	47,6 ± 0,6 <sup>cde</sup>	61,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>	87,6 ± 3,6 <sup>j</sup>					
	$50,2 \pm 1,4^{efghij}$	64,3 ± 1,0 <sup>cdef</sup>	$85,1 \pm 0,4^{\text{ghij}}$						
	0	nd	nd	nd					
	1	$43,9 \pm 2,7^{ab}$	$60,6 \pm 0,9^{a}$	$82,7 \pm 0,3^{cdefg}$					
	2	$48,0 \pm 1,4^{cdefg}$	$62,8 \pm 1,4^{bcd}$	$80,2 \pm 1,1^{bc}$					
HM20	4	$46,6 \pm 0,5^{bcd}$	62,2 ± 1,0 <sup>ab</sup>	$80,8 \pm 1,4^{bcd}$					
	7	$48,2 \pm 0,4^{\text{defg}}$	63,0 ± 1,0 <sup>bcde</sup>	82,7 ± 1,1 <sup>cdefg</sup>					
	9	51,9 ± 0,3 <sup>ijk</sup>	64,9 ± 1,1 <sup>ef</sup>	$84,1 \pm 1,0^{efghi}$					
	11	44,9 ± 2,5 <sup>abc</sup>	$62,4 \pm 0,2^{abcd}$	$85,5 \pm 0,1^{\text{ghij}}$					
	0	nd	nd	nd					
	1	$43,6 \pm 2,6^{ab}$	$62,2 \pm 1,5^{abc}$	$76,0 \pm 0,6^{a}$					
	2	$46,9 \pm 0,7^{cd}$	61,6 ± 0,3 <sup>ab</sup>	$79,2 \pm 0,7^{b}$					
HM30	4	46,6 ± 3,33 <sup>bcd</sup>	62,6 ± 1,8 <sup>bcd</sup>	$79,4 \pm 2,6^{b}$					
	7	49,9 ± 0,8 <sup>efghij</sup>	$62,5 \pm 0,4^{abcd}$	82,9 ± 3,2 <sup>cdefg</sup>					
	9	$50,0 \pm 0,7^{efghij}$	$62,8 \pm 0,9^{bcd}$	83,3 ± 1,4 <sup>defg</sup>					
	11	48,9 ± 0,6 <sup>defghi</sup>	62,8 ± 0,1 <sup>bcde</sup>	$84,6 \pm 0,3^{efghi}$					

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

nd: no detectado.

T<sub>i</sub>, T<sub>p</sub> y T<sub>f</sub> son las temperaturas iniciales, de pico y finales, respectivamente.

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (n = 3; p < 0.05).

Las entalpías de las endotermas obtenidas fueron ajustadas con el modelo de Avrami, el que ha sido originalmente aplicado a la cinética de cristalización de materiales poliméricos. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en sistemas a base de almidón para analizar el fenómeno de retrogradación. Si bien la aplicación del modelo de Avrami a la retrogradación ha sido cuestionada, ya que es un fenómeno de

no-equilibrio (Slade y Levine, 1987), sigue siendo útil desde un punto de vista empírico porque permite, entre otras cosas, comparar resultados de distintas fuentes.



Figura 5.5. Evolución de las temperaturas características a)  $T_i$ , b)  $T_p$  y c)  $T_f$  de la miga durante el almacenamiento (promedio ± error estándar)

La adaptación de este modelo cuando se emplean entalpías asociadas a la retrogradación se representa en la Ecuación 5.4.

$$\theta_H = \frac{H_{\infty} - H_t}{H_{\infty} - H_0} = e^{-k_H t^n}$$
 Ecuación 5.4

donde,  $\theta_H$  es la fracción retrogradada al tiempo t de almacenamiento,  $H_{\infty}$  es la entalpía asociada a la retrogradación luego de transcurrido un tiempo  $t \rightarrow \infty$ ,  $H_0$  es la entalpía al tiempo t = 0, y  $H_t$  es la entalpía al tiempo t = t;  $k_H$  es la constante de velocidad y n es el coeficiente de Avrami. Este último está relacionado con la geometría del crecimiento de los cristales, que puede ser lineal, planar o tridimensional. Numerosos autores han encontrado valores de n cercanos a 1 al realizar el ajuste para retrogradación de almidón de trigo en panificados (Angioloni y Collar, 2011; Barros et al., 2018; Ronda, Quilez, Pando, y Roos, 2014).

Teniendo en cuenta que en este caso no se detectaron endotermas al tiempo 0 ( $H_0$  = 0), y fijando n = 1, se reordenó la Ecuación 5.4 obteniéndose la Ecuación 5.5, que establece la relación entre las entalpías y el tiempo de almacenamiento.

$$H_t = H_{\infty}(1 - e^{-k_H t})$$
 Ecuación 5.5

Los valores de entalpía obtenidos experimentalmente y las curvas de ajuste a la Ecuación 5.5 se muestran en la Figura 5.6.

Asimismo, se calculó también el tiempo de vida media ( $t_{1/2H}$ ), el cual se define como el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la retrogradación que tendría lugar luego de transcurrido un tiempo  $t \rightarrow \infty$ . Este parámetro se obtuvo a través de la Ecuación 5.6.

$$t_{1/2H} = \left(-\frac{\ln 0.5}{k_H}\right)^{1/n}$$
 Ecuación 5.6

Los parámetros obtenidos del ajuste, así como los valores de  $t_{1/2H}$ , se presentan en la Tabla 5.5.



Figura 5.6. Ajustes al modelo de Avrami realizados sobre los valores de entalpía durante el almacenamiento de panes a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30

Tabla 5.5. Parámetros del ajuste al modelo de Avrami de las entalpías asociadas a la retrogradación

			in failes J	r- ujustuuo	гтиери г+	$\iota_{1/2H}$ (ulus)
Control 3	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	1,02 ± 0,26	0,8581	а	0,68 ± 0,18
НМ10 е	5,5 ± 0,6	8,5 ± 0,7	$0,25 \pm 0,05$	0,9182	b	$2,80 \pm 0,04$
HM20 5	5,8 ± 0,9	8,9 ± 1,3	$0,22 \pm 0,08$	0,8336	b	3,19 ± 0,05
HM30 3	3,2 ± 0,3	5,8 ± 0,5	0,35 ± 0,09	0,8101	С	1,98 ± 0,06

Valor promedio ± error estándar.

\* Base almidón total.

+ Base almidón de trigo (gelatinizable).

 $\pm$  Diferentes letras en pruebas F indican diferencias significativas entre muestras (p < 0.05; n = 3).

Los resultados del ajuste sugieren que la extensión de la retrogradación aumenta cuando la formulación contiene HM, como se deduce de los valores de  $H_{\infty}$ . En la miga control, la mayor parte de la retrogradación ocurre entre el primer y el segundo día de almacenamiento, lo cual queda de manifiesto por sus valores de  $k_H$  y  $t_{1/2H}$ . Todas las

formulaciones con HM presentaron una progresión más lenta en la retrogradación. Sin embargo, en estas muestras la retrogradación alcanzó mayores niveles, tal como se ve en sus mayores  $H_{\infty}$ . Así, las muestras con HM retrogradan más, pero más lentamente.

Como puede verse en la Tabla 5.5, las entalpías límite fueron obtenidas usando distintas bases de cálculo, al igual que como se realizó durante el análisis de las transiciones térmicas de las masas (Sección 3.5). La  $H_{AG^{\infty}}$  representa la entalpía a tiempo  $t \to \infty$  expresada en Joules por gramo de almidón gelatinizable, es decir, de almidón de trigo. La expresión de este parámetro en esta base permite evaluar la extensión de la retrogradación del almidón que es capaz de atravesar este proceso. Empleando estos valores y los informados en la Tabla 3.22, donde se evaluó la entalpía de gelatinización del almidón de trigo en el pan ( $\Delta H_{AT}$ ), es posible calcular el índice de retrogradación (IR) según la Ecuación 5.7.

$$IR (\%) = 100 \times \frac{H_{AG\infty}}{\Delta H_{AT}}$$
 Ecuación 5.7

donde *IR* es el índice de retrogradación,  $H_{AG\infty}$  representa la entalpía correspondiente a la retrogradación del almidón de trigo a tiempo  $t \rightarrow \infty$  de almacenamiento, y  $\Delta H_{AT}$ representa la entalpía de gelatinización del almidón de trigo en la masa (Correa y Ferrero, 2015).

Los valores de *IR* obtenidos fueron de 37, 102, 107 y 68% para el control, HM10, HM20 y HM30, respectivamente, siendo el valor hallado para el control consistente con los resultados obtenidos por Correa y Ferrero (2015). Esto indicaría que el almidón de trigo contenido en la miga control retrograda en menor grado que cuando está presente en matrices que contienen HM.

#### 5.3. Textura de la miga en el envejecimiento del pan

Durante el envejecimiento del pan, y como resultado de la pérdida de humedad y la retrogradación, fenómenos que se encuentran relacionados entre sí, se observan cambios en la textura de la miga. La evolución de la textura durante el almacenamiento

es crítica para determinar la vida útil comercial de los panificados. Con el objetivo de estudiar los cambios en la textura de la miga en el tiempo, se registró la dureza de los panes correspondientes a cada formulación, y los datos se ajustaron al modelo de Avrami según la Ecuación 5.8. Diversos autores han utilizado con éxito este modelo para analizar la cinética de envejecimiento del pan empleando parámetros texturales como la dureza (Angioloni y Collar, 2011; Ronda et al., 2014; Tian et al., 2009; Zhou, Peng, y Xu, 2007).

$$\frac{D_{\infty} - D_t}{D_{\infty} - D_0} = e^{-k_D t^n}$$
 Ecuación 5.8

donde *D* representa la dureza, los subíndices  $\infty$ ,  $t \neq 0$  indican los valores de dureza a los tiempos  $t \rightarrow \infty$ ,  $t = t \neq t = 0$ , respectivamente,  $k_D$  es la constante de velocidad de aumento de la dureza y n es el coeficiente de Avrami.

Nuevamente, para la obtención de un ajuste adecuado se restringió el modelo fijando el valor de n = 1 (Zhou et al., 2007). Por otro lado, los datos de dureza fueron expresados como incrementos de la dureza a lo largo del almacenamiento respecto a la dureza inicial (día 0). Realizando estas modificaciones, la Ecuación 5.8 puede expresarse como se indica en la Ecuación 5.9.

$$D_t - D_0 = (D_{\infty} - D_0)(1 - e^{-k_D t^n})$$
 Ecuación 5.9

Además, se utilizó el tiempo de vida media ( $t_{1/2D}$ ), en este caso definido como el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la dureza potencial a  $t \rightarrow \infty$ , como parámetro para evaluar la velocidad del proceso (con n = 1, este parámetro se obtiene de forma análoga a como se realizó para la entalpía de retrogradación con la Ecuación 5.6). Los ajustes realizados para los valores de dureza se presentan en la Figura 5.7, y los valores de los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 5.6.

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 5.7. Ajustes al modelo de Avrami de los datos de dureza de miga de pan a) control, b) HM10, c) HM20 y d) HM30 durante el almacenamiento.

Tabla 5.6. Parámetros	del a	ajuste	al	modelo	de	Avrami	de	los	datos	de	dureza	durante	el
almacenamiento													

Muestra	$D_{\infty}(N)$	k₂ (días⁻¹)	r² ajustado	Prueba F	t <sub>1/2D</sub> (días)
Control	19 ± 2	0,13 ± 0,03	0,7382	а	5,26 ± 0,02
HM10	18 ± 1	0,17 ± 0,02	0,8625	ab	4,17 ± 0,01
HM20	19 ± 1	0,19 ± 0,03	0,8090	b	3,57 ± 0,02
HM30	39 ± 5	0,09 ± 0,02	0,8701	С	7,47 ± 0,02

Valor  $\pm$  desvío estándar. Diferentes letras en las pruebas F indican diferencias significativas entre muestras (p < 0.05; n = 24).

En el presente estudio, los datos de dureza de la miga ajustaron adecuadamente al modelo de Avrami. La evolución de las curvas fue similar para el caso de las muestras control, HM10 y HM20, las cuales presentaron los menores valores de  $D_{\infty}$ . Por el contrario, el mayor endurecimiento de la miga fue registrado en los panes con mayor contenido de almidón resistente, HM30. Esta muestra alcanzó valores de  $D_{\infty}$  que duplican los de las otras formulaciones. Sin embargo, también presentó la menor

velocidad de aumento de la dureza, como se deduce tanto de su valor de  $k_D$  como de su  $t_{1/2D}$ .

Si bien se ha establecido en bibliografía que el envejecimiento de los panificados y el consecuente deterioro de su calidad textural se relacionan directamente con la retrogradación de la amilopectina, en panes que incluyen ingredientes como el almidón resistente, que no presenta transiciones térmicas (no fueron observadas ni gelatinización ni, por lo tanto, retrogradación), esta relación podría no ser suficiente para explicar los cambios durante el almacenamiento. En este caso, panes con alto contenido de HM sufren mayor retrogradación, pero sólo niveles de reemplazo del 30% producen un mayor endurecimiento.

En el pan, donde la humedad de la miga es relativamente elevada, la compresión de la miga deforma las paredes alveolares hasta producir su colapso y, en algunos casos, su ruptura. La deformación que es capaz de soportar la pared alveolar antes de que se produzcan estos fenómenos dependerá fundamentalmente de sus propiedades mecánicas, las cuales a su vez son resultado la combinación de diferentes factores, como su contenido de humedad, tamaño, forma y espesor del alveolo. Por su parte, la naturaleza de estos factores está gobernada por las proporciones relativas de los componentes que la integran, así como de los procesos de cocción (Stokes y Donald, 2000). En los sistemas en estudio, donde las condiciones de procesamiento han sido estandarizadas, los factores que más influencia tendrán en las propiedades mecánicas de la miga serán entonces su contenido de humedad, su porosidad y su composición.

En un trabajo pionero sobre las propiedades mecánicas de alimentos porosos, Attenburrow, Goodband, Taylor, y Lillford (1989) propusieron una relación entre los módulos mecánicos y la porosidad de la miga representada como se muestra en la Ecuación 5.10.

$$\frac{E_M}{E_A} = C \times \left(\frac{\rho_M}{\rho_A}\right)^2 \to E_M = E_A \times C \left(\frac{\rho_M}{\rho_A}\right)^2$$
 Ecuación 5.10

donde  $E_M$  es el módulo de Young de la miga,  $E_A$  es el módulo de Young de la pared alveolar, *C* es una constante de proporcionalidad,  $\rho_M$  es la densidad de la miga y  $\rho_A$  es la densidad de la pared alveolar.

La magnitud de  $E_A$  estará gobernada principalmente por su composición. Migas más húmedas y con alta proporción de gluten presentarían valores de  $E_A$  más bajos. Mientras que migas con baja hidratación, poco gluten y/o cargadas con componentes más rígidos (como fibra insoluble, gránulos de almidón no gelatinizados) tenderían a valores de  $E_A$  elevados. En cuanto a la  $\rho_M$ , sus valores dependerán de la porosidad de la miga (mayor porosidad, menor  $\rho_M$ ), mientras que para  $\rho_A$  se deberá tener en cuenta la composición de la pared alveolar. Es importante tener en cuenta que estos parámetros, especialmente aquellos asociados a la pared alveolar, podrán presentar variaciones durante el almacenamiento relacionadas a cambios estructurales y de composición (retrogradación, relocalización del agua y deshidratación).

Las diferencias en la progresión de la dureza observadas entre HM30 y las muestras control, HM10 y HM20 podrían ser explicadas en base a estos conceptos. Las Figura 5.8 y Figura 5.9 se presentan con el objetivo de facilitar la interpretación de los fenómenos.

En los panes frescos, tanto el control como HM10 y HM20 presentaron volúmenes específicos y porosidades similares, por lo que sus valores de  $\rho_M$  serían también similares (Secciones 4.2.1 y 4.2.3) (Figura 5.8a). Por otro lado, en los panes control, HM10 y HM20 el contenido de gluten disminuyó progresivamente a medida que aumentó la proporción de HM utilizado (Sección 3.2.1). En esta situación se esperaría un incremento progresivo en los valores de  $E_A$  debido a la presencia de gránulos de almidón resistente y el menor contenido de gluten en HM10 y HM20. Sin embargo, este efecto se encontraría amortiguado debido al mayor contenido de humedad en la miga de HM10 y HM20 (Sección 4.2.4), y a que en estas formulaciones fue posible obtener una red de gluten desarrollada y bien distribuida (Secciones 3.6.1 y 3.6.3).



Figura 5.8. Modelo representativo de las características estructurales, composicionales y mecánicas de la miga de pan a) sin almidón resistente y b) con elevado contenido de almidón resistente tipo II.

La formulación HM30, en cambio, presentó menor volumen específico y exhibió una miga más compacta, lo que resultaría en un mayor valor de  $\rho_M$ . A su vez, el elevado contenido de gránulos de almidón resistente de esta muestra dificultó la adecuada formación de la red de gluten (Secciones 3.2.4 y 3.6.3), que además se encontró fuertemente diluida (Figura 5.8b). En esta muestra, el contenido ligeramente mayor de humedad de la miga podría no ser suficiente para compensar estos efectos. Así, HM30 partiría entonces, desde el día 0, con un valor de *E*<sub>A</sub> más elevado que el de las demás formulaciones, lo cual se reflejaría en mayores *E*<sub>M</sub> y, consecuentemente en los mayores valores de dureza hallados para el pan fresco (Sección 4.2.2).

Durante el almacenamiento, la pérdida de humedad, la retrogradación de la amilopectina en las estructuras granulares remanentes, la deshidratación del gluten y la rigidización de la red de amilosa y amilopectina extragranulares son fenómenos que

provocarán aumentos en *E*<sub>A</sub> (Bosmans, Lagrain, Ooms, Fierens, y Delcour, 2013; Stokes y Donald, 2000).

En el pan control, la rápida pérdida de humedad en los primeros días de almacenamiento produciría un aumento en  $E_A$ . Varios autores han indicado que, durante el envejecimiento del pan, el agua migra desde el gluten, el cual se deshidrata, hacia las zonas más ricas en almidón, propiciando su retrogradación (Bosmans, Lagrain, Fierens, y Delcour, 2013; Bosmans, Lagrain, Ooms, et al., 2013; Davidou, Le Meste, Debever, y Bekaert, 1996; Gray y Bemiller, 2003). Sin embargo, en el presente trabajo la muestra control exhibió una retrogradación limitada. Se sugiere que, en el caso de esta formulación, el elevado contenido de gluten permite la rápida pérdida de agua, lo que a su vez provoca que la movilidad molecular decaiga rápidamente, limitando la retrogradación y, consecuentemente, impidiendo mayores incrementos de  $E_A$  (Figura 5.9a).



Figura 5.9. Modelo representativo de la migración del agua durante el envejecimiento de miga a) sin almidón resistente y b) con almidón resistente tipo II. Flechas enteras indican migración rápida de agua. Flechas punteadas indican migración lenta de agua.

En HM10 y HM20 se observó un efecto diferente. Siendo la pérdida de agua más lenta debido a la presencia de HM, al permanecer agua más tiempo en el sistema, se favorecería una mayor movilidad molecular a lo largo del almacenamiento. Sería por esta causa que en estas formulaciones la retrogradación se vio favorecida y alcanzó los niveles. Se cree que, en estas muestras, el  $E_A$  podría encontrarse afectado por dos factores contrapuestos. Por un lado, aumentaría debido a la retrogradación y, por otro lado, este aumento se vería amortiguado por la menor velocidad de deshidratación. Esta menor velocidad de deshidratación se podría relacionar con dos factores: el menor contenido de gluten capaz de ceder moléculas de agua y el establecimiento de interacciones entre el agua migrante y la superficie hidratable de los gránulos de HM (Blanco Canalis, León, y Ribotta, 2019), lo que demora su migración a través de la matriz (Figura 5.9b). Entonces, sería debido a estos efectos compensatorios que las formulaciones control, HM10 y HM20 exhibieron un progreso de la dureza similar durante el envejecimiento.

Finalmente, durante el almacenamiento, la miga de HM30 pierde agua a mayor velocidad que HM10 y HM20 en la etapa inicial (Tabla 5.3) y retiene menos agua en la matriz (Tabla 5.2), lo que explicaría que se alcancen niveles de retrogradación menores a HM10 y HM20, pero mayores que control. En esta muestra, que se encuentra fuertemente afectada por su bajo contenido de gluten y elevada carga de HM, los efectos de la pérdida de agua y la retrogradación se sumarían a los elevados  $E_A$  y  $\rho_M$  de partida y, en ausencia de efectos compensatorios, serían los responsables de producir importantes aumentos en el valor de  $E_M$ , dando lugar a la acentuada progresión de la dureza en el tiempo.

#### 5.4. Conclusiones parciales

El estudio de la miga de pan durante el almacenamiento permitió analizar los principales fenómenos que tienen lugar durante el envejecimiento de los panificados, es decir, la deshidratación, la retrogradación de la amilopectina y el aumento de la dureza.
Durante el análisis se propuso un modelo matemático que permitió explicar adecuadamente la cinética de la pérdida de humedad en la miga. Asimismo, fue posible aplicar el modelo de Avrami para el estudio de los fenómenos asociados a la retrogradación del almidón y al aumento de la dureza en la miga.

En conjunto, el empleo de estos modelos matemáticos permitió establecer relaciones entre los distintos fenómenos, derivando así en un modelo observacional que explicaría no sólo cómo se interrelacionan los distintos fenómenos, sino cómo los mismos son afectados por la utilización de diferentes concentraciones de almidón resistente.

Los resultados indicaron que la velocidad de pérdida de humedad en la miga de las formulaciones estudiadas depende fundamentalmente de su composición. La incorporación de almidón resistente tendería a obstaculizar la migración de las moléculas de agua en la estructura de la miga. A su vez, la permanencia más prolongada de las moléculas de agua en el sistema implicaría una mayor movilidad molecular, lo que favorecería la capacidad de retrogradación del almidón gelatinizado.

En los panes con niveles intermedios de almidón resistente (HM10 y HM20) la adecuada calidad tecnológica inicial, en relación al contenido de gluten, el volumen específico y la porosidad, junto con la menor velocidad de deshidratación, lograrían contrarrestar los efectos negativos que la elevada retrogradación produce sobre la textura del pan. En cambio, en formulaciones con mayor contenido de almidón resistente tipo II (HM30), donde se observó la menor calidad inicial, velocidad de migración de agua intermedia y retrogradación relativamente elevada, el endurecimiento de la miga pudo aumentar hasta niveles muy superiores, dando cuenta del rol dominante que la matriz de partida y la cinética de pérdida de humedad tienen sobre la calidad tecnológica de la miga de pan durante el almacenamiento.

En el Capítulo 4 se expusieron y discutieron los resultados obtenidos en la panificación de productos tipo pan francés formulados mediante el reemplazo de harina de trigo por almidón resistente en diferentes niveles. En base a lo observado, el desempeño de las formulaciones con 10 y 20% de reemplazo fue comparable al presentado por el control tanto en el volumen específico como en las características texturales de la miga y, más allá de los cambios encontrados en la porosidad de la miga, los productos obtenidos fueron de buena calidad y demostraron un excelente nivel de aceptabilidad sensorial. A diferencia de estas muestras, la formulación con 30% de reemplazo se vio extensamente afectada en todos los parámetros de calidad evaluados, especialmente en el volumen específico, la textura y el alveolado. Dado que a su vez esta formulación fue la que presentó el mayor contenido de fibra dietaria total y la menor digestibilidad invitro de almidón se consideró oportuno desarrollar formulaciones con este nivel de reemplazo que presentaran mejores características mediante el empleo de diferentes hidrocoloides como aditivos de panificación.

# 6.1. Formulación y caracterización de las premezclas

## 6.1.1. <u>Formulaciones</u>

Se formularon entonces premezclas reemplazando el 30% de la harina de trigo (HT) por almidón resistente (HM) y se emplearon como aditivos hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y carboximetilcelulosa (CMC), en forma independiente, en dos niveles de adición: 1% o 1,5% (p/p, base mezcla HT/HM). La nomenclatura utilizada para identificar las formulaciones se indica en la Figura 6.1.



Figura 6.1. Nomenclatura utilizada para identificar las formulaciones con aditivos

#### 6.1.2. Ensayos farinográficos

Con el objetivo de estandarizar la cantidad de agua y el tiempo de amasado óptimo para cada formulación, además de evaluar el efecto de los aditivos sobre la calidad panadera de las premezclas, se realizaron ensayos farinográficos de las distintas formulaciones HT/HM/hidrocoloide preparadas con 2% de NaCl (base mezcla HT/HM). Los farinogramas obtenidos se muestran en la Figura 6.2.



Figura 6.2. Farinogramas de las premezclas a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C

En el caso de las premezclas con aditivo (Figura 6.2b-e) se produjo un aumento en la extensión de los farinogramas en el tiempo, dando cuenta de mayores tiempos de desarrollo y mayor estabilidad respecto a la formulación sin hidrocoloides añadidos

(HM30) (Figura 6.2a). Los parámetros extraídos del análisis de los farinogramas se presentan en la Tabla 6.1.

Muestra	A (ml/100 g)	TD (min)	E (min)	F (BU)
HM30	63,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	85 ± 11 <sup>ab</sup>
HM30-1H	$68,6 \pm 0,2^{d}$	$10,3 \pm 0,4^{c}$	$13,9 \pm 0,4^{b}$	90 ± 6 <sup>b</sup>
HM30-1,5H	$70,9 \pm 0,2^{e}$	12,8 ± 0,5 <sup>d</sup>	15,6 ± 0,6°	$82 \pm 1^{ab}$
HM30-1C	$65,7 \pm 0,2^{b}$	$8,8 \pm 0,7^{b}$	15,3 ± 0,6 <sup>bc</sup>	$72 \pm 5^{a}$
HM30-1,5C	67,4 ± 0,2°	12,7 ± 0,9 <sup>d</sup>	15,8 ± 0,2°	89 ± 9 <sup>b</sup>

Tabla 6.1. Parámetros farinográficos de las premezclas sin y con hidrocoloides

Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 3).

La absorción farinográfica (A) aumentó para todas las premezclas con hidrocoloides, siendo mayor el efecto cuando se utilizó HPMC, y a medida que el nivel de hidrocoloide aumentó de 1 a 1,5%. El análisis estadístico reveló la existencia de interacciones entre los factores. Al emplear HPMC, se produjo un mayor aumento de A al incrementar la concentración de 1% a 1,5% que el registrado cuando se aumentó la concentración de CMC en la misma cantidad. Un efecto similar fue observado previamente por Correa et al. (2010) en premezclas de harina de trigo, sal (2%) y HPMC en estos niveles. Este efecto podría atribuirse, por un lado, a la capacidad intrínseca de este hidrocoloide de absorber agua y, por otro, a la formación de una matriz más hidratable debido a las interacciones establecidas entre las proteínas del gluten y la HPMC, siendo estas principalmente de tipo hidrofóbico dada la naturaleza química de esta celulosa.

En el caso del tiempo de desarrollo (TD), el empleo de los hidrocoloides produjo mayores valores respecto a la formulación HM30, los cuales a su vez fueron más extensos cuando la concentración de aditivo fue mayor, siendo este efecto independiente del hidrocoloide utilizado. El tiempo de desarrollo es el tiempo requerido para desnaturalizar e hidratar las proteínas del gluten dando lugar a la formación de una red, por lo que un aumento en este parámetro podría indicar que las celulosas modificadas afectarían la disponibilidad de agua, retrasando su formación. Por lo tanto, el aumento observado en este parámetro en presencia de hidrocoloides sugiere que se forma una matriz de características diferentes a la formada en ausencia de ellos.

Por otro lado, el empleo de hidrocoloides produjo un aumento en la estabilidad de la masa frente al amasado en todos los casos. Nuevamente, el efecto fue dependiente de la concentración de aditivo e independiente del tipo de celulosa. Este resultado indica que el agregado de las celulosas modificadas permite la formación de una red más resistente al amasado excesivo. Dado que la calidad de la red de gluten no depende sólo de la cantidad de proteína presente sino también de las interacciones establecidas, este fortalecimiento podría atribuirse a la formación de una red de características distintivas respecto a la formada en la muestra HM30. En estudios previos se ha observado que proteínas del gluten en presencia de sal e hidrocoloides presentan un desplegamiento mayor que en ausencia de éstos, lo cual daría lugar a una mayor interacción entre cadenas de polipéptidos. Esto posibilitaría un entrecruzamiento más eficiente, lo que daría lugar a una mayor estabilidad (Correa, Ferrer, Añón, y Ferrero, 2014).

Por su parte, el ablandamiento (F) no sufrió modificaciones importantes con el uso de hidrocoloides, aunque se observó una menor tendencia al decaimiento de la masa al emplear CMC al 1%.

#### 6.1.3. Ensayos viscoamilográficos

Las premezclas con hidrocoloides fueron evaluadas en un RVA para establecer posibles cambios en los perfiles viscoamilográficos debido a la presencia y/o concentración de los aditivos.

Como puede observarse a partir de la Figura 6.3, los perfiles de las premezclas con hidrocoloides fueron similares al de la formulación sin aditivos, por lo que su inclusión no produjo modificaciones importantes respecto a la gelatinización del almidón.

Los parámetros extraídos de estos perfiles se muestran en la Tabla 6.2. En la mayoría de los parámetros evaluados no se observaron diferencias significativas, siendo excepciones los parámetros  $T_e$  y  $t_e$  (temperaturas y tiempos de empaste,

respectivamente) y la inestabilidad ( $\eta_p - \eta_{min}$ ). El agregado de HPMC al 1,5% produjo una disminución significativa de la T<sub>e</sub>, mientras que el uso de CMC en sus dos concentraciones aumentó los valores de este parámetro. Los resultados indicaron que el efecto sobre T<sub>e</sub> fue dependiente del tipo de hidrocoloide e independiente de las concentraciones evaluadas. En el caso de t<sub>e</sub> se observó el mismo comportamiento.



Figura 6.3. Perfiles viscoamilográficos representativos de las premezclas de la formulación HM30 sin y con hidrocoloides con el perfil de temperatura

Si bien las  $\eta_p y \eta_{min}$  mostraron poca variación entre las formulaciones, otros autores han informado que el empleo de hidrocoloides afectó los valores de estos parámetros. Christianson (1982) observó que, por un lado, los hidrocoloides podrían interactuar con la amilosa y las moléculas de amilopectina de bajo peso molecular solubilizadas y, por otro, contribuirían a aumentar el esfuerzo de corte sufridos por los gránulos de almidón debido a su efecto espesante, modificando así el comportamiento de los mismos en las condiciones de ensayo. Por su parte, Correa y Ferrero (2015), propusieron que los hidrocoloides podrían afectar los perfiles viscoamilográficos por medio de impedimentos en la hidratación de los gránulos de almidón o de la lixiviación de amilosa. En el presente trabajo, el efecto de los hidrocoloides no se detectó directamente sobre las viscosidades de pico o mínima, aunque se observó una pequeña disminución en uno de los parámetros que las incluye, la inestabilidad ( $\eta_p - \eta_{mín}$ ), cuando se empleó CMC a un nivel de 1,5%. Tal disminución sugeriría un cierto efecto protector de este hidrocoloide sobre la pérdida de integridad del almidón ante los esfuerzos de corte.

Parámetro	HM30	HM30-1H	HM30-1,5H	HM30-1C	HM30-1,5C
T <sub>e</sub> (°C)	91,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	90,9 ± 0,5 <sup>ab</sup>	$90,5 \pm 0,0^{a}$	92,1 ± 0,0 <sup>c</sup>	92,1 ± 0,1 <sup>c</sup>
t <sub>e</sub> (min)	$4,4 \pm 0,0^{\rm b}$	$4,4 \pm 0,0^{ab}$	<b>4,3 ± 0,0</b> <sup>a</sup>	$4,5 \pm 0,0^{\circ}$	$4,5 \pm 0,0^{\circ}$
η <sub>p</sub> (cP)	829 ± 5	833 ± 11	811 ± 8	806 ± 4	798 ± 22
η <sub>mín</sub> (cP)	593 ± 6	598 ± 7	583 ± 5	573 ± 4	580 ± 16
η <sub>p</sub> – η <sub>mín</sub> (cP)	236 ± 1 <sup>b</sup>	$235 \pm 4^{b}$	$229 \pm 4^{b}$	$234 \pm 1^{b}$	$218 \pm 6^{a}$
η <sub>f</sub> (cP)	1255 ± 2	$1254 \pm 13$	1230 ± 8	$1218 \pm 18$	$1224 \pm 33$
η <sub>f</sub> – η <sub>mín</sub> (cP)	662 ± 8	656 ± 6	647 ± 3	645 ± 14	645 ± 16
η <sub>f</sub> – η <sub>p</sub> (cP)	426 ± 7	422 ± 2	419 ± 1	412 ± 13	427 ± 11

Tabla 6.2. Parámetros viscoamilográficos de las premezclas de HM30 formuladas sin y con hidrocoloides

Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 3).

Como se detalla en la Sección 2.5.1, se requieren soluciones de una concentración de 1% de HPMC o 2% de CMC para producir viscosidades del orden de 4477 y 3640 cps, respectivamente. Dado que los ensayos en un RVA son llevados a cabo en exceso de agua (suspensión de harina o premezcla al 14% p/v), la suspensión de los hidrocoloides daría lugar a soluciones suficientemente diluidas como para no producir modificaciones de importancia en la viscosidad de las suspensiones estudiadas, como se discutió previamente. En el caso de las formulaciones evaluadas, y dadas las cantidades de HPMC y CMC empleadas, la concentración de hidrocoloides en las suspensiones estuvo comprendida entre 0,14 y 0,21% p/v para aquellas premezclas aditivadas al 1 y al 1,5%, respectivamente. Estas concentraciones no serían suficientemente elevadas como para producir cambios notables en los perfiles viscoamilográficos de las premezclas.

# 6.2. Análisis de las masas panarias elaboradas con hidrocoloides

## 6.2.1. Ensayos reológicos

# 6.2.1.1. Reología oscilatoria de pequeña deformación

El rango de viscoelasticidad lineal (RVL) de las masas elaboradas con diferentes concentraciones de hidrocoloides fue estudiado para evaluar los cambios producidos respecto a la masa sin aditivos. El comportamiento de los módulos elástico (*G'*) y viscoso (*G''*) durante los barridos de esfuerzo ( $\sigma$ ) para las formulaciones HM30 sin y con aditivos se muestra en la Figura 6.4. En ella fue posible observar un notable efecto de los hidrocoloides en la disminución de *G'* (líneas sólidas) respecto a HM30 sin hidrocoloides, mientras que para *G''* (líneas segmentadas) este efecto fue menos pronunciado. La HPMC mostró una tendencia a producir una mayor disminución en *G'* que la CMC cuando se adicionaron al mismo nivel (1% o 1,5%). Al evaluar el efecto de la concentración de hidrocoloide, se observó que el empleo de HPMC o CMC al 1,5% tendió a producir una disminución de *G'* más marcada que cuando se utilizó cualquiera de ellos al 1%.



Figura 6.4. Barridos de esfuerzo para determinación del RVL de las masas con hidrocoloides

Por otra parte, el empleo de estas celulosas modificadas no produjo variaciones en la magnitud límite de esfuerzos de corte que es capaz de tolerar la masa, como puede observarse a partir de los  $\sigma_{crítico}$  obtenidos (Tabla 6.3). No hubo efectos evidentes por el tipo de hidrocoloide empleado ni por su concentración (p < 0,05).

con mui ocororacă	
Muestra	$\sigma_{crítico}$ (Pa)
HM30	11 ± 1
НМ30-1Н	10 ± 2
HM30-1,5H	12 ± 1
HM30-1C	12 ± 2
HM30-1,5C	12 ± 1

Tabla 6.3. Esfuerzos de corte críticos del RVL de las masas sin y con hidrocoloides

Promedio ± desvío estándar (n = 4).

Los espectros mecánicos que se obtuvieron realizando barridos de frecuencia ( $\omega$ ) a esfuerzo constante dentro del RVL se presentan en la Figura 6.5. A partir de ellos se pudo observar una tendencia similar a la descripta para los barridos de esfuerzo en cuanto a los valores de *G*' y *G*". El uso de HPMC produjo un desplazamiento hacia menores valores de *G*' que cuando se empleó CMC a la misma concentración, y el efecto fue más pronunciado al aumentar la concentración de uno u otro hidrocoloide. Un efecto similar al comparar estos hidrocoloides en los mismos niveles fue observado en masas de harina de trigo por Correa et al. (2010).

Sin embargo, en este trabajo se observó que las celulosas modificadas produjeron un mayor efecto en la zona de bajas frecuencias de las curvas, pero a medida que la frecuencia aumentó, las curvas tendieron a solaparse. La diferencia de comportamiento a distintos rangos de frecuencias fue particularmente evidente para las curvas de *G*" (líneas segmentadas), ya que a valores de  $\omega < 0,1$  Hz las curvas mostraron un comportamiento más diferenciado. En el caso de *G*' el solapamiento fue más evidente a valores de  $\omega > 1$  Hz.



Figura 6.5. Espectros mecánicos de las masas sin y con hidrocoloides

No se observaron diferencias remarcables en la forma de las curvas de *G*' entre la masa HM30 sin aditivos y las masas HM30 con aditivos. Sin embargo, *G*" mostró un comportamiento diferente en la masa sin aditivos respecto a las que contenían hidrocoloides. A diferencia de HM30, que comenzó con una ligera disminución de *G*" a medida que aumentó  $\omega$  (en la zona de  $\omega$  < 0,1 Hz), las curvas de las masas con hidrocoloides comenzaron con un rápido aumento de *G*", el cual se ralentizó atravesando un punto de inflexión en la zona de  $\omega \sim 0,03$  Hz, para luego volver a aumentar a medida que se aplicaron mayores frecuencias ( $\omega$  > 0,1 Hz).

Esta diferencia en el comportamiento a bajas frecuencias podría relacionarse al efecto de los hidrocoloides sobre la componente viscosa de la muestra. Como se mencionó en el Capítulo 3, Sección 3.3.1 del presente trabajo, HM30 presentó una marcada componente viscosa a bajas frecuencias debido al comportamiento como relleno que produjo la presencia de una fracción proporcionalmente mayor de partículas de almidón. Al analizar el comportamiento de la tan  $\delta$  para las diferentes formulaciones (Figura 6.6) fue posible observar desplazamientos hacia mayores valores de este parámetro cuando se emplearon los aditivos. Este comportamiento indica que la componente viscosa de las masas disminuyó en menor proporción que la

componente elástica. Además, los valores de tan  $\delta$  tendieron a aumentar cuando la concentración de los hidrocoloides fue mayor. Es importante resaltar que las muestras con mayor nivel de hidrocoloide presentan un mínimo a valores de tan  $\delta$  similares a las masas elaboradas sin almidón resistente (muestra control en la Sección 3.3.1, Capítulo 3). Esto indicaría que la utilización de los hidrocoloides permitiría alcanzar relaciones de *G*' y *G*" tan balanceadas como las de masas de pan control evaluadas en el Capítulo 3.



Figura 6.6. Ángulos de fase de las masas sin y con hidrocoloides en función de  $\omega$ 

Con el fin de comparar cuantitativamente el comportamiento viscoelástico de las masas, los espectros fueron ajustados con la ley de la potencia (Ecuación 2.16 y Ecuación 2.17). De forma similar a como fue expuesto en la Sección 3.3.1 del Capítulo 3, en el caso de las curvas de *G*' el ajuste fue exitoso en todo el rango de frecuencias ( $r^2 \ge 0,9291$ ), mientras que las curvas correspondientes a *G*" presentaron desvíos importantes a la linealidad en la zona de  $\omega < 1$  Hz. Por esta razón, los ajustes para las curvas de *G*" se realizaron en el rango de  $\omega \ge 1$  Hz ( $r^2 \ge 0,8531$ ). Los resultados de los ajustes se resumen en la Tabla 6.4.

	$G^{*}VS. \omega$					
	$\log a^*$	n (Pa Hz <sup>-1</sup> )	Prueba F			
HM30	4,383 ± 0,005	0,158 ± 0,004	а			
HM30-1H	4,300 ± 0,006	0,194 ± 0,004	b			
HM30-1,5H	4,264 ± 0,008	0,206 ± 0,005	С			
HM30-1C	4,381 ± 0,007	0,188 ± 0,005	d			
HM30-1,5C	4,292 ± 0,003	0,199 ± 0,002	b			
	<i>G</i> " vs. ω†					
	<u> </u>	51 60				
	log b*	<i>m</i> (Pa Hz <sup>-1</sup> )	Prueba F			
HM30	$log b^*$ 3,69 ± 0,03	<i>m</i> (Pa Hz <sup>-1</sup> ) 0,30 ± 0,02	Prueba F a			
HM30 HM30-1H	$\frac{\log b^{*}}{3,69 \pm 0,03}$ $3,72 \pm 0,02$	$\frac{m (Pa Hz^{-1})}{0,30 \pm 0,02}$ $0,27 \pm 0,01$	Prueba F a ab			
HM30 HM30-1H HM30-1,5H	$\frac{\log b^*}{3,69 \pm 0,03}$ 3,72 ± 0,02 3,71 ± 0,02	$\frac{m (Pa Hz^{-1})}{0,30 \pm 0,02}$ $0,27 \pm 0,01$ $0,27 \pm 0,01$	Prueba F a ab b			
HM30 HM30-1H HM30-1,5H HM30-1C	$\frac{\log b^*}{3,69 \pm 0,03}$ $3,72 \pm 0,02$ $3,71 \pm 0,02$ $3,73 \pm 0,02$	$\frac{m (Pa Hz^{-1})}{0,30 \pm 0,02}$ $0,27 \pm 0,01$ $0,27 \pm 0,01$ $0,33 \pm 0,01$	Prueba F a ab b c			
HM30 HM30-1H HM30-1,5H HM30-1C HM30-1,5C	$\frac{\log b^*}{3,69 \pm 0,03}$ $3,72 \pm 0,02$ $3,71 \pm 0,02$ $3,73 \pm 0,02$ $3,70 \pm 0,01$	$\frac{m (Pa Hz^{-1})}{0,30 \pm 0,02}$ $0,27 \pm 0,01$ $0,27 \pm 0,01$ $0,33 \pm 0,01$ $0,32 \pm 0,01$	Prueba F a ab b c d			

 Tabla 6.4. Parámetros del ajuste de los espectros mecánicos a la ley de la potencia

\* Valores de *a* y *b* se encuentran en Pa.

+*G*<sup>*''*</sup> para valores de *ω* ≥ 1 Hz.

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

Según puede deducirse del log a, las curvas de G' de las masas con hidrocoloides tendieron a desplazarse a valores menores. Asimismo, todas las curvas presentaron mayor pendiente que HM30 (mayor valor de n), lo cual indicaría una mayor dependencia del módulo elástico con la frecuencia de oscilación. Es importante resaltar que estos mayores valores de n se encontrarían más cercanos a los obtenidos en las masas sin o con menor contenido de HM evaluadas anteriormente. Teniendo en cuenta que tales formulaciones presentaron buena calidad tecnológica, se podría considerar que el empleo de los hidrocoloides condujo a una mejora en las características reológicas de las masas con 30% de HM (Sección 3.3.1).

En el caso de *G*", las curvas ajustadas en el rango de  $\omega \ge 1$  Hz fueron más similares entre ellas. En general, no se detectaron desplazamientos hacia menores o mayores valores de *G*", ni se evidenciaron modificaciones sustanciales en las pendientes obtenidas. Esto indica que el efecto del agregado de las celulosas modificadas se evidencia fundamentalmente en la componente elástica.

Los valores del módulo elástico se enfrentaron con los del módulo viscoso para obtener una representación de *G'* vs. *G''*. El gráfico resultante se presenta en la Figura

6.7. Las curvas de todas las masas elaboradas con celulosas modificadas exhibieron diferentes comportamientos en la zona no lineal respecto a HM30. Sin embargo, en esta zona todas las muestras con aditivos se encontraron mayormente solapadas. Esta diferencia de comportamiento estaría atribuida a la modificación del comportamiento viscoso producida al incorporar los hidrocoloides.



Figura 6.7. Representación de los valores de G' vs. G'' de las masas sin y con hidrocoloides

Para detectar posibles diferencias de comportamiento en la zona donde se observa mayor solapamiento (valores de los módulos correspondientes a  $\omega \ge 1$  Hz) se ajustaron los valores de la curva a la ley de la potencia expresada en forma lineal. Los resultados se presentan en la Tabla 6.5.

Los resultados estadísticos indicaron que la región lineal de todas las curvas presentó comportamientos diferentes entre las diferentes formulaciones. Al comparar HM30 con las masas elaboradas con hidrocoloides se observó que todas ellas estuvieron desplazadas hacia valores más pequeños de *G'*, según se deduce de sus menores ordenadas al origen, mientras que sus pendientes fueron mayores. El agregado de celulosas modificadas a las masas panarias produjo una tasa de cambio menor en el módulo elástico que en el viscoso cuando aumenta la frecuencia de

oscilación. Esto está en concordancia con las tendencias observadas en los parámetros *n* y *m* obtenidos de las Ecuación 2.16 y Ecuación 2.17.

	<i>G</i> ′ vs. <i>G</i> ′′*				
	Ord. orig.	Pendiente	Prueba F		
HM30	2,2 ± 0,1	0,59 ± 0,02	а		
HM30-1H	1,6 ± 0,1	0,73 ± 0,02	b		
HM30-1,5H	1,3 ± 0,1	0,80 ± 0,03	С		
HM30-1C	1,9 ± 0,1	0,65 ± 0,02	d		
HM30-1,5C	1,7 ± 0,1	0,69 ± 0,01	е		

Tabla 6.5. Parámetros del ajuste de las curvas de *G'* vs. *G''* a la ley de la potencia

\* *G*' y *G*" para valores de  $\omega \ge 1$  Hz.

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 6).

#### 6.2.1.2. Ensayo de relajación

Las curvas de relajación de las masas se ajustaron adecuadamente al modelo de decaimiento exponencial con dos componentes (Ecuación 3.1) de forma similar a como se realizó para las masas sin celulosas modificadas (Sección 3.3.2). Los resultados se exponen en la Tabla 6.6.

Los parámetros de todas las masas con hidrocoloide fueron significativamente diferentes a los obtenidos para la masa HM30 sin aditivos. En general, todas las masas con hidrocoloides presentaron menores valores de esfuerzo de equilibrio ( $\varepsilon_e$ ), siendo más marcado el efecto cuando se utilizó HPMC.

Tabla 6.6.	Parámetros	del	ajuste	de	las	curvas	de	relajación	de	las	masas	sin	у	con
hidrocoloi	des al modelo	exp	onencia	l										

Parámetro	HM30	HM30-1H	HM30-1,5H	HM30-1C	HM30-1,5C
$\varepsilon_e$ (Pa)	5,955 ± 0,010	1,260 ± 0,002	1,275 ± 0,003	2,104 ± 0,003	2,237 ± 0,003
ε1 (Pa)	87,0 ± 1,4	16,7 ± 0,2	56,0 ± 1,1	42,1 ± 0,7	46,2 ± 1,0
<i>t</i> <sub>1</sub> (s)	5,33 ± 0,05	7,03 ± 0,06	5,60 ± 0,05	6,77 ± 0,05	6,33 ± 0,06
ε2 (Pa)	8,42 ± 0,02	1,91 ± 0,01	2,20 ± 0,01	2,86 ± 0,01	2,78 ± 0,01
$t_{2}(s)$	293 ± 2	251 ± 2	246 ± 2	291 ± 2	278 ± 2
r² ajustado	0,84196	0,77393	0,76138	0,83749	0,79111
Prueba F	а	b	С	d	е

Valor  $\pm$  error estándar. Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas en los conjuntos de datos ajustados (p < 0.05; n = 6).

Al igual que cuando se analizaron los tiempos de relajación de las masas sin aditivos, se detectaron dos componentes que relajan a tiempos bien diferenciados. Como fue discutido en el Capítulo 3, en general se asocian los tiempos de relajación más cortos a la fracción compuesta por moléculas de menor peso molecular, siendo los macropolímeros de gluteninas la fracción de relajación más lenta. En el caso de los tiempos más cortos ( $t_1$ ), el uso de hidrocoloides produjo un aumento del tiempo de relajación de esta fracción. En el caso de la fracción que relaja a mayores tiempos ( $t_2$ ), el empleo de celulosas modificadas produjo una diminución marcada en los tiempos de relajación, particularmente importante cuando se utilizó HPMC. Resultados similares para  $\varepsilon_e$  y  $t_2$  fueron reportados también por Correa, Ferrero, y Pérez (2012), aunque estos autores observaron también una disminución de  $t_1$  al emplear el mismo tipo de celulosas modificadas a un nivel de 1,5%.

#### 6.2.1.3. TPA

Los perfiles de textura de las masas con hidrocoloides fueron evaluados para establecer si el empleo de los aditivos produjo cambios en el comportamiento reológico de la masa cuando esta es sometida a grandes deformaciones. Los resultados se exponen en la Tabla 6.7.

El empleo de los aditivos produjo un aumento significativo de la dureza en todos los casos. A su vez, este aumento fue más pronunciado cuando se añadió CMC a la formulación. La consistencia de las masas con CMC también fue mayor a la de la masa HM30 sin aditivos, y nuevamente no se evidenció un efecto de la concentración de esta celulosa modificada.

La cohesividad de las masas con hidrocoloides fue similar a la de HM30 en todos los casos. Más allá de las diferencias estadísticas que pudieron hallarse, los ligeros cambios observados no implicarían modificaciones tecnológicas de importancia.

La adhesividad no mostró una tendencia clara respecto al empleo de los hidrocoloides ni con relación a HM30.

## Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

	HM30	HM30-1H	HM30-1,5H	HM30-1C	HM30-1,5C
Dureza (N)	$2 \pm 0^{a}$	5 ± 1 <sup>b</sup>	6 ± 2°	$8 \pm 1^{d}$	$8 \pm 1^{d}$
Consistencia (N.s)	$10 \pm 1^{b}$	8 ± 2ª	11 ± 3°	$14 \pm 1^{d}$	$14 \pm 2^{d}$
Cohesividad	$0,74 \pm 0,02^{b}$	$0,69 \pm 0,04^{a}$	$0,74 \pm 0,04^{\mathrm{b}}$	<b>0,68 ± 0,01</b> <sup>a</sup>	<b>0,68 ± 0,01</b> <sup>a</sup>
Adhesividad (N.s)	4,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,2ª	5,1 ± 1,0°	$6,0 \pm 0,6^{d}$	4,9 ± 0,3℃
Elasticidad	0,94 ± 0,01 <sup>d</sup>	$0,90 \pm 0,01^{ab}$	$0,90 \pm 0,02^{bc}$	<b>0,89 ± 0,01</b> <sup>a</sup>	0,91 ± 0,01°
Resiliencia	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	$0,06 \pm 0,01^{ab}$	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>c</sup>
Gomosidad (N)	1,5 ± 0,3ª	$3,2 \pm 0,5^{b}$	4,5 ± 1,3°	$5,2 \pm 0,6^{d}$	$5,1 \pm 0,7^{d}$

Tabla 6.7. Parámetros texturales de las masas sin y con hidrocoloides

Promedio ± desvío estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05, n = 32).

Se registró una disminución y un aumento significativos de la elasticidad y la resiliencia, respectivamente, en todos los casos en los cuales se incorporó hidrocoloide. Sin embargo, como en el caso de la cohesividad, las mínimas alteraciones observadas para estos parámetros serían insignificantes a los fines de la calidad tecnológica de la masa.

Respecto a la gomosidad, se observó un aumento significativo en todas las masas evaluadas respecto a HM30, siendo mayor el aumento en aquellas preparadas con CMC. En general, y salvo algunas excepciones, el empleo de los hidrocoloides produjo masas más firmes, manteniendo los niveles de cohesividad, elasticidad y resiliencia similares a HM30.

#### 6.2.2. <u>Características fisicoquímicas: humedad, aw y pH</u>

Los valores de humedad, actividad acuosa y pH de las masas se presentan en Tabla 6.8. Los resultados mostraron un aumento en la humedad de las masas con hidrocoloides, el cual fue consistente con la cantidad de agua agregada en su preparación, de acuerdo a los mayores valores de absorción farinográfica (Tabla 6.1). En el caso de la actividad acuosa se evidenciaron disminuciones significativas al emplear las celulosas modificadas. Sin embargo, dada la mínima variación observada, se esperaría que no se produzcan cambios importantes en las características de la masa. En el pH de las masas con aditivos se observaron variaciones igualmente leves. La escasa variación de estos parámetros se relacionaría con la baja proporción en la cual los hidrocoloides fueron añadidos.

Muestra	Humedad (g/100 g)	aw	рН
HM30	45,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,979 ± 0,003 <sup>b</sup>	5,65 ± 0,04 <sup>c</sup>
HM30-1H	$47,3 \pm 0,2^{b}$	0,976 ± 0,002 <sup>ab</sup>	5,62 ± 0,05°
HM30-1,5H	$48,0 \pm 0,2^{d}$	<b>0,977 ± 0,001</b> <sup>a</sup>	5,62 ± 0,02 <sup>bc</sup>
HM30-1C	$47,5 \pm 0,2^{bc}$	<b>0,975 ± 0,001</b> <sup>a</sup>	5,57 ± 0,02 <sup>a</sup>
HM30-1,5C	47,7 ± 0,1°	<b>0,975 ± 0,001</b> <sup>a</sup>	5,59 ± 0,01 <sup>ab</sup>

Promedio ± desvío estándar.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

#### 6.2.3. Caracterización microestructural

#### 6.2.3.1. CSLM

Las masas preparadas con adición de HPMC y CMC fueron observadas en un microscopio confocal con el objetivo de visualizar la microestructura de la red de gluten. Para facilitar la comparación, en la Figura 6.8 se muestra nuevamente la micrografía de la masa HM30 sin aditivos a 20× (Figura 6.8a y b) que fuera presentada en la Sección 3.6.3. En ella es posible observar una red de gluten pobremente formada, la cual se dispone en forma de agregados dispersos con bajo entrecruzamiento.

Con el objetivo de realizar una comparación cuantitativa de las redes proteicas exhibidas por las distintas masas se cuantificó su nivel de complejidad a través de la dimensión fractal (*DF*) del mismo modo que para las masas sin aditivos. Para esto se utilizaron micrografías de las masas a 20×, las cuales son presentadas en la Figura 6.9.

Nuevamente, a este nivel de magnificación es posible observar con más detalle que aquellas masas elaboradas con HPMC (Figura 6.9a-b y c-d) exhibieron redes más abiertas y entrecruzadas, compuestas principalmente por hebras de pequeño espesor. Por el contrario, las masas elaboradas con CMC (Figura 6.9e-f y g-h) mostraron la presencia de una red de gluten conformada por films de gluten, lo que les brinda una apariencia más cerrada, menos entrecruzada y más orientada. Resultados similares fueron observados previamente en masas de harina de trigo con 2% de NaCl empleando estos aditivos en las mismas concentraciones (Correa et al., 2014).

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 6.8. Imágenes de CSLM de masas HM30 a 20× en los canales para FITC y rodamina B (izquierda), y rodamina B (derecha)

Más allá de las diferencias halladas entre los distintos hidrocoloides, a este nivel de magnificación no se evidenciaron diferencias notables relacionadas con la concentración de aditivo empleado.

Los resultados derivados del análisis de imágenes se presentan en la Tabla 6.9. Tal como lo muestra el aumento de la *DF*, en todas las masas preparadas con aditivos la complejidad de la red aumentó significativamente respecto a la red exhibida por la masa HM30. Sin embargo, los valores de *DF* no fueron afectados por el tipo de celulosa modificada utilizada ni por su concentración. Esto indicaría que el empleo de los hidrocoloides fue efectivo al momento de inducir entrecruzamientos en la red, como puede observarse cualitativamente a través de las micrografías.

Muestra	DF
HM30*	1,28 ± 0,12 <sup>a</sup>
HM30-1H+	1,48 ± 0,05 <sup>bc</sup>
HM30-1,5H+	$1,43 \pm 0,06^{\rm b}$
HM30-1C+	1,53 ± 0,05°
HM30-1,5C <sup>+</sup>	$1,49 \pm 0,10^{\rm bc}$

Tabla 6.9. Valores de la dimensión fractal de la red de gluten de masas sin y con hidrocoloides observadas en CSLM

\* n = 6.

† n = 7.

Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05).



Figura 6.9. Imágenes de CSLM a 20× de masas a y b) HM30-1H, c y d) HM30-1,5H, e y f) HM30-1C, y g y h) HM30-1,5C, presentadas en los canales para FITC y rodamina B (izquierda) y rodamina B (derecha)

Es importante destacar que las modificaciones producidas por la utilización de celulosas modificadas resultaron en el desarrollo de redes de gluten de complejidad similar a las masas elaboradas sin reemplazos de harina de trigo por almidón resistente (muestra control evaluada en el Capítulo 3, Sección 3.6.3). El uso de estos hidrocoloides alimentarios podría entonces ser capaz de compensar el efecto negativo que la dilución del gluten produjo sobre la calidad de los panes elaborados con niveles de almidón resistente muy elevados.

## 6.3. Ensayos sobre los productos panificados

## 6.3.1. Ensayos de fermentación

Dadas las modificaciones reológicas y microestructurales de las masas con agregado de celulosas modificadas, se consideró oportuno realizar nuevos ensayos de fermentación sobre estas formulaciones. La acción de las levaduras es particularmente sensible a los cambios de viscosidad o elasticidad de la masa, ya que la contribución de cada componente al comportamiento viscoelástico determinará una mayor o menor expansión de la masa (Ishwarya et al., 2017).

Los valores de  $\Delta V$  registrados durante los ensayos de fermentación para cada muestra se ajustaron nuevamente al modelo de Chapman de 3 parámetros con éxito (Figura 6.10). Los parámetros obtenidos de los ajustes se presentan en la Tabla 6.10. A partir de los valores de estos parámetros, los tiempos de fermentación óptimos fueron calculados como el tiempo de fermentación necesario para alcanzar el 75% del  $\Delta V_{máx}$ alcanzado (Tabla 6.10).

Se encontró que el uso de celulosas modificadas en niveles del 1% no produjo modificaciones de los valores de  $\Delta V_{máx}$ . En cambio, al emplearse a un nivel de 1,5% se observó un aumento marcado de este parámetro. Estos resultados fueron igualmente observados por Correa y Ferrero (2015) en trabajos realizados sobre masas de harina de trigo con 2% de NaCl, empleando celulosas modificadas como aditivos de panificación en las mismas concentraciones.



Figura 6.10. Ajuste de los *ΔV* durante la fermentación al modelo de Chapman de 3 parámetros para las masas a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C

Muestra	$\Delta V_{máx}$ (ml)	b	С	r² ajustado	TFO (min)
HM30*	$110 \pm 4$	0,012 ± 0,002	0,8 ± 0,1	0,9280	100
HM30-1H+	114 ± 2	0,024 ± 0,002	1,3 ± 0,1	0,9602	66
HM30-1,5H+	131 ± 3	0,022 ± 0,002	1,5 ± 0,1	0,9682	78
HM30-1C+	117 ± 2	0,022 ± 0,001	1,5 ± 0,1	0,9856	79
HM30-1,5C+	127 ± 6	0,021 ± 0,003	1,5 ± 0,2	0,9046	83

Tabla 6.10. Parámetros del ajuste de los datos de fermentación y tiempos de fermentación óptimos obtenidos

\* n = 9. † n = 6.

TFO = Tiempo de fermentación óptimo.

Valor ± error estándar.

Los valores de *b*, parámetro relacionado a la velocidad de incremento del volumen, aumentaron su valor respecto a HM30 en todos los casos, llegando a duplicar el valor de esta formulación. Un comportamiento similar fue encontrado para el parámetro *c*, el cual aumentó en todos los casos donde se emplearon los aditivos.

Los aumentos en estos últimos parámetros en presencia de los hidrocoloides indicarían que las masas preparadas con estos aditivos vieron facilitada su expansión, lo cual podría encontrarse relacionado principalmente con el mayor comportamiento viscoso presentado por las masas en presencia de celulosas, como se evidenció en los ensayos de reometría oscilatoria (mayor tan  $\delta$ ) y en los ensayos de relajación. Estos cambios provocaron que los tiempos de fermentación de todas las formulaciones con agregado de celulosas modificadas disminuyeran a pesar de alcanzarse, en algunos casos, mayores incrementos de volumen.

Los tiempos de fermentación óptimos hallados en estos experimentos (Tabla 6.10) fueron utilizados para la elaboración de los panificados para todos los ensayos de calidad y almacenamiento posteriores.

#### 6.3.2. Evaluación de la calidad de panificados frescos

Las formulaciones conteniendo celulosas modificadas fueron panificadas empleando los valores farinográficos A y TD de la Sección 6.1.2 como cantidad de agua y tiempo de amasado, respectivamente. El proceso de elaboración fue similar al realizado para las muestras evaluadas en el Capítulo 4, con la diferencia de que se omitió la etapa de

laminado debido al elevado contenido de agua requerido para elaborar las masas (M. M. Martínez et al., 2018) (ver Sección 2.3.2 y Sección 2.5.4.1). Se utilizaron los valores de TFO de la Sección 6.3.1 como tiempo de permanencia en la cámara de fermentación a 30 °C. El tiempo de horneado se mantuvo en 26 min a 210 °C.

#### 6.3.2.1. Volumen específico

Los valores de volumen específico de los panificados con HPMC y CMC se presentan en la Figura 6.11. Como puede verse a partir del gráfico, el empleo de los aditivos a niveles del 1% produjo leves aumentos en el volumen específico respecto a HM30. Al utilizar las celulosas modificadas al 1,5% los volúmenes específicos aumentaron entre un 27 y un 32% respecto a HM30. Esto implica una mejora importante en la calidad tecnológica de estos panificados.

Por otra parte, los resultados indicaron que el tipo de hidrocoloide utilizado no tuvo efecto en el volumen específico del pan, siendo la concentración el único factor que tuvo influencia sobre este parámetro.



HM30 HM30-1H HM30-1,5H HM30-1C HM30-1,5C Figura 6.11. Volumen específico de pan sin y con hidrocoloides. Promedio ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*p* < 0,05; n = 12)

# 6.3.2.2. Textura de la miga

Los parámetros texturales de la miga del pan fresco se presentan en la Figura 6.12. A través de los parámetros analizados es posible observar que se produjo una mejora sustancial en cuanto a dureza y consistencia de la miga de pan elaborada con hidrocoloides respecto a HM30 (Figura 6.12a y b, respectivamente). En todos los casos la disminución de estos parámetros fue significativamente mayor cuando los aditivos se emplearon al 1,5%, no siendo afectados por el tipo de celulosa empleada.



Figura 6.12. Parámetros texturales de la miga de pan sin y con hidrocoloides. Promedio  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05; n = 16)

La cohesividad de la miga de los panes elaborados con las celulosas no mostró diferencias respecto a la del pan HM30 (Figura 6.12c). De forma similar a como fue discutido durante el análisis de las masas, las ligeras diferencias encontradas en el caso

de las masas preparadas con CMC no serían suficientes para inducir cambios apreciables en la calidad de la miga.

En el caso de la elasticidad (Figura 6.12d), no se observaron diferencias respecto a HM30 cuando se empleó HPMC en cualquiera de sus concentraciones. Si bien se observó una leve disminución de este parámetro al emplear CMC al 1% (efecto que fue revertido cuando la concentración de esta celulosa modificada se aumentó hasta 1,5%), nuevamente la magnitud de las diferencias encontradas indicaría que la calidad de la miga no se vio afectada respecto a las demás formulaciones.

En el caso de la resiliencia se observa un comportamiento similar, encontrándose mínimos aumentos y disminuciones cuando se emplea HPMC y CMC, respectivamente, en cualquiera de las concentraciones evaluadas, sin que estas variaciones modifiquen la calidad global de la miga (Figura 6.12e).

Para la masticabilidad (Figura 6.12f) se encontró un comportamiento similar al seguido por la dureza y la consistencia. En este caso, sin embargo, se encontró que tanto el tipo de hidrocoloide como su concentración influyeron en este parámetro. Así, el empleo de CMC produjo una disminución ligeramente mayor en la masticabilidad que cuando se utilizó HPMC y, a su vez, mayores concentraciones de aditivo produjeron menores valores de este parámetro.

En general, la utilización de HPMC y CMC tendió a producir ligeros cambios en la cohesividad, la elasticidad y la resiliencia. Sin embargo, fueron efectivos al momento de disminuir varios de los parámetros texturales relacionados a la firmeza de la miga (dureza, consistencia y masticabilidad), siendo estos los determinantes de la calidad comercial de un pan, ya que son los que más frecuentemente son asociados a su frescura por parte de los consumidores.

#### 6.3.2.3. Porosidad de la miga

Los parámetros del alveolado de la miga de las formulaciones HM30 sin y con celulosas modificadas se listan en la Tabla 6.11.

El uso de hidrocoloides disminuyó notablemente el número de alveolos en la miga respecto a la formulación sin aditivos. El efecto fue más marcado cuando se utilizaron HPMC y CMC a niveles del 1,5%. Por otro lado, el área alveolar media (AAM) mostró el comportamiento inverso. En este caso el empleo de las celulosas produjo un aumento del AAM respecto a HM30, siendo el efecto también dependiente de la concentración de aditivo. Estos datos sugieren que el empleo de hidrocoloides aumenta el tamaño de los alveolos a costa de una disminución en su número. En general, estas modificaciones son asociadas al fenómeno de coalescencia entre las burbujas de gas en la masa, el cual se ve favorecido por el aumento de la fluidez de la masa registrados en los ensayos reológicos.

Tabla 6.11. Parámetros de la porosidad de la miga de panificados sin y con hidrocoloides.

Muestra	N*	aire (%)	AAM (cm <sup>2</sup> )†	(cm)	Circularidad
HM30	$156 \pm 19^{d}$	$27 \pm 2^{a}$	<b>0,016 ± 0,002</b> <sup>a</sup>	$0,53 \pm 0,03^{a}$	0,57 ± 0,03
HM30-1H	127 ± 22°	$28 \pm 3^{ab}$	$0,020 \pm 0,004^{\rm b}$	0,59 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,03
HM30-1,5H	$101 \pm 12^{a}$	$29 \pm 3^{abc}$	0,025 ± 0,004°	0,65 ± 0,05℃	0,59 ± 0,02
HM30-1C	$117 \pm 25^{bc}$	$29 \pm 2^{bc}$	$0,023 \pm 0,004^{bc}$	0,63 ± 0,05°	0,57 ± 0,03
HM30-1,5C	$109 \pm 16^{ab}$	30 ± 2°	0,025 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,58 ± 0,02

\* N = Número de alveolos.

† AAM = Área alveolar media.

Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 16).

Por otro lado, la fracción de aire aumentó en todos los casos respecto a HM30, siendo las formulaciones con CMC o con mayor concentración de aditivo las que presentaron una mejora más importante.

El perímetro de los alveolos en las migas de pan con celulosas modificadas fue significativamente mayor a los presentes en la miga de HM30. Dado que la circularidad fue similar en todas las formulaciones, se sugiere que todos los alveolos presentaron formas similares. En este sentido se esperaría que, a igual forma de los poros, aquellos de mayor área tengan ineludiblemente un mayor perímetro, lo cual es coherente con los resultados encontrados. En el caso del perímetro el análisis indicó presencia de interacciones entre los factores "tipo de hidrocoloide" y "concentración de hidrocoloide". Como puede observarse, el efecto de la HPMC parece ser dependiente de

la concentración, requiriendo el agregado de mayor cantidad para producir aumentos en este parámetro, mientras que el uso de diferentes concentraciones de CMC no modificó el valor del perímetro. Sin embargo, dado que parámetros como AAM y perímetro son descriptores de la geometría de los alveolos, y que N y AAM se relacionan a través de fenómenos como la coalescencia, las interacciones detectadas podrían ser resultado de una interdependencia entre las distintas variables.

Además de los parámetros descriptos anteriormente, se analizaron también las distribuciones de tamaño de los alveolos. Los histogramas resultantes son presentados en la Figura 6.13. En ellos se expone la frecuencia relativa y la frecuencia acumulada de los alveolos en función de su área. En la Tabla 6.13 se presentan los parámetros relacionados con las distribuciones. Como se puede ver en ella, la asimetría de las distribuciones disminuyó notablemente cuando se incorporó hidrocoloide a la formulación, indicando una mayor tendencia hacia una distribución gaussiana. Si bien la forma de los histogramas dista mucho de presentar un comportamiento normal, una disminución de la asimetría positiva en las distribuciones de las formulaciones con aditivos indicaría que se produjeron desplazamientos de la frecuencia de los alveolos hacia la región de áreas mayores.

Esta observación puede confirmarse en base a los valores de los diferentes percentiles. Los resultados mostraron que las formulaciones conteniendo celulosas modificadas presentaron desplazamientos hacia mayores valores en todos los percentiles respecto a HM30, particularmente en P90 y P99. Esto indicaría que es necesario alcanzar un mayor valor de área alveolar para poder contabilizar el mismo porcentaje determinado del total de alveolos, efecto que se relaciona con el aumento en la proporción de alveolos de mayor tamaño en detrimento de los más pequeños. Este efecto pareció verse aumentado en aquellas formulaciones conteniendo los aditivos al 1,5%.

El análisis de la porosidad de la miga indicó que el empleo de las celulosas modificadas fue efectivo al momento de mejorar tanto el tamaño de los alveolos como su distribución, y que el empleo de mayores concentraciones en general implica mejores resultados. Los hallazgos fueron consistentes con aquellos descriptos

244

previamente, tanto para la reología y la fermentación de la masa, como para los relacionados con la calidad del pan, como son el volumen específico y la textura.



Figura 6.13. Histogramas de la distribución del área alveolar para la miga de panes a) HM30, b) HM30-1H, c) HM30-1,5H, d) HM30-1C y e) HM30-1,5C, con imágenes representativas del corte transversal de las piezas

Tabla 6.13. Parámetros de la distribución de tamaños alveolares.						
Muestra	Asimetría	Moda (cm <sup>2</sup> )	P50 (cm <sup>2</sup> )	P90 (cm <sup>2</sup> )	P99 (cm <sup>2</sup> )	
HM30	7,3	0,003	0,008	0,035	0,126	
HM30-1H	3,8	0,003	0,010	0,047	0,157	
HM30-1,5H	3,3	0,003	0,012	0,063	0,202	
HM30-1C	3,3	0,003	0,011	0,056	0,150	
HM30-1,5C	3,8	0,003	0,012	0,061	0,190	
HM30 HM30-1H HM30-1,5H HM30-1C HM30-1,5C	7,3 3,8 3,3 3,3 3,3 3,8	0,003 0,003 0,003 0,003 0,003 0,003	0,008 0,010 0,012 0,011 0,012	0,035 0,047 0,063 0,056 0,061	0,126 0,157 0,202 0,150 0,190	

Tabla 6.13. Parámetros de la distribución de tamaños alveolares
---

P50, P90 y P99 se refiere al 50º, 90º y 99º percentil, respectivamente.

#### 6.3.2.4. Humedad y a<sub>w</sub> de la miga

Los valores de humedad y  $a_w$  obtenidos de la miga de cada formulación son presentados en la Tabla 6.12. Los resultados mostraron un aumento de la humedad de la miga cuando se emplearon los aditivos relacionado con la mayor cantidad de agua empleada en la elaboración del pan, según se discutió anteriormente en los ensayos farinográficos (Sección 6.1.2). En este caso, tanto el tipo de hidrocoloide como su concentración tuvieron un efecto significativo en la humedad de la miga, aunque no se detectaron interacciones significativas. Así el empleo de HPMC dio como resultado migas con mayor humedad que cuando se utilizó CMC y, además, para ambos hidrocoloides el aumento fue mayor cuando se utilizaron al 1,5%, siguiendo una tendencia similar a la observada en el parámetro farinográfico A.

Muestra	Humedad (g/100 g)	$a_w$
HM30	$46,4 \pm 0,3^{a}$	0,970 ± 0,001 <sup>a</sup>
HM30-1H	47,5 ± 0,1°	0,976 ± 0,001 <sup>b</sup>
HM30-1,5H	$48,2 \pm 0,3^{d}$	0,976 ± 0,002 <sup>b</sup>
HM30-1C	$47,1 \pm 0,3^{b}$	0,974 ± 0,002 <sup>b</sup>
HM30-1,5C	$47,8 \pm 0,2^{\circ}$	0,975 ± 0,002 <sup>b</sup>

Tabla 6.12. Valores de humedad y actividad acuosa de las migas de panes sin y con hidrocoloides

Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 6).

Respecto a la  $a_w$ , se registró un ligero aumento en todas las formulaciones con aditivos respecto a HM30. En este caso no hubo ningún tipo de efecto relacionado al tipo de celulosa modificada empleada ni a su concentración.

# 6.3.2.5. Color de la corteza y la miga

Se evaluó el efecto de los hidrocoloides sobre el color de la corteza y la miga de los panificados. Los resultados se exponen en la Tabla 6.14. Como puede verse, el empleo de las celulosas modificadas no produjo modificaciones de interés práctico en los parámetros L\*, a\* y b\* de la corteza y la miga, a pesar de la existencia de variaciones significativas. En el mismo sentido, los valores de *BI*, derivados de los parámetros instrumentales, mostraron un comportamiento similar.

_	Corteza				
	L*	a*	b*	BI	
HM30+	81 ± 3 <sup>a</sup>	1 ± 1 <sup>a</sup>	22 ± 3 <sup>c</sup>	31 ± 6 <sup>b</sup>	
HM30-1H‡	83 ± 1 <sup>b</sup>	1 ± 1 <sup>b</sup>	17 ± 2 <sup>a</sup>	23 ± 4 <sup>a</sup>	
HM30-1,5H‡	$84 \pm 1^{b}$	$1 \pm 1^{b}$	$17 \pm 2^{a}$	23 ± 3 <sup>a</sup>	
HM30-1C‡	$82 \pm 2^{a}$	2 ± 1°	$20 \pm 2^{b}$	29 ± 5 <sup>b</sup>	
HM30-1,5C‡	$81 \pm 2^{a}$	3 ± 1°	$21 \pm 2^{b}$	$32 \pm 5^{b}$	
_		Mig	a‡		
	L*	a*	b*	BI	
HM30+	$73 \pm 4^{ab}$	-1,1 ± 0,2 <sup>ab</sup>	13 ± 1 <sup>b</sup>	$17 \pm 1^{b}$	
HM30-1H‡	$72 \pm 2^{ab}$	-1,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	15 ± 3°	21 ± 5°	
HM30-1,5H‡	71 ± 2 <sup>a</sup>	-0,9 ± 0,1°	11 ± 1ª	15 ± 1 <sup>a</sup>	
HM30-1C‡	71 ± 3 <sup>a</sup>	-1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	$12 \pm 1^{b}$	$17 \pm 1^{b}$	
HM30-1,5C‡	$73 \pm 4^{b}$	$-1,1 \pm 0,1^{b}$	11 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	

Tabla 6.14. Parámetros de colorimétricos de la corteza y la miga de panes sin y con hidrocoloides

+ Corteza: n = 14; miga: n = 8

‡ n = 8

Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

Si bien los pequeños cambios de color entre las distintas muestras serían imperceptibles al momento de evaluar sensorialmente el color del pan, se sugiere que estos se debieron principalmente al color intrínseco de las celulosas empleadas. La HPMC es un polvo de apariencia blanca intenso, mientras que la CMC presenta un color ligeramente pardo. Las pequeñas cantidades de estos aditivos agregadas a la formulación podrían ser detectadas instrumentalmente y serían entonces responsables de las leves, aunque significativas, diferencias.

#### 6.3.3. <u>Ensayos de almacenamiento</u>

Con el fin de evaluar si las celulosas influyen en el proceso de envejecimiento de los panificados con elevado contenido de almidón resistente se almacenaron panes de forma similar a como se describió en el capítulo previo. El seguimiento del envejecimiento se realizó mediante análisis de la textura, humedad y  $a_w$  de la miga a los días 0 (día de elaboración), 1, 2 y 4.

## 6.3.3.1. Humedad y $a_w$ de la miga en el almacenamiento

Durante el almacenamiento de los panificados se realizó el seguimiento de la humedad y la  $a_w$  de la miga. Los resultados se presentan en la Tabla 6.15.

La humedad de la miga mostró una disminución progresiva a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento para todas las formulaciones evaluadas, comportamiento que fue similar en aquellas formulaciones sin hidrocoloides añadidos. En general, no se detectaron variaciones de humedad importantes entre las muestras para un mismo día de almacenamiento.

indi ocololides					
	Día	HM30-1H	HM30-1,5H	HM30-1C	HM30-1,5C
	0	$47,5 \pm 0,1^{dB}$	$48,2 \pm 0,3^{dD}$	$47,3 \pm 0,3^{dA}$	$47,0 \pm 0,2^{dC}$
U	1	46,2 ± 0,4°	46,1 ± 0,8°	45,4 ± 0,4°	45,7 ± 0,3°
Humedad*	2	$43,5 \pm 0,6^{b}$	43,6 ± 1,1 <sup>b</sup>	$44,0 \pm 0,6^{b}$	43,7 ± 0,9 <sup>b</sup>
	4	$41,4 \pm 0,5^{aB}$	$41,3 \pm 0,6^{aB}$	$40,6 \pm 0,4^{aA}$	$41,2 \pm 0,6^{aB}$
	0	0,976 ± 0,001°	0,976 ± 0,002°	0,974 ± 0,002°	0,975 ± 0,002 <sup>b</sup>
$a_w$ †	1	0,975 ± 0,001°	0,972 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,972 ± 0,002c	0,973 ± 0,002 <sup>b</sup>
	2	0,971 ± 0,002 <sup>bB</sup>	0,971 ± 0,001 <sup>bB</sup>	0,967 ± 0,002 <sup>bA</sup>	0,972 ± 0,003 <sup>bB</sup>
	4	<b>0,965 ± 0,003</b> ª	<b>0,964 ± 0,002</b> <sup>a</sup>	<b>0,962 ± 0,003</b> <sup>a</sup>	<b>0,962 ± 0,003</b> <sup>a</sup>

Tabla 6.15. Valores de humedad y  $a_w$  durante el almacenamiento de los panes con hidrocoloides

\* Porcentaje p/p. Promedio ± desvío estándar.

† Medido a 25 °C. Promedio ± desvío estándar.

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento para una misma formulación (p < 0,05; n = 6). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre formulaciones para el mismo día de almacenamiento (p < 0,05; n = 6).

La  $a_w$  exhibió menor variación que la humedad durante el almacenamiento en todos los casos, pero especialmente en la formulación con 1,5% de CMC, la cual sólo presentó

una disminución significativa de su valor al día 4. En general, para un mismo día de almacenamiento, no se encontraron diferencias remarcables entre formulaciones.

#### 6.3.3.1.1. Estudio cinético de la pérdida de humedad en la miga

Los valores de humedad de la miga fueron ajustados al modelo propuesto en el capítulo anterior (Ecuación 5.1, Sección 5.1.1). En general, para lograr un buen ajuste en modelos que alcanzan valores asintóticos respecto a la variable dependiente (en este caso,  $y_{\infty}$ ) se requeriría la adquisición de datos a tiempos prolongados de almacenamiento. No obstante, habiéndose logrado ajustes exitosos en muestras de pan HM30 sin hidrocoloides almacenadas durante 11 días (Capítulo 5), se empleó el valor de  $y_{\infty}$  correspondiente a esta formulación como parámetro inicial de iteración para realizar los ajustes de las muestras analizadas en el presente capítulo, las cuales contaron con menor tiempo de almacenamiento. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.16.

Muestra	A (% p/p)	y <sub>∞</sub> (% p/p)	k (días)	r²ajustado	Prueba F*
HM30	11,3 ± 0,6	35,4 ± 0,5	3,3 ± 0,5	0,9060	а
HM30-1H	12,3 ± 3,7	35,4 ± 3,8	5,5 ± 2,4	0,9461	b
HM30-1,5H	10,8 ± 2,4	37,5 ± 2,5	3,7 ± 1,4	0,9200	С
HM30-1C	12,9 ± 3,4	34,6 ± 3,5	5,5 ± 2,1	0,9656	bc
HM30-1,5C	11,0 ± 2,2	36,8 ± 2,3	4,3 ± 1,4	0,9528	d

Tabla 6.16. Parámetros del ajuste de los valores de humedad de la miga de panes sin y con hidrocoloides

\* Letras diferentes en las pruebas F indican diferencias significativas entre los conjuntos de datos ajustados (p < 0.05; n = 6).

La pérdida de humedad de la miga en las formulaciones con aditivos mostró un comportamiento diferente respecto a HM30 en todos los casos. En general, las muestras elaboradas con 1,5% de HPMC o CMC tendieron a presentar valores de *A* menores, valores de  $y_{\infty}$  mayores y valores de *k* menores a aquellas preparadas con 1% hidrocoloide, observándose que el tipo de celulosa modificada no produjo variaciones importantes de estos parámetros cuando se emplearon al mismo nivel.

Con el objetivo de comparar los comportamientos iniciales y a mediano plazo de la pérdida de humedad, se obtuvieron los parámetros derivados -A/k (pendiente a t = 0) y  $t_{1/2}$  (valor de t en el cual la pérdida total de humedad es del 50%) (Tabla 6.17). Estos permitieron establecer que las muestras con HPMC y CMC tendieron a exhibir una pérdida de humedad más lenta que HM30 durante el inicio del almacenamiento, y que requieren más tiempo que la muestra HM30 para alcanzar el 50% de la pérdida de humedad, especialmente en las formulaciones con 1% de hidrocoloide.

adia 0.17. Para	metros cineticos calculat	ios a partir del ajuste
Muestra	-A/k (% p/p/día)	t <sub>1/2</sub> (días)
HM30	-3,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3
HM30-1H	-2,3 ± 1,5	3,8 ± 1,7
HM30-1,5H	-2,9 ± 1,0	2,6 ± 1,0
HM30-1C	-2,3 ± 1,3	3,8 ± 1,5
HM30-1,5C	$-2,6 \pm 0,9$	$3,0 \pm 1,0$

Tabla 6.17. Parámetros cinéticos calculados a partir del ajuste

Valor ± error estándar.

Se sugiere que la presencia de las celulosas modificadas produciría un retardo en la migración del agua contenida en la miga, ya que funcionarían como agentes de retención de humedad. En este sentido, se esperaría que aquellas formulaciones con mayor cantidad de aditivo generaran un mayor retardo en la migración, lo que no es observado en este caso. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las muestras con 1,5% de celulosas modificadas presentaron una miga más aireada y con diferentes características alveolares, pudiendo ser estos cambios estructurales de la miga factores que también afectan la velocidad de pérdida del agua.

#### 6.3.3.2. Textura de la miga en el almacenamiento

Se analizaron los perfiles de textura de la miga de pan durante el almacenamiento para determinar si el empleo de celulosas modificadas fue capaz de atenuar los efectos negativos sobre la dureza de la miga observados en panes con 30% de HM.

De forma similar a como fue realizado cuando se estudió la pérdida de humedad de la miga durante el almacenamiento, se empleó el valor del parámetro  $D_{\infty}$  de la muestra HM30, obtenido a través de ensayos de almacenamiento prolongados, como parámetro
inicial para el ajuste al modelo de Avrami de las formulaciones con HPMC y CMC. Los resultados se muestran en la Tabla 6.18.

En general, se observó un importante efecto de disminución en los valores de  $D_{\infty}$  respecto a HM30 en todos los casos en los que los hidrocoloides fueron incorporados. No obstante, en estas formulaciones, las constantes de velocidad ( $k_D$ ) tendieron a presentar mayores valores respecto a HM30. Se encontró un incremento importante en los valores de  $k_D$  cuando los aditivos fueron utilizados a niveles del 1%, demostrando mayor velocidad en el aumento de la dureza. Por su parte, estos aumentos fueron menos marcados cuando las celulosas se emplearon en concentraciones del 1,5%. En estos casos no parece existir un efecto relacionado al tipo de celulosa empleada, siendo más importante el efecto de su concentración.

El tiempo de vida media ( $t_{1/2D}$ ) indicó que el 50% del aumento total de la dureza ocurriría a tiempos menores comparados con los de HM30 cuando las celulosas son añadidas a la formulación. Sin embargo, todos los valores de  $t_{1/2D}$  obtenidos superan los 2 días de almacenamiento, dando lugar a un rango de tiempo de consumo aceptable para un producto con las características de un pan tipo francés.

Tabla 6.18. Pa	rámetros del	ajuste al n	nodelo	de Av	ran	ni de l	os dat	os de	e dureza	de la 1	miga	ı de
panes sin y cor	n hidrocoloid	es durante	el alm	acenar	nie	nto						
			< 1 / I	1 2	~			_	•			

Muestra	$D_{\infty}(N)$	k <sub>D</sub> (dias⁻¹)	r² ajustado	Prueba F*	t <sub>1/2D</sub> (dias)
HM30	39 ± 5	0,09 ± 0,02	0,8701	а	7,47 ± 0,02
HM30-1H	17 ± 4	0,29 ± 0,12	0,6824	bc	2,99 ± 0,08
HM30-1,5H	24 ± 8	0,14 ± 0,07	0,8694	ab	5,07 ± 0,05
HM30-1C	15 ± 2	0,26 ± 0,09	0,7805	cd	2,63 ± 0,07
HM30-1,5C	16 ± 5	$0,17 \pm 0,10$	0,7614	d	$4,02 \pm 0,07$

Valor ± desvío estándar.

\*Diferentes letras en las pruebas F indican diferencias significativas entre formulaciones (p < 0,05; n = 16).

Los aumentos en las constantes de velocidad para el incremento de la dureza podrían estar asociados a una mayor movilidad molecular en la miga debido al efecto plastificante del agua, lo cual permitiría acelerar los procesos relacionados al envejecimiento. A pesar de esto, el efecto más significativo respecto a la calidad textural de los panes fue la disminución de aquellos parámetros relacionados con su firmeza. Se sugiere que este efecto se debería también al mayor contenido de humedad durante el almacenamiento, ya que migas con mayor humedad están asociadas a texturas más suaves (Curti, Carini, Tribuzio, y Vittadini, 2014).

### 6.4. Conclusiones parciales

Dos celulosas modificadas (HPMC y CMC) fueron empleadas con éxito en la elaboración de panificados con contenido elevado de almidón resistente tipo II. Las formulaciones con 30% de almidón resistente elaboradas con estos hidrocoloides presentaron una mejora en la calidad panadera, aumentando la absorción de agua, el tiempo de desarrollo y la estabilidad de las mismas, sin que se alteraran significativamente los perfiles viscoamilográficos de las premezclas.

Las masas firmes y de características más sólidas resultantes de los reemplazos con niveles tan elevados de HM mejoraron su perfil viscoelástico aumentando su fluidez y presentando un mejor balance entre los módulos elástico y viscoso.

Los cambios en los perfiles reológicos de las masas se tradujeron en una mejora significativa de los procesos fermentativos, permitiendo una mayor y más rápida expansión, dando lugar a menores tiempos de fermentación y aumentando así la eficiencia global del proceso de panificación.

En el mismo sentido, la optimización de la fermentación implicó la obtención de productos panificados de mejores características. La miga de estos panes exhibió una estructura alveolar más aireada, con poros de mayor tamaño y mejor distribución. La textura de la miga también mostró una mejora significativa en todos los casos, reduciendo principalmente su firmeza, resultado que fue consistente con la mejora de su distribución alveolar y la presencia de mayor humedad.

Más allá de la mejora obtenida en las características de los panificados frescos, las celulosas modificadas también fueron capaces de atenuar los efectos negativos del almacenamiento sobre la calidad de los panes con elevado nivel de almidón resistente. En este aspecto, las celulosas modificadas actuaron no sólo reduciendo la velocidad y la

extensión de la pérdida de humedad, sino disminuyendo también el aumento de su dureza.

En general, el empleo de HPMC y CMC produjo resultados satisfactorios tanto a nivel de las premezclas secas como de las masas, los procesos fermentativos, los panes frescos y los procesos ocurrentes durante el almacenamiento. Los efectos positivos en los panificados frescos fueron, con algunas excepciones, independientes del tipo de celulosa empleada, pero dependientes de la concentración, siendo más marcados cuando los aditivos se utilizaron en un nivel de 1,5%.

### 7.1. Antecedentes

El desarrollo de almidones resistentes a través del aprovechamiento de la retrogradación de almidón gelatinizado ha sido estudiado a lo largo de los años desde los primeros reportes de su presencia en los alimentos procesados por parte de Englyst, Wiggins y Cummings en 1982 y por Englyst y Cummings en 1985.

Los intentos por producir estos almidones han llevado al empleo de almidones de diferentes orígenes botánicos y al desarrollo de numerosos procesos. Así, se han empleado almidones provenientes de legumbres (Ambigaipalan, Hoover, Donner, y Liu, 2013; Lehmann, Rössler, Schmiedl, y Jacobasch, 2003; S. Li, Ward, y Gao, 2011; Mahadevamma, Harish Prashanth, y Tharanathan, 2003; Morales-Medina, Del Mar Muñío, Guadix, y Guadix, 2014a; Reddy, Suriya, y Haripriya, 2013; Silverio, Fredriksson, Andersson, Eliasson, y Åman, 2000; Tovar, Melito, Herrera, Rascón, y Pérez, 2002; Vasanthan y Bhatty, 1998) y cereales (Berry, 1986; Silverio et al., 2000; Tovar et al., 2002; Vasanthan y Bhatty, 1998), con particular énfasis en los provenientes de maíz de alta amilosa (Chung, Jeong, y Lim, 2003; Dundar y Gocmen, 2013; Öztürk y Köksel, 2014; Ozturk, Koksel, Kahraman, y Ng, 2009; Ozturk, Koksel, y Ng, 2011), maíz céreo (Cai, Shi, Rong, y Hsiao, 2010; Miao et al., 2009; Park, Baik, y Lim, 2009; Miaomiao Shi, Chen, Yu, y Gao, 2013) e incluso maíz normal (Huan Liu et al., 2014; Zhang y Jin, 2011a, 2011b).

Otras fuentes utilizadas para la producción de almidón resistente tipo III incluyeron raíces y tubérculos (Berry, 1986; Escarpa, González, Morales, y Saura-Calixto, 1997; Gunaratne y Hoover, 2002; Kapelko, Zięba, Golachowski, y Gryszkin, 2012; Margareta Leeman, Karlsson, Eliasson, y Björck, 2006; Onyango, Bley, Jacob, Henle, y Rohm, 2006; Reddy, Haripriya, Noor Mohamed, y Suriya, 2014; Silverio et al., 2000; Tovar et al., 2002) y banana (Aparicio-Saguilán et al., 2005; González-Soto, Mora-Escobedo, Hernández-Sánchez, Sánchez-Rivera, y Bello-Pérez, 2007), entre otras (Juansang, Puttanlek, Rungsardthong, Puncha-arnon, y Uttapap, 2012).

Otros autores, por su parte, se han dedicado a estudiar la formación de almidón resistente in-situ en los alimentos ya elaborados (Åkerberg, Liljeberg, y Björck, 1998; Amaral, Guerreiro, Gomes, y Cravo, 2016; Hallström, Sestili, Lafiandra, Björck, y Östman, 2011; Liljeberg, Åkerberg, y Björck, 1996; Mahadevamma y Tharanathan, 2001), mientras que otros se han enfocado en estudiar los fenómenos asociados a la retrogradación de los almidones y los factores que tienen influencia en el proceso (Eerlingen, Broeck, Delcour, Slade, y Levine, 1994; Eerlingen, Cillen, y Delcour, 1994; Eerlingen, Crombez, y Delcour, 1993; Eerlingen, Deceuninck, y Delcour, 1993; Escarpa et al., 1997; Fredriksson, Silverio, Andersson, Eliasson, y Åman, 1998; Kohyama, Matsuki, Yasui, y Sasaki, 2004; Mangala, Udayasankar, y Tharanathan, 1999; Ottenhof y Farhat, 2004; Tovar et al., 2002).

Sin embargo, a pesar de que el trigo es el cereal más ampliamente utilizado para la producción de panificados en todo el mundo, en las últimas tres décadas sólo unos pocos trabajos se han enfocado en el análisis del contenido de almidón resistente tipo III proveniente de almidón de trigo (Brumovsky, Brumovsky, Fretes, y Peralta, 2009; Yadav, Sharma, y Yadav, 2010).

En el trabajo reportado por Brumovsky et al. (2009) se cuantificaron el contenido de almidón resistente y las entalpías asociadas a la gelatinización del almidón tras atravesar calentamientos a diferentes temperaturas durante distintos tiempos. No obstante, en este caso las muestras fueron inmediatamente enfriadas en baño de hielo y deshidratadas luego de los tratamientos, siendo esta situación incompatible con el estudio del proceso de retrogradación.

Por el otro lado, Yadav et al. (2010) realizaron sus estudios directamente sobre harinas de trigo, lo cual no permitiría obtener conclusiones directamente aplicables a un proceso en el cual se empleara almidón de trigo aislado como materia prima debido a la influencia que otros componentes presentes en la harina podrían tener sobre la retrogradación. Además, el trabajo de estos autores estuvo enfocado particularmente en la cuantificación del contenido de almidón resistente y en la digestibilidad de la harina luego de los tratamientos aplicados, sin indagar en aspectos fisicoquímicos o microestructurales.

258

Esta situación puso de manifiesto la necesidad de generar conocimiento científico sobre los procesos asociados a la retrogradación del almidón de trigo apuntando específicamente a la obtención de almidón resistente, analizando asimismo tanto su comportamiento térmico como termo-reológico, sus características microestructurales y aspectos nutricionales.

### 7.2. Obtención de almidón retrogradado

### 7.2.1. Ensayos preliminares

En forma preliminar se prepararon suspensiones de almidón de trigo (AT) al 20% p/p con agua destilada en vasos de precipitado tipo Berzelius de 600 ml. Estas suspensiones se calentaron en baño termostático a 80 °C con agitación mecánica interna constante durante 30 min. Una vez cumplida la etapa de pregelatinización los vasos fueron calentados en autoclave a 121 °C durante 30 min y posteriormente llevados a refrigeración en cámara a 4 °C para su almacenamiento durante 24 hs. Estas etapas de calentamiento a 121 °C y almacenamiento a 4 °C se repitieron de forma sucesiva hasta completar 4 ciclos. Una vez finalizado el último ciclo el gel obtenido se extendió sobre una placa cubierta con film de aluminio en forma de capa de espesor no mayor a 3 mm con ayuda de un rodillo. La placa con la muestra extendida fue colocada en una estufa de secado a 50 °C, donde permaneció durante 48 hs hasta su completa deshidratación. Una vez seco, el almidón fue molido con ayuda de un molinillo analítico.

El calentamiento de la suspensión de AT al 20% p/p dio como resultado una pasta gelatinizada muy viscosa, difícil de manipular y homogeneizar. Por esto, y con el objetivo de introducir tratamientos que puedan aumentar el rendimiento del producto final, se realizaron modificaciones al protocolo anterior. Estas incluyeron disminuir la concentración de la suspensión del 20% al 10% p/p y realizar la etapa de gelatinización a 85 °C para comenzar luego con los ciclos de calentamiento y refrigeración mencionados anteriormente. Finalmente, se secó la suspensión obtenida en estufa a 50 °C durante 48 hs para su molienda.

El secado por calentamiento en estufa de la pasta de almidón al 10% dio como resultado la obtención de materiales de aspecto similar a una resina acrílica (Figura 7.1a). Estas características dificultaron el proceso de molienda, ya que el material resultó ser muy poco friable como para ser molido en molinillos convencionales de laboratorio. A pesar de esto, se logró obtener un polvo formado por partículas duras con una distribución de tamaños muy heterogénea (Figura 7.1b).



Figura 7.1. a) Material amiláceo obtenido luego del secado en estufa de las pastas retrogradadas, b) material molido

### 7.2.1.1. Observación preliminar en microscopio óptico con luz polarizada

En un microscopio óptico con luz polarizada los materiales cristalinos exhiben birrefringencia debido al paso de la luz a través de las estructuras ordenadas de los cristales, permitiendo interferencias constructivas. Esto se manifiesta en forma de regiones brillantes en la muestra (BeMiller y Whistler, 2009).

El polvo obtenido a partir de la pasta de almidón al 10% fue observado con un microscopio óptico con luz polarizada para determinar la presencia de estructuras cristalinas debidas a las condiciones de preparación. La observación permitió determinar la presencia de regiones birrefringentes, lo que indicaría la presencia de estructuras cristalinas de almidón retrogradado en los fragmentos del material amiláceo obtenido.

# 7.2.1.2. Seguimiento del proceso de retrogradación a través de DSC

Se realizaron experimentos en DSC para analizar la evolución de la retrogradación en las suspensiones durante el proceso de obtención. Para esto se tomaron alícuotas de la muestra en cada uno de los pasos de preparación: suspensión del almidón de trigo nativo en agua destilada, pasta gelatinizada, pasta luego de cada calentamiento en autoclave y luego de cada período de refrigeración en cámara. Se corrieron también muestras del material seco molido final.

A partir de estos ensayos se determinó que, a diferencia del almidón de trigo nativo que exhibió una endoterma típica de un proceso de fusión en el rango de temperatura entre 52 y 76 °C, en ninguna etapa posterior del tratamiento fue posible observar transiciones asignables a la amilopectina retrogradada. No obstante, las muestras siempre exhibieron la endoterma correspondiente a la disociación del complejo amilosa-lípido en el rango de temperatura entre 89 y 105 °C para el almidón de trigo nativo, observándose ligeros corrimientos a mayores temperaturas en las diferentes etapas del proceso (Figura 7.2).

La ausencia de endotermas relacionadas a la fusión de las fases cristalinas en la muestra a lo largo de todo el proceso indicaría que no se produjo retrogradación de amilopectina. La retrogradación de esta fracción amilácea es un proceso lento que requiere tiempos prolongados de almacenamiento refrigerado de la muestra (mayores a 2 o 3 días) para ser observado (BeMiller y Whistler, 2009). El tratamiento realizado sobre la muestra incluyó períodos de 24 hs de almacenamiento refrigerado entre ciclos sucesivos de calentamiento, lo cual no sería tiempo suficiente para que la retrogradación de la amilopectina se manifieste en los termogramas.

De esta forma, la ausencia de endotermas a lo largo del tratamiento y en el producto final obtenido, que exhibió birrefringencia en el microscopio óptico con luz polariza, indicaría que las estructuras cristalinas presentes en el material se deberían fundamentalmente a la rápida retrogradación de la amilosa. La amilosa, debido a que es una molécula lineal, tiene la capacidad de retrogradar a mayor velocidad, siendo las 24 hs de almacenamiento refrigerado tiempo suficiente para que el fenómeno ocurra.

Por otro lado, está bien establecido que las fracciones retrogradadas de amilosa están compuestas por cristales de elevada estabilidad térmica que funden en el rango de temperaturas entre 120 y 165 °C (Haralampu, 2000), por lo que el rango de temperaturas utilizado en los experimentos de DSC podría no ser suficientemente amplio como para producir la fusión de estos cristales.



Figura 7.2. Termogramas del seguimiento por DSC del protocolo térmico para la obtención de almidón retrogradado

### 7.2.1.3. Determinación de fibra dietaria

Se realizó la determinación de fibra dietaria total sobre el polvo seco molido obtenido a partir de la pasta de almidón de trigo al 10%, dando como resultado un 8,3  $\pm$  0,1% p/p (bs).

# 7.3. Utilización de pululanasa en la obtención de almidón retrogradado a través de diferentes condiciones

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la sección anterior, se propuso que una forma de aumentar el rendimiento en la retrogradación del almidón de trigo, compuesto aproximadamente por un 75% de amilopectina (BeMiller y Whistler, 2009), podría ser a través de la desramificación de esta macromolécula para aumentar la proporción de las cadenas lineales con capacidad de asociarse rápidamente. Para esto se planteó el empleo una enzima capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1→6) del pululano, la pululanasa.

### 7.3.1. Puesta a punto

Para establecer condiciones adecuadas para el uso de la enzima desramificante se prepararon, en primera instancia, dos pastas de almidón de trigo en una concentración del 10% que fueron gelatinizadas a 85 °C como en los tratamientos previos. Se incorporó solución de pululanasa a una de ellas en cantidad suficiente para alcanzar una actividad de 40,96 ASPU/g almidón, mientras que a la otra pasta no le fue agregada la enzima. Una vez que fueron bien homogeneizadas, las muestras se incubaron durante 8 hs a 50 °C con agitación orbital (60 rpm). Para facilitar la homogeneización se colocaron esferas de vidrio en sendos recipientes. Luego de este proceso ambas muestras (con o sin tratamiento enzimático) reposaron durante 16 hs a 4 °C antes de ser introducidas en los sucesivos ciclos de calentamiento y enfriamiento en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Una primera diferencia importante entre las preparaciones sin y con pululanasa fue que esta última presentó una apariencia totalmente líquida al final de la incubación, mientras que la muestra sin enzima mantenía la consistencia viscosa propia de una pasta de almidón gelatinizado, dando así indicios de que la acción enzimática fue efectiva. Esta diferencia se mantuvo presente en todo el procesamiento posterior. A su vez, durante la refrigeración, si bien ambas preparaciones gelificaron, se observó que aquellas pastas sin enzima formaron geles firmes de apariencia translúcida (Figura 7.3a y b), mientras que las muestras con tratamiento enzimático formaron una pasta untuosa de color blanco opaco (Figura 7.3c y d).



Figura 7.3. Apariencia de las pastas de almidón sin pululanasa (a y b) y con pululanasa (c y d) al finalizar la refrigeración del cuarto ciclo

Finalmente, las pastas fueron dispuestas en forma de capa delgada sobre planchas metálicas para su secado en estufa a 50 °C durante 48 hs, período tras el cual fueron molidas.

Sobre estas muestras en polvo se realizaron las determinaciones de fibra, digestibilidad in-vitro y ensayos de DSC cuyos resultados se describen a continuación.

# 7.3.1.1. Determinación de fibra dietaria

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de fibra dietaria total entre las muestras preparadas sin y con pululanasa (denominadas ARsp y ARcp, respectivamente). Los valores de fibra hallados fueron de 8,8  $\pm$  0,1 y 8,6  $\pm$  0,0% p/p (bs), para ARsp y ARcp, respectivamente.

# 7.3.1.2. Digestibilidad in-vitro

En paralelo con las determinaciones de fibra, también se realizaron ensayos para evaluar la tasa de hidrólisis in-vitro de los almidones obtenidos. Observando los valores de la ordenada al origen, se encontró que tanto el almidón de trigo sin tratamiento como el almidón ARsp partieron de valores de azúcares reductores libres cercanos a cero, mientras que la muestra a la que se le realizó tratamiento con pululanasa (ARcp) partió de valores cercanos a los 250 mg de maltosa/g almidón. Esto explicaría que la curva de digestibilidad de esta muestra se encuentre desplazada hacia valores mayores respecto a las demás. Probablemente, la cantidad de enzima utilizada podría haber provocado una hidrolisis muy extensiva, generando numerosos extremos reductores. Cuando se realizó la normalización de estas curvas restando el valor inicial de azúcares libres se encontró que la muestra tratada enzimáticamente se encontraría siempre por debajo de las curvas correspondientes a las demás muestras, implicando una menor digestibilidad. Nótese que la normalización de la curva correspondiente a ARsp no presentó cambios apreciables debido a que esta muestra partió de un valor de azúcares libres iniciales muy pequeño (Figura 7.4).



Figura 7.4. Digestibilidad in-vitro de los almidones retrogradados obtenidos y del almidón de partida. ARsp = almidón retrogradado sin pululanasa; ARcp = almidón retrogradado con pululanasa (promedio ± error estándar, n = 4)

En la práctica, el procedimiento para eliminar el elevado contenido de azúcares reductores iniciales debido a la acción enzimática podría realizarse mediante el lavado por filtración del polvo obtenido con agua destilada, de manera de arrastrar los carbohidratos reductores solubles. Por otro lado, en todos los casos se observó un aumento pronunciado de la liberación de maltosa en los primeros 15 minutos de ensayo, seguido de una fase de liberación más lenta.

Estos resultados indicaron que, a pesar de no encontrarse diferencias en el contenido de fibra dietaria, la digestibilidad de los almidones tratados se vio fuertemente modificada por la aplicación del tratamiento enzimático, el cual resultó efectivo en reducir la digestibilidad del almidón in-vitro. Esto se debería fundamentalmente a las diferencias que podrían tener lugar durante la retrogradación, lo que fue evaluado a través de ensayos calorimétricos.

### 7.3.1.3. Calorimetría diferencial de barrido

Los polvos ARsp y ARcp se suspendieron en proporción 1:3 en agua destilada en cápsulas de aluminio. Estas fueron selladas herméticamente y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente al menos 3 hs para lograr una hidratación uniforme. Luego, se sometieron a un calentamiento controlado en un DSC para evaluar si existían diferencias en el comportamiento térmico del almidón debido al tratamiento enzimático. Los termogramas resultantes se exponen en la Figura 7.5.

Ambos almidones exhibieron comportamientos muy diferentes ante el calentamiento. No obstante, se pudo apreciar que ambos mostraron una endoterma incipiente en el rango entre 40 y 65 °C. Sin embargo, el tratamiento enzimático indujo la aparición de dos endotermas adicionales respecto a ARsp, una en el rango de temperaturas entre 65 y 115 °C, la cual parecería solaparse con la pequeña endoterma exhibida por ARsp a los ca. 102 °C y que puede atribuirse a la disociación del complejo amilosa-lípido (Gelders, Duyck, Goesaert, y Delcour, 2005), y otra en el rango entre 130 y 155 °C, aproximadamente. Diversos autores han encontrado endotermas en rangos de temperatura similares, o incluso mayores, al someter distintos almidones tratados enzimáticamente a calentamientos en DSC. Estas endotermas han sido atribuidas a la

fusión de cristales conformados por amilosa y/o cadenas de glucosa de distinto grado de polimerización provenientes de la hidrólisis de la amilopectina, las cuales se asociarían en estructuras de doble hélice formando cristales tipo A o tipo B de elevada estabilidad térmica y resistencia a la hidrólisis por  $\alpha$ -amilasas (Eerlingen y Delcour, 1995; Zhang y Jin, 2011a).



Figura 7.5. Termogramas representativos de los almidones retrogradados sin (ARsp) y con tratamiento enzimático (ARcp)

La presencia de estas dos nuevas endotermas en la muestra tratada enzimáticamente indicaría entonces que la acción de la pululanasa produjo fragmentos de las cadenas de amilopectina capaces de reorganizarse asociándose entre sí durante los almacenamientos refrigerados de 24 hs a 4 °C.

Los rangos de temperatura correspondientes a las endotermas son de importancia crucial si se busca obtener un ingrediente que sea estable al ser sometido a procesos de cocción en los cuales no se suelen superar los 105 °C de temperatura. En este caso, si

bien la endoterma ubicada en el rango de temperaturas más bajas indicaría que una fracción del almidón se fundiría al alcanzar los 100 °C, es evidente a través de la segunda endoterma, ubicada a mayores temperaturas, que otra parte del almidón permanecerá inalterada incluso en exceso de agua.

En esta situación sería importante poder determinar qué fracciones almidonosas se ven comprometidas, y a través de qué fenómenos, en el desarrollo de cada endoterma, para así establecer las condiciones adecuadas que permitan favorecer la cristalización de la fracción más termoestable. Por lo tanto, se analizó, en particular, el efecto de la temperatura en el proceso de obtención.

# 7.3.2. <u>Análisis del efecto de la temperatura de almacenamiento en la obtención de</u> <u>almidones retrogradados</u>

Los almidones retrogradados se obtuvieron a través de dos esquemas derivados de los descriptos en la sección anterior: por método térmico (Figura 7.6a) y por método enzimático-térmico (Figura 7.6b). Para el desarrollo de estos protocolos se ajustó previamente la actividad enzimática y su temperatura y tiempo de incubación. Además, por las dificultades encontradas durante la molienda de los productos secados en estufa, se procedió a la obtención de los polvos por liofilización.



Figura 7.6. Esquema empleado para la obtención de los almidones retrogradados a través de a) tratamiento térmico y b) tratamiento enzimático-térmico

### Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

Descripto en forma breve, se prepararon suspensiones de almidón de trigo al 10% p/p con agua destilada en vasos de precipitado tipo Berzelius de 600 ml y se pregelatinizaron durante 30 min a 85 °C con agitación constante. Una vez que las suspensiones se enfriaron aproximadamente hasta los 60 °C se les agregó, a la mitad de ellas, 432 µl (20 ASPU/g almidón) de enzima pululanasa (Figura 7.6b). Estas suspensiones se incubaron durante 6 hs en baño con agitación orbital a 59 °C. En este caso se omitió el período de reposo de 16 hs a 4 °C, y se disminuyó la concentración de pululanasa y el tiempo de incubación dado que se observó que las pastas tratadas con enzima se fluidificaron a lo largo del tiempo, siendo además estas condiciones más convenientes respecto a los costos del proceso. No obstante, dado que otros autores han informado que la temperatura óptima de actividad de esta enzima se encuentra entre los 58 y los 60 °C, la temperatura de incubación se aumentó 9 °C para alcanzar los 59 °C (Miao et al., 2009; Morales-Medina, Del Mar Muñío, Guadix, y Guadix, 2014b; Ozturk et al., 2009; Miaomiao Shi et al., 2013).

Inmediatamente luego de finalizada la incubación las suspensiones fueron calentadas en autoclave a 121 °C durante 30 min para la completa gelatinización del almidón. Las suspensiones a las que no se les agregó pululanasa (Figura 7.6a) fueron calentadas en autoclave en las mismas condiciones directamente luego de la etapa de pregelatinización. Una vez realizado el primer calentamiento a 121 °C las suspensiones se dividieron para su almacenamiento en cámara a 0 o 4 °C durante 24 hs. Luego de ese plazo, se procedió con sucesivos ciclos de calentamiento en autoclave y almacenamiento en cámara a la temperatura correspondiente. Una vez finalizado el total de 4 ciclos, las muestras almacenadas a ambas temperaturas fueron liofilizadas y molidas con un molinillo eléctrico.

Al finalizar este esquema de trabajo, el resultado fue la obtención de 4 polvos de almidón enriquecidos en su fase retrogradada. Los almidones retrogradados obtenidos sin pululanasa a 0 y 4 °C se denominaron ARsp0 y ARsp4, respectivamente, mientras que los obtenidos mediante tratamiento enzimático fueron llamados ARcp0 y ARcp4 para las temperaturas correspondientes.

# 7.3.2.1. Caracterización de los productos obtenidos

# 7.3.2.1.1. <u>Transiciones térmicas por DSC</u>

La caracterización térmica se realizó sobre los productos finales liofilizados. Los polvos molidos obtenidos se resuspendieron en agua destilada en proporción 1:3 (almidón:agua) dentro de la cápsula de aluminio, la cual fue sellada herméticamente. Todas las muestras se dejaron reposar al menos 3 hs a temperatura ambiente para permitir una hidratación uniforme al momento de las mediciones. Los termogramas obtenidos se presentan en la Figura 7.7.



Figura 7.7. Termogramas obtenidos de las suspensiones 1:3 en agua destilada de a) ARsp0, b) ARsp4, c) ARcp0 y d) ARcp4

Se observa que, como se vio anteriormente, todas las muestras exhibieron un pico estrecho y definido, localizado alrededor de los 100 °C, el cual se asociaría a la disociación de los complejos amilosa-lípido. Los almidones obtenidos sin tratamiento enzimático (ARsp) mostraron una endoterma incipiente entre los 40 y los 65 °C (Figura

7.7a y b), al igual que aquellos evaluados en los ensayos previos (ARsp en la Figura 7.5). Otra vez, el tratamiento con pululanasa influyó en la aparición de endotermas relacionadas a la fusión de cristales (Figura 7.7c y d). Sin embargo, en este caso las mismas fueron más amplias a aquellas observadas previamente en la Sección 7.3.1.3 y parecieron ubicarse a temperaturas menores, abarcando el rango entre los 40 y 85 °C, aproximadamente. Por otro lado, en estos experimentos no se alcanzaron temperaturas de calentamiento mayores a 140 °C, por lo que no fue posible observar endotermas más allá de este rango.

Las temperaturas y entalpías asociadas a las transiciones mencionadas se muestran en la Tabla 7.1. En estos resultados se apreció un efecto relacionado con el tratamiento enzimático, pero no se evidenció, en general, que la temperatura de almacenamiento tuviera el mismo grado de influencia sobre los parámetros de la retrogradación. El análisis estadístico mostró que existió una interacción significativa entre los dos factores analizados, "temperatura de almacenamiento" y "tratamiento enzimático". El rango de fusión de la amilopectina retrogradada (calculado como  $\Delta T_R = T_{fR} - T_{iR}$ ) fue más amplio para aquellas muestras tratadas enzimáticamente (47,0 ± 2,6 y 47,8 ± 2,4 °C para ARcp0 y ARcp4, respectivamente) que para las muestras no tratadas (14,3 ± 3,8 y 24,0 ± 1,8 °C para ARsp0 y ARsp4, respectivamente).

		ARsp0	ARsp4	ARcp0	ARcp4
Fusión de la amilopectina retrogradada	T <sub>iR</sub> (°C)	43,9 ± 1,6°	$42,3 \pm 0,8^{bc}$	39,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	36,0 ± 1,5ª
	Т <sub>р</sub> (°С)	50,3 ± 1,5	51,2 ± 0,6	56,2 ± 1,9	52,3 ± 2,6
	Т <sub>fR</sub> (°С)	58,2 ± 3,4ª	66,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	86,6 ± 2,5°	83,8 ± 1,9°
	$\Delta H_R (J/g)$	$0,4 \pm 0,1^{a}$	$1,0 \pm 0,0^{a}$	$7,0 \pm 0,3^{b}$	8,9 ± 1,2°
Disociación	Т <sub>іА-L</sub> (°С)	<b>89,4 ± 0,1</b> ª	<b>89,1 ± 0,4</b> <sup>a</sup>	94,2 ± 0,1°	92,2 ± 0,2 <sup>b</sup>
de complejos	Т <sub>рА-L</sub> (°С)	98,6 ± 0,0ª	$100,2 \pm 0,8^{b}$	101,8 ± 0,2°	99,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
amilosa-	T <sub>fA-L</sub> (°C)	108,5 ± 0,4	112,7 ± 2,0	111,2 ± 1,0	110,3 ± 0,2
lípido	$\Delta H_{A-L}$ (J/g)	1,15 ± 0,20 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,04°	$0,82 \pm 0,02^{a}$	<b>0,88 ± 0,01</b> <sup>ab</sup>

Tabla 7.1. Parámetros asociados a las transiciones térmicas de los almidones retrogradados obtenidos

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 2).

Las entalpías asociadas a las diferentes endotermas fueron afectadas significativamente por la aplicación del tratamiento enzimático, mostrando valores considerablemente mayores para las muestras tratadas con pululanasa. Se observó también una tendencia al aumento de las  $\Delta$ H<sub>R</sub> cuando las muestras se almacenaron a 4 °C respecto a aquellas almacenadas a 0 °C (p = 0,0511). Esto indicaría que tanto el tratamiento enzimático como la temperatura de almacenamiento juegan un rol en el grado de retrogradación de las muestras analizadas. Por otro lado, dado que la entalpía de gelatinización del almidón de trigo nativo es de 12,4 ± 0,3 J/g, se verifica que la retrogradación sólo es capaz de recuperar la cristalinidad de la muestra en forma parcial (Utrilla-Coello, Bello-Pérez, Vernon-Carter, Rodriguez, y Alvarez-Ramirez, 2013).

En los sistemas de almidón gelatinizado, dos eventos consecutivos facilitan el proceso de recristalización. El primero es la nucleación, que implica la agregación de las cadenas poliméricas de glucosa y es favorecido por la baja temperatura. El segundo es la propagación o crecimiento cristalino, que es favorecido cuando las cadenas son más flexibles o móviles para formar dobles hélices y ensamblarse (Hoover, 1995). A su vez, la flexibilidad de las cadenas se verá favorecida por el aumento de la temperatura (Silverio et al., 2000). En los resultados presentados, la influencia de la temperatura de almacenamiento en las temperaturas de las transiciones térmicas no fue del todo clara, posiblemente debido a la cercanía entre ambas (0 y 4 °C). Sin embargo, su efecto fue más evidente en las entalpías de retrogradación, las cuales están relacionadas con la extensión en la que ocurre el proceso. Se observaron valores más altos para las muestras que fueron sometidas a almacenamientos a 4 °C respecto a aquellas almacenadas a 0 °C.

Respecto a la influencia de la longitud de las cadenas, en contraste con la tendencia a retrogradar de la amilosa por ser una molécula lineal, en la amilopectina la propensión a retrogradar está vinculada con la capacidad de las cadenas de glucosa más externas para formar dobles hélices (Vamadevan y Bertoft, 2014). De acuerdo al modelo estructural de Bertoft (2013), las regiones extensivamente ramificadas de la macromolécula de amilopectina están constituidas aproximadamente por 2 – 11 cadenas, conformando bloques que se encuentran esparcidos a lo largo de las cadenas largas de amilopectina (de grado de polimerización mayor que 35) que, colectivamente, forman la columna vertebral de la amilopectina. Los bloques, a su vez, pueden formar clusters. En estudios sobre amilopectina de diferentes orígenes botánicos, Vamadevan y Bertoft (2018) encontraron correlaciones altas y positivas entre la longitud de las cadenas exteriores y la longitud de los segmentos interbloque con los siguientes parámetros térmicos de las endotermas de fusión de la amilopectina retrogradada: temperatura de pico, temperatura final, rango y entalpía de retrogradación.

Considerando que la pululanasa es una enzima hidrolítica específica para enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), su acción sobre la amilopectina produciría la liberación de cadenas con diferentes grados de polimerización y ramificación, generando, a su vez, tramos lineales (desramificados) más largos. En particular, el aumento de estos últimos explicaría, de acuerdo al modelo de Bertoft, los incrementos en los parámetros calorimétricos de las muestras tratadas con enzima (T<sub>fR</sub>,  $\Delta$ T<sub>R</sub> y  $\Delta$ H<sub>R</sub>, Tabla 7.1).

Por otro lado, cuando se analizaron las transiciones asociadas a la disociación del complejo amilosa-lípido, se encontró que las muestras tratadas con pululanasa mostraron T<sub>iA-L</sub> y T<sub>pA-L</sub> significativamente mayores a las de las muestras no tratadas, aunque no hubo diferencias significativas en la T<sub>fA-L</sub>. Los aumentos de temperatura observados y la disminución de los rangos de las endotermas cuando hubo tratamiento desramificante (de 19,1 y 23,6 °C, sin pululanasa, a 17 y 18,1 °C, con pululanasa) indicarían la formación de complejos más estables y un proceso de disociación más cooperativo. Asimismo, se evidenció una disminución significativa en la  $\Delta H_{A-L}$  de disociación de los complejos de las muestras tratadas con pululanasa respecto a sus contrapartes sin tratar. Se ha informado que la acción de la enzima pululanasa sobre la amilopectina produce más cadenas disponibles para la formación del complejo, lo que se refleja en el aumento de las entalpías asociadas (Wongprayoon et al., 2018). Por otro lado, estos autores también establecieron que la retrogradación y la formación de complejo son procesos competitivos entre sí cuando se generan más cadenas lineales por acción de la enzima. En el presente trabajo no se observó un aumento de la entalpía, probablemente por esta última causa. Por otra parte, Gelders et al. (2005) estudiaron

la formación de distintos complejos amilosa-lípido en muestras de almidón hidrolizadas para obtener fragmentos de polisacárido con grados de polimerización específicos, encontrando que se requieren grados de polimerización mayores a 60 para la formación de los mismos.

### 7.3.2.1.2. Análisis viscoamilográfico en RVA

Se utilizó un RVA para evaluar el perfil viscoamilográfico de los distintos almidones retrogradados obtenidos. El almidón de trigo utilizado como materia prima también fue evaluado para estimar la magnitud de los posibles cambios ocasionados por los distintos tratamientos y poder establecer los mecanismos implicados. Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 7.8.

Como era de esperarse, el almidón de trigo nativo exhibió un perfil característico de este tipo de almidones (Figura 7.8a). El gran pico de viscosidad exhibido por esta muestra se relaciona con la presencia de gránulos enteros de almidón, capaces de absorber agua y expulsar amilosa por fuera de su estructura (gelatinización), aumentando la viscosidad de la suspensión. Como se mencionó en la Sección 3.1.6 para la harina de trigo, el posterior descenso de la viscosidad está asociado a la ruptura de la matriz estructural del gránulo por el esfuerzo de corte aplicado, mientras que el aumento de la viscosidad que ocurre a medida que disminuye la temperatura está relacionado con la reasociación de las cadenas de amilosa durante la retrogradación. Este aumento será mayor en la medida que se favorezca la reasociación de estas moléculas.

Por el contrario, los almidones retrogradados presentaron perfiles menos definidos, con valores de viscosidad muy inferiores respecto al almidón nativo (Figura 7.8b y c). En estos casos no fue posible establecer eventos de empaste concretos. Los AR preparados sin hidrólisis enzimática (ARsp) presentaron perfiles, si bien desplazados a diferentes valores de viscosidad, muy similares en su forma (Figura 7.8b). Por su parte, los AR hidrolizados con pululanasa (ARcp) no presentaron grandes cambios a lo largo del ensayo, mostrando siempre valores de viscosidad por debajo o alrededor de los 100 cP (Figura 7.8c).

274

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Figura 7.8. Perfiles viscoamilográficos representativos del almidón de trigo y los almidones retrogradados obtenidos a partir de él en a) escala completa y en b) y c) escalas magnificadas

La poca evidencia de picos de viscosidad bien marcados es consecuencia de que los almidones retrogradados han perdido la estructura granular presente en el almidón nativo. Por lo tanto, se podría considerar que los AR no se hinchan como un almidón sin tratamientos, sino que se hidratan como hidrocoloides en suspensión. En el mismo sentido, esto conlleva también la ausencia o poca evidencia, según corresponda, de los fenómenos asociados a la inestabilidad de los almidones debido al esfuerzo de corte aplicado, ya que estos no contienen estructuras granulares remanentes que puedan ser disgregadas.

A pesar de que los AR no presentaron perfiles bien definidos, varios de los parámetros viscoamilográficos pudieron ser obtenidos a partir de ellos. Los mismos se presentan en la Tabla 7.2. En ella se puede apreciar la magnitud de las diferencias en los parámetros entre los AR y el almidón de trigo, así como los efectos relacionados a las condiciones de obtención de los AR.

Tabla 7.2. Pará	metros viscoami	lográficos del al	lmidón de trigo y	los almidones	retrogradados

Parámetro	AT	ARsp0	ARsp4	ARcp0	ARcp4	
T <sub>e</sub> (°C)	90,7 ± 0,9	—	—	—		
t <sub>e</sub> (min)	$4,4 \pm 0,1$	—	—			
η <sub>p</sub> (cP)	$2234 \pm 38^{d}$	$127 \pm 11^{b}$	336 ± 8°	$62 \pm 4^{a}$	49 ± 1 <sup>a</sup>	
η <sub>mín</sub> (cP)	1737 ± 7°	$116 \pm 10^{a}$	$313 \pm 2^{b}$			
$\eta_p - \eta_{min}$ (cP)	$497 \pm 31^{b}$	11 ± 1 <sup>a</sup>	$23 \pm 6^{a}$			
η <sub>f</sub> (cP)	$2543 \pm 57^{d}$	$249 \pm 16^{b}$	616 ± 1°	$101 \pm 2^{a}$	$85 \pm 2^{a}$	
$\eta_{f} - \eta_{min}$ (cP)	$806 \pm 50^{\circ}$	$133 \pm 6^{a}$	$304 \pm 1^{b}$			
η <sub>f</sub> – η <sub>p</sub> (cP)	$309 \pm 19^{d}$	$122 \pm 5^{b}$	281 ± 6 <sup>c</sup>	$39 \pm 2^{a}$	36 ± 1 <sup>a</sup>	

AT = Almidón de trigo nativo. Promedio ± desvío estándar.

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p < 0.05; n = 2).

En el caso de  $\eta_p$ , se encontró un efecto de la interacción entre el tratamiento enzimático y la temperatura de almacenamiento. Si bien estas temperaturas no produjeron modificaciones en las muestras tratadas enzimáticamente, se observó que en las no tratadas el almacenamiento a 4 °C produjo un almidón cuya suspensión es más viscosa que cuando se almacenó a 0 °C. Un comportamiento similar se registró también tanto para  $\eta_f$  como para el asentamiento 2 ( $\eta_f - \eta_p$ ). En estas muestras sin tratamiento enzimático, el almacenamiento de las pastas a 4 °C produjo también aumentos en la  $\eta_{mín}$ y en el asentamiento 1 ( $\eta_f - \eta_{mín}$ ), aunque no se registraron cambios significativos en la inestabilidad ( $\eta_p - \eta_{mín}$ ).

En las muestras sin tratamiento enzimático los polímeros que conforman el almidón están presentes en su tamaño original, ya que no fueron hidrolizados. En estos casos, dado que las muestras no contienen estructuras granulares que puedan hincharse y/o expulsar amilosa, el pico de viscosidad exhibido fue pequeño y, en el mismo sentido, la inestabilidad registrada en estas muestras fue muy leve, debido a que no existen estructuras granulares remanentes que puedan ser disgregadas por el efecto de cizalla. Sin embargo, fue evidente que el enfriamiento produjo un aumento de la viscosidad, aunque mucho menor al observado en la muestra de trigo nativo. Por otro lado, estos almidones mostraron diferencias importantes debido al efecto de las temperaturas de almacenamiento empleadas en su producción. Así, ARsp4 estuvo desplazado hacia mayores valores de viscosidad en todo el rango del ensayo y exhibió cambios más pronunciados debido a los efectos del calentamiento y enfriamiento durante los experimentos (mayor  $\eta_p$ ,  $\eta_{mín}$  y asentamientos) respecto a ARsp0, indicando que la organización de las moléculas en ambas muestras sería diferente.

Por su parte, en las muestras tratadas enzimáticamente las ramificaciones de las grandes moléculas de amilopectina fueron hidrolizadas en fragmentos de menor largo de cadena, los cuales, si bien tienen mayor capacidad para cristalizar, no producen aumentos en la viscosidad de la suspensión debido a su tamaño relativamente pequeño. Estos almidones no exhibieron eventos de empaste o picos de viscosidad concretos dado que no sólo carecen de estructuras granulares, sino que también las grandes estructuras ramificadas de la amilopectina han sido hidrolizadas en fragmentos de menor tamaño, provocando que pierdan su capacidad de aumentar la viscosidad de la suspensión, y eliminando la inestabilidad asociada a la aplicación de esfuerzos de corte. Surendra Babu y Parimalavalli (2018) estudiaron las propiedades de empaste de almidones de papa tratados con pululanasa y retrogradados a distintas temperaturas, encontrando disminuciones similares a las halladas en el presente trabajo respecto al almidón nativo.

# 7.3.2.1.3. Caracterización microestructural por SEM

Se tomaron micrografías del almidón de trigo de partida y de los polvos de almidón retrogradado obtenidos en un SEM empleando el modo de bajo vacío (130 Pa) y detectando electrones secundarios.

En la Figura 7.9 se presenta el almidón de trigo nativo empleado para la obtención de los almidones retrogradados. En ella se pueden observar con claridad dos poblaciones de tamaños granulares, lo que está de acuerdo con la distribución bimodal característica del almidón de trigo, compuesta de gránulos tipo A (gránulos de tamaño mayor a 10  $\mu$ m, de forma discoidal) y tipo B (gránulos de tamaño menor a 10  $\mu$ m, de forma esférica).



Figura 7.9. Micrografías SEM de almidón de trigo nativo a 2000×

Por otro lado, se obtuvieron las micrografías para los distintos AR a diferentes magnificaciones. En general, para todas las muestras se observó la pérdida total de la estructura granular, dando paso a nuevos arreglos estructurales. En estas muestras fue posible distinguir dos tipos de estructuras que dominaron los campos observados. Sin embargo, las estructuras se mostraron diferentes dependiendo de si fue aplicado o no el tratamiento enzimático.

La Figura 7.10 muestra los almidones retrogradados obtenidos sin tratamiento enzimático para ambas temperaturas de almacenamiento. Para ARsp0 (Figura 7.10a, I y II), se observó presencia de fragmentos de material de apariencia mayormente compacta, con algunas zonas compuestas por estructuras más irregulares. Para ARsp4 (Figura 7.10b, III y IV), en cambio, se observó la predominancia de zonas muy irregulares con apariencia porosa y abierta, encontrándose menor presencia de fragmentos compactos.

Por otra parte, en la Figura 7.11 se presentan las imágenes obtenidas para los almidones tratados con pululanasa a ambas temperaturas de almacenamiento. En este caso, ARcp0 (Figura 7.11a, I y II) se mostró compuesto por fragmentos compactos prácticamente en su totalidad, sin presentar evidencias de estructuras porosas. Los fragmentos observados exhibieron diferencias en la apariencia de sus superficies, observándose la coexistencia de fragmentos de superficie lisa y de superficie rugosa. De forma similar, las imágenes obtenidas para ARcp4 (Figura 7.11b, III y IV) presentaron el mismo tipo de estructuras compactas, con fragmentos de superficies igualmente diferenciables y ausencia de estructuras porosas.

Las imágenes muestran que, en aquellas muestras obtenidas sin tratamiento hidrolítico, la temperatura de almacenamiento tuvo incidencia en el tipo de arreglos estructurales formados. Por el contrario, los AR obtenidos por tratamiento con pululanasa mostraron apariencias similares para ambas temperaturas de obtención.



HVmagdetWDspot100 µm1250 kV1000 x LFD9.5 mm6.0SeMFI-LIMF-FI-UNLPFigura 7.10. Micrografías SEM de a)ARsp0 a 400× y detalle a 1000× de estructuras I) menoscompacta y II) más compacta. b)ARsp4 a 400× y detalle a 1000× de estructuras III) menos compactay IV) más compacta. Recuadro blanco indica zona de magnificación.

### Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



HV
mag
det
WD
spot
100 µm
100 µm<

Las diferencias estructurales halladas entre ARsp0 y ARsp4 permitirían explicar los resultados obtenidos en los ensayos viscoamilográficos. Los perfiles de ARsp4, desplazados a mayores viscosidades, podrían deberse a la mayor presencia de estructuras porosas, ya que sus partículas se encontrarían más expandidas y serían capaces de lograr aumentos más pronunciados de la viscosidad. En ARsp0, en cambio, la presencia de fragmentos en forma de bloques más compactos podría causar una menor hidratación y un menor hinchamiento del material amiláceo en suspensión, dando aumentos de viscosidad más leves. En un sentido similar, ninguno de los AR tratados con pululanasa exhibieron capacidad para aumentar la viscosidad de sus suspensiones durante los ensayos viscoamilográficos, lo cual sería consecuencia de que se encuentran compuestos principalmente por partículas más compactas. Como se explicó anteriormente y se discutió en los resultados calorimétricos, la acción desramificante de la enzima conduce a una mayor retrogradación. La formación de agregados que involucra este proceso (fundamentalmente de dobles hélices de amilopectina) explicaría, en parte, que el material obtenido presente una microestructura más compacta.

### 7.3.2.1.4. Cristalinidad por rayos-X

La cristalinidad de los almidones retrogradados, así como también del almidón de trigo de partida nativo y gelatinizado, fue evaluada a través de un difractómetro de rayos-X. Los patrones de difracción obtenidos para cada muestra se exponen en la Figura 7.12.

El almidón de partida, sin tratamientos, presentó un patrón de difracción característico de almidones de trigo nativo (Figura 7.12a). El mismo presentó una distribución de picos asociada típicamente al patrón cristalino tipo A que presentan los almidones de diversos cereales. Esto es, picos de gran intensidad ubicados a ángulos 20 de 15,08° y a los 22,95°, incluyendo un pico doblete cuyos máximos se ubicaron a los 17,12° y los 17,87°, respectivamente, y un pico de menor intensidad a los 19,97°. Este último es relacionado generalmente con un patrón cristalino tipo V, asociado al complejo amilosa-lípido (Román et al., 2016; Shah, Masoodi, Gani, y Ashwar, 2016; Yoo

y Jane, 2002). Otros picos pequeños que pudieron ser registrados se ubicaron a los 11,41° y a los 26,32°.



Figura 7.12. Patrones de difracción de rayos-X de a) almidón de trigo nativo, b) almidón de trigo gelatinizado, c) ARsp0, d) ARsp4, e) ARcp0 y f) ARcp4

Por su parte, el difractograma presentado en la Figura 7.12b muestra el patrón exhibido por un polvo de almidón obtenido a partir de una suspensión al 10% de almidón de trigo que fue sometida a un calentamiento en autoclave a 121 °C por 30 min e inmediatamente liofilizada. Este patrón mostró poca evidencia de picos de cristalinidad intensos, debido a la pérdida extensiva de las estructuras cristalinas durante la gelatinización. Sin embargo, fue posible detectar picos cristalinos característicos de complejo amilosa-lípido a ángulos 2θ de 13,52° y 19,66° (Román et

al., 2016), y otro pico incipiente a 17,01°, pudiéndose asociar entonces la ligera cristalinidad exhibida por esta muestra casi exclusivamente a la presencia de complejo amilosa-lípido, que se reasocia rápidamente luego de un calentamiento.

Los difractogramas correspondientes a las Figura 7.12c y d fueron obtenidos a partir de los almidones retrogradados sin tratamiento enzimático almacenados a 0 y 4 °C (ARsp0 y ARsp4, respectivamente). Estas muestras se caracterizaron por la predominancia de una fase amorfa, como revelan su apariencia amplia de tipo gaussiana y la ausencia de picos intensos y bien definidos. A pesar de esto, fue posible detectar algunos picos de cristalinidad pequeños ubicados a los 16,77°, 19,60° y 21,66° para el caso de ARsp0 (Figura 7.12c) y a los 17,10°, 19,85° y 21,44° para ARsp4 (Figura 7.12d). En ambos casos la presencia de los picos alrededor de los ~20° se asociaría a la presencia del complejo amilosa-lípido, mientras que los picos ubicados en las cercanías de los 17° y los 22° indicarían una recuperación parcial de la cristalinidad debido a la retrogradación. Sin embargo, la débil señal asociada a estos picos no permitió establecer si los cristales corresponden a un arreglo tipo A o tipo B.

Por otro lado, las Figura 7.12e y f muestran los patrones correspondientes a los almidones tratados con pululanasa, ARcp0 y ARcp4, respectivamente. Estos patrones evidenciaron la presencia de estructuras cristalinas más definidas que las de sus contrapartes sin tratamientos enzimáticos (ARsp0 y ARsp4), como se deduce de la presencia de picos de elevada intensidad a los ángulos 20 de 16,93° y 22,08°, de mediana intensidad a ángulos de 14,30°, 19,44° y 23,78°, y de muy baja intensidad a ángulos de 25,98° para ARcp0. Para el caso de ARcp4 fue posible detectar picos de similares características ubicados a 16,92° y 22,03°, 14,83°, 19,55° y 23,51°, y 26,19°.

Los difractogramas para los almidones tratados enzimáticamente sugieren una recuperación importante de la cristalinidad por la retrogradación. En ambas muestras, el pico ubicado en cercanías a los  $\sim 17^{\circ}$  se presentó como un único pico, a diferencia del doblete exhibido por el almidón nativo. Esta característica en las muestras de almidón retrogradado, sumada a la elevada intensidad de este único pico respecto a los demás, sugiere que los cristales presentes se encuentran ordenados en un arreglo tipo B.

### Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

La susceptibilidad ante el ataque enzimático de los dos alomorfos, A y B, ha sido evaluada en distintos trabajos. Por un lado, Williamson et al. (1992) y Planchot, Colonna, y Buleon (1997) prepararon y aislaron ambas variantes polimórficas a partir de la hidrólisis suave de distintos almidones (trigo, maíz, papa, legumbres y mandioca), y evaluaron la susceptibilidad de los mismos frente a distintas enzimas ( $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ amilasa y glucoamilasa-1). Sus resultados indicaron que los arreglos cristalinos tipo B eran más resistentes a la digestión que los cristales que presentaban arreglos tipo A, lo cual también ha sido observado en las variantes polimórficas naturalmente existentes en los cereales.

Sin embargo, en un trabajo más reciente, Cai y Shi (2014) presentaron evidencia de que, en el caso de polimorfos preparados a partir de la desramificación enzimática con isoamilasa de almidones céreos de maíz y papa, la susceptibilidad enzimática de los arreglos tipo A era menor a la de los tipo B. Los autores sugirieron entonces que el tipo de arreglo cristalino obtenido no es el factor determinante de la susceptibilidad enzimática, y que lograr elevados grados de cristalinidad no garantizaría la resistencia a la hidrólisis. Los autores concluyeron entonces que las condiciones de preparación que dificulten el empaquetamiento eficiente de las doble hélices, dando lugar a cristales imperfectos, aumentaría la susceptibilidad enzimática del producto más allá del elevado grado de cristalinidad que pueda presentar.

### 7.3.2.1.5. Evaluación nutricional: digestibilidad in-vitro del almidón

Para evaluar la susceptibilidad frente a la digestión por  $\alpha$ -amilasas de los almidones retrogradados obtenidos en este trabajo, se realizaron ensayos para determinar la tasa de digestibilidad in-vitro, la cual se muestra gráficamente en la Figura 7.13.

Los resultados demostraron que todos los almidones retrogradados presentaron una digestibilidad in-vitro muy inferior a la exhibida por el almidón de trigo sin modificaciones. A su vez, se observó que aquellos almidones tratados enzimáticamente (ARcp0 y ARcp4) presentaron disminuciones mucho más marcadas de los valores de maltosa liberada que los almidones retrogradados obtenidos sin tratamiento enzimático (ARsp0 y ARsp4). Por otro lado, se logró evidenciar, principalmente en estas

últimas, una tendencia relacionada al efecto de la temperatura de almacenamiento. Los almidones obtenidos por retrogradación a 0 °C mostraron una menor liberación de maltosa durante la hidrólisis que los retrogradados a 4 °C. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferencias estructurales observadas entre ambas muestras. Dado que en ARsp0 se favoreció la formación de estructuras más compactas que en ARsp4, se sugiere que esta última sería más susceptible a la acción enzimática debido a su estructura más abierta y porosa. En el mismo sentido, la mayor similitud en las curvas de digestibilidad de ARcp0 y ARcp4 se atribuye a que estas muestras están compuestas por estructuras compactas cuya susceptibilidad al ataque enzimático sería similar.



Figura 7.13. Digestibilidad in-vitro normalizada de los almidones retrogradados con y sin pululanasa a diferentes temperaturas (promedio ± error estándar, n = 4)

Para realizar un análisis más pormenorizado de estos resultados, se ajustaron las curvas al modelo cinético de Goñi (Ecuación 4.2), como fue realizado anteriormente para los panificados. Los resultados se resumen en la Tabla 7.3.
Los resultados hallados a partir del ajuste de los datos permitieron determinar no sólo que los almidones retrogradados alcanzan valores de liberación de maltosa a tiempo  $t \rightarrow \infty$  (*C*<sub>inf</sub>) menores al almidón de trigo sin modificar, sino también que la hidrólisis se produjo a velocidades marcadamente menores, como muestran los valores de *a* en la Tabla 7.3.

Tabla 7.5. Tarametros del ajuste de los valores de digestibilidad armodero de dom					
	Cinf*	<i>a</i> (min <sup>-1</sup> )	r² ajustado	Prueba F	IG estimado
AT†	489 ± 10	0,168 ± 0,021	0,9256	а	100
ARsp0	$323 \pm 4$	0,068 ± 0,005	0,9890	b	61,0
ARsp4	402 ± 5	0,064 ± 0,004	0,9918	С	75,2
ARcp0	199 ± 6	0,036 ± 0,004	0,9646	d	33,1
ARcp4	233 ± 6	0,026 ± 0,002	0,9882	e	34,6

Tabla 7.3. Parámetros del ajuste de los valores de digestibilidad al modelo de Goñi

\* expresado en mg maltosa/g almidón, maltosa expresada como almidón.

† AT = almidón de trigo

Valor ± desvío estándar.

Diferentes letras en las pruebas F indican diferencias significativas entre las curvas (p < 0.05).

Los valores de *C*<sub>inf</sub> exhibidos por los distintos AR también variaron según el tratamiento realizado. Los almidones tratados con pululanasa mostraron las menores *C*<sub>inf</sub>, lo cual indicaría que la acción desramificante de la pululanasa fue eficiente al momento de facilitar la retrogradación durante el almacenamiento refrigerado, otorgándoles mayor resistencia ante el ataque de las  $\alpha$ -amilasas. Por otra parte, se observó que el almacenamiento a 0 °C resultó más efectivo para aumentar tal resistencia, debido posiblemente al favorecimiento de la formación de estructuras más compactas, como fue discutido en párrafos anteriores.

El análisis de la velocidad de hidrólisis indicó que, además de alcanzar los menores valores de *C*<sub>inf</sub>, los ARcp0 y ARcp4 también fueron los almidones que más lentamente se hidrolizaron, ya que sus valores de *a* fueron menores al resto de las muestras. Adicionalmente, la temperatura de almacenamiento utilizada afectó la velocidad de hidrólisis de los almidones tratados enzimáticamente, pero no tuvo influencia en aquellos no tratados.

# <u>Capítulo 7: Obtención y caracterización de almidón resistente tipo III a partir de almidón de trigo nativo</u>

De forma similar a la realizada sobre los panificados en el Capítulo 4, Sección 4.4.2, se estimaron los índices glucémicos de los almidones retrogradados. Para esto, se utilizó como referencia el área bajo la curva (ABC) correspondiente al ajuste de los datos de digestibilidad del almidón de trigo sin tratamientos. La relación entre las ABC de los diferentes almidones y el almidón de trigo se interpretó entonces como el índice glucémico estimado in-vitro de estas muestras. Los resultados se presentan en la Tabla 7.3. Como puede verse, se lograron reducciones muy importantes del *IG* estimado. Si bien los tratamientos realizados para obtener los almidones ARsp0 y ARsp4 mostraron menor capacidad para reducir los IG estimados, fue notable encontrar que el empleo de temperaturas de almacenamiento menores logró disminuir el *IG* desde un 25% (ARsp4) hasta un 39% (ARsp0), aproximadamente. Respecto a los almidones ARcp0 y ARcp4, se observó que el uso de la pululanasa permitió lograr reducciones del IG estimado de hasta un 66%, aproximadamente, encontrándose además que la retrogradación a 0 °C produjo una ligera disminución adicional. Estos resultados indicarían que la aplicación de distintos tratamientos que apunten a promover la retrogradación del almidón permite obtener ingredientes con menor impacto glucémico.

#### 7.4. Conclusiones parciales

El empleo de tratamientos térmicos cíclicos sobre almidones de trigo previamente gelatinizados permitió obtener productos enriquecidos en almidón retrogradado. Los ensayos preliminares demostraron que la combinación de estos tratamientos con la aplicación de hidrólisis enzimática desramificante con pululanasa induce la formación de cristales de distintos rangos de estabilidad térmica, aumentando el rendimiento en AR del producto final.

El estudio del efecto de la temperatura de almacenamiento de almidones tratados y no tratados con pululanasa indicó que la temperatura a la cual se deja retrogradar la pasta sólo tuvo influencia en las características de los almidones no hidrolizados. En estos casos, la elección de temperaturas de almacenamiento a 0 °C sería preferible dado que en estas condiciones se favorece la formación de estructuras más compactas y de menor digestibilidad que cuando se almacenan a 4 °C. A esta última temperatura se observó mayor presencia de material poroso capaz de hidratarse, aumentar la viscosidad del medio y digerirse.

La acción de la temperatura de almacenamiento sobre las muestras tratadas con pululanasa no fue particularmente evidente en ninguno de los ensayos de caracterización realizados. Estas muestras presentaron endotermas de fusión cristalina de mayor rango de temperatura y de mayor entalpía, incapacidad de aumentar la viscosidad en ensayos de RVA, una estructura compuesta principalmente por material compacto, mayor intensidad en sus patrones de difracción, y digestibilidades in-vitro notablemente menos extensas y más lentas, con *IG* estimados alrededor del 34%.

Los resultados indicaron que la modificación del almidón de trigo a través de tratamientos térmicos-cíclicos (4 ciclos de calentamiento a 121 °C y almacenamiento a 0 o 4 °C), sumado al tratamiento desramificante con pululanasa (20 ASPU/g de almidón, 6 hs de incubación a 59 °C) fue efectivo al momento de obtener polvos enriquecidos en almidón retrogradado resistente a la digestión enzimática.

Capítulo 8 Conclusiones

### **Capítulo 8: Conclusiones**

#### Aplicación de almidón resistente tipo II en panificación

El reemplazo parcial de harina de trigo por almidón resistente tipo II (Hi-Maize 260, HM) para la elaboración de pan blanco produjo aumentos en la absorción de agua farinográfica y disminuciones en el contenido de gluten. Los resultados revelaron modificaciones leves en la microestructura y la reología de la masa para niveles de reemplazo de 10 y 20%, relacionadas principalmente al desarrollo de una red de gluten menos orientada y entrecruzada, y a un aumento en la componente elástica y la dureza.

Las modificaciones mencionadas se vieron intensificadas para reemplazos de 30%. A niveles de reemplazo tan elevados, los gránulos de HM actuaron como relleno de la matriz, obstaculizando la correcta formación de la red de gluten. El aumento en el comportamiento elástico se debería entonces a la obtención de una matriz más compacta y rellena, mientras que el aumento en la componente viscosa se asociaría a fenómenos de disipación de energía por rozamiento excesivo entre las numerosas partículas de almidón.

En todos los casos estudiados, las formulaciones dieron lugar a la obtención de masas de adecuadas características tecnológicas, siendo estas fácilmente manejables en todas las etapas del proceso de panificación. Sin embargo, la incorporación de HM produjo una disminución en la eficiencia del proceso de levado, dando lugar a incrementos de volumen menores y más lentos.

Los panificados HM10 y HM20 exhibieron una calidad tecnológica similar a la formulación sin almidón resistente en relación al volumen específico, y a la textura y la porosidad de la miga. Además, la aceptabilidad sensorial del pan HM20 fue buena y no mostró diferencias respecto al pan control. Por el contrario, HM30 presentó una disminución importante en su volumen específico y en la calidad textural y alveolar de su miga.

La utilización de HM produjo cambios en los fenómenos que acontecen en la miga de pan durante su almacenamiento. El estudio de la cinética de la pérdida de humedad, la retrogradación de la amilopectina y la textura de la miga permitió determinar, por un lado, la influencia que la pérdida de agua tiene sobre los otros dos fenómenos, limitándolos o favoreciéndolos según el caso; y por el otro, el rol de las propiedades mecánicas de la miga en el aumento de la dureza.

La utilización de HM produjo una disminución en la velocidad de migración del agua de la miga debido al aumento de la tortuosidad en la misma, probablemente por una capacidad de retención adicional generada por la presencia de los gránulos de HM. La mayor lentitud de migración de agua en estos panes dio lugar a una retrogradación más elevada debido a la mayor cantidad de agua disponible durante los primeros días de almacenamiento. Los panes con 10 y 20% de reemplazo mostraron un aumento de la dureza durante el almacenamiento similar al control. Sin embargo, en HM30 este fenómeno se encontró intensificado, lo cual fue asociado a un efecto combinado entre los procesos antes mencionados y las propiedades mecánicas distintivas de la miga de esta formulación.

La digestibilidad in-vitro de almidón disminuyó marcadamente en todas los panificados con HM tanto en la extensión de la hidrólisis como en su velocidad. Respecto al control, los panificados con 10 y 20% de reemplazo presentaron índices glucémicos estimados notablemente disminuidos (88,6 y 76,7%, respectivamente), siendo HM30 la formulación con el menor *IG* estimado (66,5%).

Se emplearon celulosas modificadas para mejorar la calidad tecnológica del pan HM30. La incorporación en forma independiente de HPMC y CMC en concentraciones de 1 y 1,5% permitió obtener masas con un mejor balance viscoelástico debido a un efecto de disminución de la componente elástica. El análisis microestructural reveló la presencia de una red de gluten más desarrollada y entrecruzada que la exhibida por la formulación sin aditivos.

Los efectos de la incorporación de HPMC y CMC fueron principalmente dependientes de la concentración empleada tanto en las características de las masas como de los panes, encontrándose que el tipo de celulosa modificada no tuvo una influencia importante en las mismas. En general, los efectos positivos del empleo de estos hidrocoloides fueron mayores cuando se incorporaron a un nivel de 1,5%.

La mejora de las características reológicas y microestructurales de las masas con 30% de reemplazo elaboradas con hidrocoloides se reflejaron en un levado más eficiente durante la fermentación, facilitando la expansión y permitiendo alcanzar incrementos mayores de volumen en menos tiempo. Respecto al pan HM30 sin aditivos, los panificados resultantes mostraron un notable aumento en su volumen específico y disminuciones marcadas en los parámetros texturales relacionados a la firmeza de la miga. El análisis alveolar indicó una mejora en la distribución de los tamaños alveolares, los cuales fueron mayores. Además, la incorporación de los hidrocoloides logró atenuar los efectos negativos que el almacenamiento tuvo sobre la textura del pan.

#### Obtención de almidón resistente tipo III a partir de almidón de trigo nativo

La obtención de almidones retrogradados a base de almidón de trigo se realizó a través de distintas modificaciones. El tratamiento de una suspensión gelatinizada de almidón (10% p/p) con pululanasa (20 ASPU/g de almidón) durante 6 hs a 59 °C, seguido de 4 ciclos de calentamiento (121 °C – 30 min) y enfriamiento (0 o 4 °C – 24 hs), fue el más efectivo al momento de obtener almidones ricos en fracción retrogradada, tal como lo demostraron los ensayos de DSC y rayos-X. Estos productos fueron, además, marcadamente resistentes a la digestión enzimática con  $\alpha$ -amilasas, dando *IG* estimados in-vitro de 34%. La baja digestibilidad de estos almidones se atribuyó al elevado grado de retrogradación y a su microestructura compacta.

Capítulo 9 **Bibliografía** 

## Capítulo 9: Bibliografía

AACC International. (2000a). Farinograph method for flour 54-21.01. In *AACC International approved methods* (pp. 1–7). AACC International.

AACC International. (2000b). Solvent Retention Capacity Profile 56-11.02. In *AACC International approved methods* (pp. 1–2). AACC International.

AACC International. (2000c). Wet Gluten, Dry Gluten, Water-Binding Capacity, and Gluten Index 38-12.02. In *AACC International approved methods* (pp. 1–5). AACC International.

Abedi, E., Majzoobi, M., Farahnaky, A., Pourmohammadi, K., y Mahmoudi, M. R. (2018).Effect of ionic strength (NaCl and CaCl2) on functional, textural and electrophoreticproperties of native and acetylated gluten, gliadin and glutenin. International Journal ofBiologicalMacromolecules,120,2035–2047.https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.155

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Disposición 7730/2011 - Créase la Comisión Evaluadora para la autorización de Declaraciones de Propiedades Saludables de Alimentos (2011). Buenos Aires, Argentina. Desde: http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/190064/norma.htm

Ahmed, J., Almusallam, A. S., Al-Salman, F., AbdulRahman, M. H., y Al-Salem, E. (2013). Rheological properties of water insoluble date fiber incorporated wheat flour dough. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(2), 409–416. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.018

Akbarian, M., Koocheki, A., Mohebbi, M., y Milani, E. (2016). Rheological properties and bread quality of frozen sweet dough with added xanthan and different freezing rate. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(10), 3761–3769. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2361-2

Åkerberg, A., Liljeberg, H., y Björck, I. (1998). Effects of Amylose/Amylopectin Ratio and

Baking Conditions on Resistant Starch Formation and Glycaemic Indices. *Journal of Cereal Science*, *28*(1), 71–80. https://doi.org/10.1006/jcrs.1997.0173

Alimentos Argentinos. (2013). Ficha 17: Alimentos Funcionales. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Agricultiura, Ganadería y Pesca.

Amaral, O., Guerreiro, C. S., Gomes, A., y Cravo, M. (2016). Resistant starch production in wheat bread: effect of ingredients, baking conditions and storage. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1747–1753. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2674-4

Ambigaipalan, P., Hoover, R., Donner, E., y Liu, Q. (2013). Retrogradation characteristics of pulse starches. *Food Research International*, *54*(1), 203–212. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.012

Amigo, J. M., Del Olmo Alvarez, A., Engelsen, M. M., Lundkvist, H., Engelsen, S. B., Manuel,J., ... Lundkvist, H. (2016). Staling of white wheat bread crumb and effect ofmaltogenic α-amylases. Part 1: Spatial distribution and kinetic modeling of hardnessandresilience.FoodChemistry,208,318–325.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.162

Amini Khoozani, A., Birch, J., y Bekhit, A. E.-D. A. (2019). Resistant Starch Preparation Methods. In L. Melton, F. Shahidi, y P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 390–394). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22491-8

Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ... Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, *67*(4), 188–205. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x

Angioloni, A., y Collar, C. (2009). Gel, dough and fibre enriched fresh breads: Relationships between quality features and staling kinetics. *Journal of Food Engineering*, *91*(4), 526–532. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.033

Angioloni, A., y Collar, C. (2011). Physicochemical and nutritional properties of reducedcaloric density high-fibre breads. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(3), 747–758. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.008 Aparicio-Saguilán, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., García-Suárez, F., Gutiérrez-Meraz, F., y Bello-Pérez, L. a. (2005). Resistant Starch-rich Powders Prepared by Autoclaving of Native and Lintnerized Banana Starch: Partial Characterization. *Starch - Stärke*, *57*(9), 405–412. https://doi.org/10.1002/star.200400386

Aravind, N., Sissons, M., Fellows, C. M., Blazek, J., y Gilbert, E. P. (2013). Optimisation of resistant starch II and III levels in durum wheat pasta to reduce in vitro digestibility while maintaining processing and sensory characteristics. *Food Chemistry*, *136*(2), 1100–1109. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.035

Araya, H., Contreras, P., Alviña, M., Vera, G., y Pak, N. (2002). A comparison between an in vitro method to determine carbohydrate digestion rate and the glycemic response in young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*(8), 735–739. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601386

Ares, G., y Gámbaro, A. (2007). Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 49(1), 148–158. https://doi.org/10.1016/j.appet.2007.01.006

Armero, E., y Collar, C. (1996a). Antistaling additive effects on fresh wheat bread quality. *Food Science and Technology International*, *2*(5), 323–333.

Armero, E., y Collar, C. (1996b). Antistaling Additives, Flour Type and Sourdough Process Effects on Functionality of Wheat Doughs. *Journal of Food Science*, *61*(2), 299– 303. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14180.x

Armero, E., y Collar, C. (1997). Texture properties of formulated wheat doughs: Relationships with dough and bread technological quality. *Zeitschrift Fur Lebensmittel* -*Untersuchung Und -Forschung*, *204*(2), 136–145.

Arp, C. G., Correa, M. J., Zuleta, Á., y Ferrero, C. (2017). Techno-functional properties of wheat flour-resistant starch mixtures applied to breadmaking. *International Journal of Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1111/ijfs.13311

Asp, N. G. (1992). Resistant Starch. In Proceedings from the second plenary meeting of

*EURESTA: European FLAIR Concerted Action, on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. Preface.* Preface. European Journal of Clinical Nutrition 46: S1.

Atkinson, F. S., Foster-Powell, K., y Brand-Miller, J. C. (2008). International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values: 2008. *Diabetes Care*, *31*(12), 2281–2283. https://doi.org/10.2337/dc08-1239.J.B.M.

Attenburrow, G. E., Goodband, R. M., Taylor, L. J., y Lillford, P. J. (1989). Structure, mechanics and texture of a food sponge. *Journal of Cereal Science*, 9(1), 61–70. https://doi.org/10.1016/S0733-5210(89)80024-4

Augustin, L. S., Franceschi, S., Jenkins, D. J., Kendall, C. W., y La Vecchia, C. (2002). Glycemic index in chronic disease: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, *56*, 1049–1071.

Baixauli, R., Salvador, A., Hough, G., y Fiszman, S. M. (2008). How information about fibre (traditional and resistant starch) influences consumer acceptance of muffins. *Food Quality* and *Preference*, *19*(7), 628–635. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.05.002

Baixauli, R., Sanz, T., Salvador, A., y Fiszman, S. M. (2008). Muffins with resistant starch: Baking performance in relation to the rheological properties of the batter. *Journal of Cereal Science*, *47*(3), 502–509. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.015

Barak, S., Mudgil, D., y Khatkar, B. S. (2013). Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(1), 211–217. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.011

Bárcenas, M. E., Benedito, C., y Rosell, C. M. (2004). Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. *Food Hydrocolloids*, *18*, 769–774. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.12.003

Bárcenas, M. E., y Rosell, C. M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure , quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, *19*, 1037–1043.

#### https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.005

Barros, J. H. T., Telis, V. R. N., Taboga, S., y Franco, C. M. L. (2018). Resistant starch: effect on rheology, quality, and staling rate of white wheat bread. *Journal of Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3393-6

Belton, P. S. (1999). Mini Review: On the Elasticity of Wheat Gluten. *Journal of Cereal Science*, *29*(2), 103–107. https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0227

Belton, P. S. (2003). The molecular basis of dough rheology. In *Bread making - Improving quality* (1st ed.). (Cauvain, S. P. Ed.). Boca Raton: Woodhead Publishing. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9781855737129.2.500

BeMiller, J. N., y Whistler, R. (2009). *Starch: Chemistry and Technology*. (J. N. BeMiller y W. Roy, Eds.) (3rd ed.). New York: Elsevier Inc.

Berry, C. S. (1986). Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, *4*(4), 301–314. https://doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80034-0

Bertoft, E. (2013). On the building block and backbone concepts of amylopectin structure. *Cereal Chemistry*, *90*(4), 294–311. https://doi.org/10.1094/CCHEM-01-13-0004-FI

Bettge, A. D., y Morris, C. F. (2000). Relationships among grain hardness, pentosan fractions, and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry*, *77*(2), 241–247. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.2.241

Bigne, F., Puppo, M. C., y Ferrero, C. (2016). Rheological and Microstructure Characterization of Composite Dough with Wheat and Mesquite (Prosopis spp) Flours. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 243–256. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020435

Blanco Canalis, M. S., León, A. E., y Ribotta, P. D. (2019). Incorporation of dietary fiber on the cookie dough. Effects on thermal properties and water availability. *Food* 

*Chemistry*, 271(Julio 2018), 309–317. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.146

Bonfil, D. J., Abbo, S., y Svoray, T. (2015). Sowing date and wheat quality as determinedbyglutenindex.CropScience,55(5),2294–2306.https://doi.org/10.2135/cropsci2014.08.0562

Bosmans, G. M., Lagrain, B., Fierens, E., y Delcour, J. A. (2013). The impact of baking time and bread storage temperature on bread crumb properties. *Food Chemistry*, *141*(4), 3301–3308. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.031

Bosmans, G. M., Lagrain, B., Ooms, N., Fierens, E., y Delcour, J. A. (2013). Biopolymer interactions, water dynamics, and bread crumb firming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(19), 4646–4654. https://doi.org/10.1021/jf4010466

Brand-Miller, J. C. (2003). Glycemic load and chronic disease. *Nutrition Reviews*, *61*, S49–S55.

Brumovsky, L. A., Brumovsky, J. O., Fretes, M. R., y Peralta, J. M. (2009). Quantification of resistant starch in several starch sources treated thermally. *International Journal of Food Properties*, *12*(3), 451–460. https://doi.org/10.1080/10942910701867673

Buera, M. P., Retriella, C., y Lozano, R. D. (1985). Definition of colour in the nonenzymatic browning. *Die Farbe*, *33*, 316–326.

Burkhart, H. E., y Tomé, M. (2012). *Modeling Forest Trees and Stands*. (H. E. Burkhart y M. Tomé, Eds.) (1st ed., Vol. 118). London: Springer Science + Business Media Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3170-9

Burton, P. M., Monro, J. A., Alvarez, L., y Gallagher, E. (2011). Glycemic impact and health: New horizons in white bread formulations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(10), 965–982. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.491584

Bustos, M. C., Perez, G. T., y León, A. E. (2011). Sensory and nutritional attributes of fibreenriched pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 44(6), 1429–1434. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.002 Cai, L., Shi, Y.-C., Rong, L., y Hsiao, B. S. (2010). Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers*, *81*(2), 385–393. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.036

Cai, L., y Shi, Y. C. (2014). Preparation, structure, and digestibility of crystalline A- and B-type aggregates from debranched waxy starches. *Carbohydrate Polymers*, *105*(1), 341–350. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.075

Cámpora, C. M. (2016). Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(2), 131–137. Retrieved from http://ria.inta.gob.ar/sites/default/files/numeros/ria-vol42-n2-agosto-2016-web.pdf

Carr, N. O., Daniels, N. W. R., y Frazier, P. J. (1992). Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *31*(3), 237–258. https://doi.org/10.1080/10408399209527571

Carrillo, E., Varela, P., y Fiszman, S. (2012). Effects of food package information and sensory characteristics on the perception of healthiness and the acceptability of enriched biscuits. *Food Research International*, *48*(1), 209–216. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.016

Cauvain, S. P. (2012). *Breadmaking: Improving quality*. (S. P. Cauvain, Ed.) (2nd ed.). Cambridge: Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857095695

Cauvain, S. P. (2015). *Technology of breadmaking*. (S. P. Cauvain, Ed.), *Technology of Breadmaking* (3rd ed.). London: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14687-4

Cauvain, S. P., y Young, L. S. (2007). *Technology of Breadmaking*, 1–397. https://doi.org/10.1007/0-387-38565-7

Cauvain, S. P., y Young, L. S. (2008). *Bakery Food Manufacture and Quality - Water Control and Effects*. (S. P. Cauvain y L. S. Young, Eds.) (2nd ed.). Buckinghamshire: Wiley-Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781444301083

Chaudhary, D. P., Kumar, S., y Langyan, S. (2014). Maize: Nutrition Dynamics and Novel

*Uses*. (D. P. Chaudhary, S. Kumar, y S. Langyan, Eds.) (1st ed.). New Delhi: Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1623-0

Chen, Y. T., Shiau, S. Y., y Fu, J. T. (2016). Physicochemical Properties of Dough and Steamed Bread Made from Regular and Whole Wheat Flour. *International Journal of Food Engineering*, *12*(4), 411–419. https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0041

Chinachoti, P. (1995). Carbohydrates: functionality in foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *61*(4 Suppl), 922S–929S. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900690

Christianson, D. D. (1982). Hydrocolloid interactions with starches. In D. R. Lineback y G. E. Inglett (Eds.), *Food Carbohydrates* (pp. 339–419). Connecticut: AVI Publishing Company, Inc.

Chung, H.-J., Jeong, H.-Y., y Lim, S.-T. (2003). Effects of acid hydrolysis and defatting on crystallinity and pasting properties of freeze-thawed high amylose corn starch. *Carbohydrate Polymers*, *54*(4), 449–455. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.05.001

Claxton, N. S., Fellers, T. J., y Davidson, M. W. (2006). Laser Scanning Confocal Microscopy. *Encylopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 1979(21), 4–37. Retrieved from

https://www.ucc.ie/en/media/academic/anatomy/imagingcentre/imagegallery/conf ocalgallery/Laser-Scanning-Confocal-Microscopy-Introduction.pdf

Código Alimentario Argentino. (2018a). Capítulo IX. Alimentos farináceos - Cereales, Harinas y Derivados. In *Código Alimentario Argentino*. ANMAT - Ministerio de Salud y Desarrollo Social.

Código Alimentario Argentino. (2018b). Capítulo IX. Alimentos farináceos - Cereales, Harinas y Derivados. In *Código Alimentario Argentino*. ANMAT - Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Retrieved from http://www.en.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/livros/CAP9.pdf

Cook, J. G. (1984). Handbook of Textile Fibres: Volume I: Natural Fibres. In *Handbook of* 306

*Textile Fibres: Volume I: Natural Fibres* (5th ed., p. 208). Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited. https://doi.org/10.1533/9781855737532.19

Cornish, G. B., Békés, F., Allen, H. M., y Martin, D. J. (2001). Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*, *52*(12), 1339–1348.

Correa, M. J., Añón, M. C., Pérez, G. T., y Ferrero, C. (2010). Effect of modified celluloses on dough rheology and microstructure. *Food Research International*, *43*(3), 780–787. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.016

Correa, M. J., Ferrer, E., Añón, M. C., y Ferrero, C. (2014). Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins. *Food Hydrocolloids*, *35*(0), 91–99. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.020

Correa, M. J., y Ferrero, C. (2015). A Comparative Study of Commercial Modified Celluloses as Bread Making Additives. *International Journal of Food Properties*, *18*(4), 849–861. https://doi.org/10.1080/10942912.2013.869598

Correa, M. J., y Ferrero, C. (2015). Thermal behaviour of wheat starch and flour at different water levels: Effect of pectins, modified celluloses and NaCl. *Starch/Staerke*, *67*, 338–347. https://doi.org/10.1002/star.201400116

Correa, M. J., Ferrero, C., y Pérez, G. T. (2012). *Efecto de celulosas modificadas y pectinas sobre la microestructura y atributos de calidad de la masa panaria*. Universidad Nacional de La Plata.

Curti, E., Carini, E., Tribuzio, G., y Vittadini, E. (2014). Bread staling: Effect of gluten on physico-chemical properties and molecular mobility. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 418–425. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.057

Damager, I., Engelsen, S. B., Blennow, A., Lindberg Møller, B., y Motawia, M. S. (2010). First principles insight into the  $\alpha$ -glucan structures of starch: Their synthesis, conformation, and hydration. *Chemical Reviews*, *110*(4), 2049–2080. https://doi.org/10.1021/cr900227t

Davidou, S., Le Meste, M., Debever, E., y Bekaert, D. (1996). A contribution to the study of staling of white bread: Effect of water and hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, *10*(4), 375–383. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(96)80016-6

Dhingra, S., y Jood, S. (2004). Effect of flour blending on functional, baking and organoleptic characteristics of bread. *International Journal of Food Science and Technology*, *39*(2), 213–222. https://doi.org/10.1046/j.0950-5423.2003.00766.x

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzales, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2018). InfoStat. Córdoba, Argentina: Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cördoba. Retrieved from http://www.infostat.com.ar

Dodić, J., Pejin, D., Dodić, S., Popov, S., Mastilović, J., Popov-Raljić, J., y Zivanovic, S. (2007). Effects of Hydrophilic Hydrocolloids on Dough and Bread Performance of Samples Made from Frozen Doughs. *Journal of Food Science*, *72*(4), S235–S241. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00337.x

Dundar, A. N., y Gocmen, D. (2013). Effects of autoclaving temperature and storing time on resistant starch formation and its functional and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 764–771. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.083

Ebbeling, C. B., Leidig, M. M., Sinclair, K. B., Seger-Shippee, L. G., Feldman, H. A., y Ludwig, D. S. (2005). Effects of an ad libitum low-glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(5), 976–982. https://doi.org/10.1093/ajcn/81.5.976

Edwards, W. (2007). *The Science of Bakery Products*. https://doi.org/10.1039/9781847557797

Eerlingen, R. C., Broeck, I. VAN DEN, Delcour, J. A., Slade, L., y Levine, H. (1994). Enzyme-Resistant Starch. VI. Influence of Sugars on Resistant Starch Formation. *Cereal Chem*, 71(5), 472–476. Retrieved from http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1994/Documents/71\_472.pdf Eerlingen, R. C., Cillen, G., y Delcour, J. A. (1994). Enzyme-Resistant Starch. IV. Effect of Endogenous Lipids and Added Sodium Dodecyl Sulfate on Formation of Resistant Starch. *Cereal Chem*, *71*(2), 170–177.

Eerlingen, R. C., Crombez, M., y Delcour, J. A. (1993). Enzyme-Resistant Starch. I. Quantitative and Qualtitative Influence of Incubation Time and Temperature of Autoclaved Starch on Resistant Starch Formation. *Cereal Chem*, *70*(3), 339–344.

Eerlingen, R. C., Deceuninck, M., y Delcour, J. (1993). Enzyme-Resistant Starch. II. Influence of Amylose Chain Length on Resistant Starch Formation. *Cereal Chem*, *70*(3), 345–350. Retrieved from http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1993/Documents/70\_345.pdf

Eerlingen, R. C., y Delcour, J. A. (1995). Formation, Analysis, Structure and Properties of Type III Enzyme Resistant Starch. *Journal of Cereal Science*, *22*(2), 129–138. https://doi.org/10.1016/0733-5210(95)90042-X

Eliasson, A. (1980). Effect of Water Content on the Gelatinization of Wheat Starch. *Starch - Stärke*, *32*(8), 270–272. https://doi.org/10.1002/star.19800320806

Englyst, H. N., y Cummings, J. H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, *42*(5), 778–787. https://doi.org/10.1093/ajcn/42.5.778

Englyst, H. N., Kingman, S. M., y Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions.pdf. *European Journal of Clinical Nutrition*, *46*(Suppl. 2), S33–S50.

Englyst, H. N., Wiggins, H. S., y Cummings, J. H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas - Liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *The Analyst, 107*(1272), 307–318. https://doi.org/10.1039/AN9820700307

Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., y Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: An in vitro measurement that reflects the glycemic response. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448–454.

https://doi.org/https://academic.oup.com/ajcn/article/69/3/448/4694167

Escarpa, A., González, M. C., Morales, M. D., y Saura-Calixto, F. (1997). An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. *Food Chemistry*, *60*(4), 527–532. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00025-3

Evans, I. D. D., y Haisman, D. R. R. (1982). The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch - Stärke*, *34*(7), 224–231. https://doi.org/10.1002/star.19820340704

Ewart, J. A. D. (1972a). A Modified Hypothesis for the Structure and Rheology of Glutelins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *23*, 687–699.

Ewart, J. A. D. (1972b). Further Studies on SS Bonds in Cereal Glutelins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *23*, 567–579.

Ewart, J. A. D. (1989). Hypothesis for How Linear Glutenin Holds Gas in Dough. *Food Chemistry*, *32*, 135–150.

Eyhérabide, G. H., Giorda, L. M., Livore, A. B., Nisi, J., y Tomaso, J. C. (2009). *Programa nacional cereales - Documento Base*. Argentina.

Fardet, A., Leenhardt, F., Lioger, D., Scalbert, A., y Rémésy, C. (2006). Parameters controlling the glycaemic response to breads. *Nutrition Research Reviews*, *19*, 18–25. https://doi.org/10.1079/NRR2006118

Figueroa, J. D. C., Manuel, C. I., Hernández-Estrada, Z. J., y Ramírez-Wong, B. (2012). Stress relaxation of wheat kernels and their relationship with milling, rheological, and breadmaking quality of wheat. *Cereal Chemistry*, *89*(4), 211–216. https://doi.org/10.1094/CCHEM-12-11-0144

Foster-Powell, K., Holt, S. H., y Brand-Miller, J. C. (2002). International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *76*(1), 5–56. https://doi.org/10.1093/ajcn/76.1.5

Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.-C., y Åman, P. (1998). The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and

retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, *35*(3–4), 119–134. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00247-6

Fu, L., Tian, J., Sun, C., y Li, C. (2008). RVA and Farinograph Properties Study on Blends of Resistant Starch and Wheat Flour. *Agricultural Sciences in China*, *7*(7), 812–822. https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60118-2

Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J. J., Sánchez-Zapata, E., y Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, *43*(4), 931–942. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.004

Gao, L., Ng, P. K. W., y Bushuk, W. (1992). Structure of Glutenin Based on Farinograph and Electrophoretic Results. *Cereal Chem*, *69*(4), 452–455.

Gargari, B. P., Namazi, N., Khalili, M., Sarmadi, B., Jafarabadi, M. A., y Dehghan, P. (2015). Is there any place for resistant starch, as alimentary prebiotic, for patients with type 2 diabetes? *Complementary Therapies in Medicine*, *23*(6), 810–815. https://doi.org/10.1016/j.ctim.2015.09.005

Gelders, G. G., Duyck, J. P., Goesaert, H., y Delcour, J. A. (2005). Enzyme and acid resistance of amylose-lipid complexes differing in amylose chain length, lipid and complexation temperature. *Carbohydrate Polymers*, *60*(3), 379–389. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.008

Genovese, D. B. (2012). Shear rheology of hard-sphere, dispersed, and aggregated suspensions, and filler-matrix composites. *Advances in Colloid and Interface Science*, *171–172*, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.12.005

Ghiasi, K., Hoseney, R. C., y Varriano-Martson, E. (1982). Gelatinisation of Wheat Starch. III. Comparison by Differential Scanning Calorimetry and Light Microscopy. *Cereal Chem*, *59*(4), 258–262.

Giannone, V., Lauro, M. R., Spina, A., Pasqualone, A., Auditore, L., Puglisi, I., y Puglisi, G. (2016). A novel  $\alpha$ -amylase-lipase formulation as anti-staling agent in durum wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 381–389.

#### https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.020

Gómez Pallarés, M., Tadini, C. C., Pérez, G. T., (2009). Elaboración de productos de panificación especialmente formulados. In *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados*. (P. D. Ribotta y C. C. Tadini, Eds.) (1ra ed.). Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/230820510\_Procesos\_de\_obtencin\_de\_hari na\_de\_maz\_no-nixtamalizada\_y\_sus\_usos/file/9fcfd504fa3340f548.pdf

González-Soto, R. A., Mora-Escobedo, R., Hernández-Sánchez, H., Sánchez-Rivera, M., y Bello-Pérez, L. A. (2007). The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food Research International*, *40*(2), 304–310. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.001

Goñi, I., Garcia-Alonso, A., y Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, *17*(3), 427–437. https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00010-9

Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W. J., Marseille, J. P., Moonen, J. H. E., y Scheepstra, A. (1985). A Model for the Molecular Structure of the Glutenins from Wheat Flour. *Journal of Cereal Science*, *3*, 1–16.

Gray, J. A., y Bemiller, J. N. (2003). Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *2*(1), 1–21. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00011.x

Grunert, K. G. (2010). European consumers' acceptance of functional foods. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1190,* 166–173. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05260.x

Guarda, A., Rosell, C. ., Benedito, C., y Galotto, M. . (2004). Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. *Food Hydrocolloids*, *18*(2), 241–247. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00080-8

Gunaratne, A., y Hoover, R. (2002). Effect of heat-moisture treatment on the structure

and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 425–437. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00354-X

Hallström, E., Sestili, F., Lafiandra, D., Björck, I., y Östman, E. (2011). A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food y Nutrition Research*, *55*(00). https://doi.org/10.3402/fnr.v55i0.7074

Hammed, A. M., Ozsisli, B., Ohm, J.-B., y Simsek, S. (2015). Relationship Between Solvent Retention Capacity and Protein Molecular Weight Distribution, Quality Characteristics, and Breadmaking Functionality of Hard Red Spring Wheat Flour. *Cereal Chemistry Journal*, *92*(5), 466–474. https://doi.org/10.1094/CCHEM-12-14-0262-R

Han, H. M., y Koh, B.-K. (2011). Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2495–2499. https://doi.org/10.1002/jsfa.4499

Haralampu, S. . G. (2000). Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate Polymers*, *41*(3), 285–292. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00147-2

Hare-Bruun, H., Flint, A., y Heitmann, B. L. (2006). Glycemic index and glycemic load in relation to changes in body weight, body fat distribution, and body composition in adult Danes. *American Journal of Clinical Nutrition, 84*, 871–879. https://doi.org/84/4/871 [pii]

Hedayati, S., Majzoobi, M., y Farahnaky, A. (2018). Batter Rheology and Quality of Sponge Cake Enriched with High Percentage of Resistant Starch (Hi-maize). *International Journal of Food Engineering*, *14*(5–6), 1–10. https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0293

Hemdane, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J. A., y Courtin, C. M. (2016). Wheat (Triticum aestivum L.) Bran in Bread Making: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 28–42. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12176 Hidalgo, A., y Brandolini, A. (2011). Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flours. *Journal of Cereal Science*, *54*(1), 90–97. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.05.002

Hodge, A. M., English, D. R., O'Dea, K., y Giles, G. G. (2004). Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *27*(11), 2701–2706. https://doi.org/10.2337/diacare.27.11.2701

Holtzapple, M. T. (2003). CELLULOSE. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 998–1007). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00185-1

Homayouni, A., Amini, A., Keshtiban, A. K., Mortazavian, A. M., Esazadeh, K., y Pourmoradian, S. (2014). Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch - Stärke*, *66*(1–2), 102–114. https://doi.org/10.1002/star.201300110

Hoover, R. (1995). Starch retrogradation. *Food Reviews International*, *11*(2), 331–346. https://doi.org/10.1080/87559129509541044

Hsia, C. C., y Anderson, O. D. (2001). Isolation and characterization of wheat  $\omega$ -gliadin genes. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*, 37–44.

Ishwarya, S. P., Desai, K. M., Naladala, S., y Anandharamakrishnan, C. (2017). Braninduced effects on the evolution of bubbles and rheological properties in bread dough. *Journal of Texture Studies*, *48*(5), 415–426. https://doi.org/10.1111/jtxs.12244

Jekle, M., y Becker, T. (2015). Wheat Dough Microstructure: The Relation Between Visual Structure and Mechanical Behavior. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(3), 369–382. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.656476

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., ... Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *34*(3), 362–366. https://doi.org/10.1093/ajcn/34.3.362

Jian, Z., y Hejing, W. (2003). The physical meanings of 5 basic parameters for an X-ray

diffraction peak and their application. *Chinese Journal of Geochemistry*, 22(1), 38–44. https://doi.org/10.1007/BF02831544

Juansang, J., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Puncha-arnon, S., y Uttapap, D. (2012). Effect of gelatinisation on slowly digestible starch and resistant starch of heat-moisture treated and chemically modified canna starches. *Food Chemistry*, *131*(2), 500–507. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.013

Juárez Iglesias, M., y Perote Alejandre, A. (2010). *Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales*. (M. Juárez Iglesias y A. Perote Alejandre, Eds.) (1ra ed.). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la Nutrición y la Salud.

Kalentunc, G., y Breslauer, K. J. (2003). *Characterization of Cereals and Flours -Properties, Analysis, and Applications*. (G. Kalentunc y K. J. Breslauer, Eds.) (1st ed.). New York: Marcel Dekker. https://doi.org/10.1201/9780203911785

Kapelko, M., Zięba, T., Golachowski, A., y Gryszkin, A. (2012). Effect of the production method on the properties of RS3/RS4 type resistant starch. Part 1: properties of retrograded starch (RS3) produced under various conditions and its susceptibility to acetylation. *Food Chemistry*, *135*(3), 1494–1504. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.030

Karimi, P., Farhangi, M. A., Sarmadi, B., Gargari, B. P., Zare Javid, A., Pouraghaei, M., y Dehghan, P. (2016). The Therapeutic Potential of Resistant Starch in Modulation of Insulin Resistance, Endotoxemia, Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Women with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 68(2), 85–93. https://doi.org/10.1159/000441683

Kasarda, D. D. (1989). Glutenin structure in relation to wheat quality. In Y. Pomeranz (Ed.), *Wheat is unique* (pp. 277–302). St. Paul: American Association of Cereal Chemists.

Kasarda, D. D., Bernardin, J. E., y Nimmo, C. C. (1976). Wheat proteins. In Y. Pomeranz (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology, Vol. 1*. St. Paul: American Association of Cereal Chemists.

Keenan, M. J., Zhou, J., McCutcheon, K. L., Raggio, A. M., Bateman, H. G., Todd, E., ... Hegsted, M. (2006). Effects of resistant starch, a non-digestible fermentable fiber, on reducing body fat. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *14*(9), 1523–1534. https://doi.org/10.1038/oby.2006.176

Khan, K., y Bushuk, W. (1977). Studies of glutenin. IX. Subunit composition by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 7.3 and 8.9. *Cereal Chem*, *54*, 588.

Khan, K., y Bushuk, W. (1979a). Studies of glutenin. XII. Comparison by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chem*, *56*, 63.

Khan, K., y Bushuk, W. (1979b). Studies of glutenin. XIII. Gel filtration, isoelectric focusin, and amino acid composition studies. *Cereal Chem*, *56*, 505.

Khan, K., y Shewry, P. R. (2009). *Wheat - Chemistry and Technology*. (K. Khan y P. R. Shewry, Eds.) (4th ed.). Minnesota: AACC International.

Kohyama, K., Matsuki, J., Yasui, T., y Sasaki, T. (2004). A differential thermal analysis of the gelatinization and retrogradation of wheat starches with different amylopectin chain lengths. *Carbohydrate Polymers*, *58*(1), 71–77. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.06.032

Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R., y Juszczak, L. (2009). The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 988–995. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.010

Kovrlija, R., y Rondeau-Mouro, C. (2017). Hydrothermal Changes of Starch Monitored by Combined NMR and DSC Methods. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(3), 445–461. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1832-9

Kurek, M. A., Wyrwisz, J., y Wierzbicka, A. (2017). Optimization of beta-glucan and water content in fortified wheat bread using Response Surface Methodology according to staling kinetics. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 352–357. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.008

Kusnadi, D. T. L., Barclay, A. W., Brand-Miller, J. C., y Louie, J. C. Y. (2017). Changes in dietary glycemic index and glycemic load in Australian adults from 1995 to 2012. *American Journal of Clinical Nutrition*, *106*(1), 189–198. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.150516

Kweon, M., Slade, L., y Levine, H. (2011). Solvent Retention Capacity (SRC) Testing of Wheat Flour: Principles and Value in Predicting Flour Functionality in Different Wheat-Based Food Processes and in Wheat Breeding—A Review. *Cereal Chemistry Journal*, *88*(6), 537–552. https://doi.org/10.1094/CCHEM-07-11-0092

Lai, H.-M., y Lin, T.-C. (2007). *Bakery Products: Science and Technology*. (Y. Hui, Ed.), *Bakery Products: Science and Technology* (First). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional. https://doi.org/10.1002/9780470277553

Laurentin, A., y Edwards, C. A. (2013). Resistant starch and oligosaccharides. *Encyclopedia of Human Nutrition*, *2*, 246–253. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00109-4

Leal, M., Guagliano, M. L., y Sanchez Rico, A. P. (2016). *Estudios Panorámicos de Vigilancia Tecnológica e Inteligencia Competitiva: Alimentos Funcionales*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Retrieved from http://www.mincyt.gob.ar/agenda/alimentos-funcionales-12206

Lee, M.-R., Swanson, B. R., y Baik, B.-K. (2001). Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, *78*(6), 701–706. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.6.701

Lehmann, U., Rössler, C., Schmiedl, D., y Jacobasch, G. (2003). Production and physicochemical characterization of resistant starch type III derived from pea starch. *Die Nahrung*, *47*(1), 60–63. https://doi.org/10.1002/food.200390014

Levitan, E. B., Mittleman, M. A., Håkansson, N., y Wolk, A. (2007). Dietary glycemic index, dietary glycemic load, and cardiovascular disease in middle-aged and older Swedish men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(6), 1521–1526.

https://doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1521

Ley Nacional 25.630. (2002). Argentina.

Lezcano, E. P. (2016). *Cadena de la harina de trigo - Informe de coyuntura*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Lezcano, E. P. (2017). *Harina de trigo - Informe Ejecutivo Noviembre 2017*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Li, L., Wang, Z., Li, L.-M., Zheng, X.-L., Ma, S., y Wang, X.-X. (2018). Effects of Fermented Wheat Bran on Flour, Dough, and Steamed Bread Characteristics. *Journal of Chemistry*, *2018*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2018/1597308

Li, S., Ward, R., y Gao, Q. (2011). Effect of heat-moisture treatment on the formation and physicochemical properties of resistant starch from mung bean (Phaseolus radiatus) starch. *Food Hydrocolloids, 25*(7), 1702–1709. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.009

Liljeberg, H., Åkerberg, A., y Björck, I. (1996). Resistant starch formation in bread as influenced by choice of ingredients or baking conditions. *Food Chemistry*, *56*(4), 389–394. https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00199-9

Lindsay, M. P., y Skerritt, J. H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: Structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, *10*(8), 247–253. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00004-2

Liu, H., Liang, R., Antoniou, J., Liu, F., Shoemaker, C. F., Li, Y., y Zhong, F. (2014). The effect of high moisture heat-acid treatment on the structure and digestion property of normal maize starch. *Food Chemistry*, *159*, 222–229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.162

Liu, H., Ramsden, L., y Corke, H. (1999). Physical properties and enzymatic digestibility of hydroxypropylated ae, wx, and normal maize starch. *Carbohydrate Polymers*, *40*(3), 175–182. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00052-1

Liu, S., Stampfer, M. J., Hu, F. B., Giovanucci, E., Rimm, E., Manson, J. E., ... Willett, W. C.

(1999). Whole grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health study. *American Journal Clinical Nutrition*, *70*(May), 412–419.

Liu, S., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Hu, F. B., Franz, M., Sampson, L., ... Manson, J. E. (2000). A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(6), 1455–1461. https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1455

Mahadevamma, S., Harish Prashanth, K. ., y Tharanathan, R. . (2003). Resistant starch derived from processed legumes—purification and structural characterization. *Carbohydrate Polymers*, *54*(2), 215–219. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00165-6

Mahadevamma, S., y Tharanathan, R. N. (2001). Resistant starch in wheat-based products: Isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*, *34*(1), 73–84. https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0383

Maloney, D. H., y Foy, J. J. (2003). Yeast Fermentations. In K. Kulp y K. Lorenz (Eds.), *Handbook of Dough Fermentations* (1st ed.). New York: Marcel Dekker. https://doi.org/10.1201/9780203911884.ch3

Mangala, S. L., Udayasankar, K., y Tharanathan, R. N. (1999). Resistant starch from processed cereals: the influence of amylopectin and non-carbohydrate constituents in its formation. *Food Chemistry*, *64*(3), 391–396. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00142-3

Margareta Leeman, a., Karlsson, M. E., Eliasson, A.-C., y Björck, I. M. E. (2006). Resistant starch formation in temperature treated potato starches varying in Carbohydrate amylose/amylopectin ratio. Polymers, 65(3), 306-313. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.019

Martin, M. L., Zeleznak, K. J., y Hoseney, R. C. (1991). A Mechanism of Bread Firming. I. Role of Starch Swelling. *Cereal Chem.*, 68(5), 498–503. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2 Martínez, M. M., Román, L., y Gómez, M. (2018). Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust. *Food Chemistry*, *239*, 295–303. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.122

Martínez, M., Oliete, B., y Gómez, M. (2013). Effect of the addition of extruded wheat fl ours on dough rheology and bread quality. *Journal of Cereal Science*, *57*(3), 424–429. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.01.007

Martirosyan, D. M., y Singharaj, B. (2016). Health Claims and Functional Food: The Future of Functional Foods under FDA and EFSA Regulation. In D. M. Martirosyan (Ed.), *Functional Foods for Chronic Diseases. Volume 1* (1st ed., pp. 410–424). San Diego: Food Science Publisher.

McClearly, B. V., y Brown, I. L. (2004). Novel dietary fibers: the importance of carbohydrates in the diet. *Journal of AOAC International*, *87*, 681.

Metakovsky, E. V., Wrigley, C. W., Bekes, F., y Gupta, R. B. (1990). Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, *41*(2), 289–306.

Miao, M., Jiang, B., y Zhang, T. (2009). Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, *76*(2), 214–221. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.007

Miguens, J. (2017). Perspectivas del mercado de trigo. Argentina.

Ministerio de Agroindustria. (2016). *Harina de trigo*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Ministerio de Salud de la Nación. (2017). *Manual para el cuidado de personas con enfermedades crónicas no transmisibles* (1ra ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación. Retrieved from http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/000000989cnt-2017-08-16\_manual-cuidado-integral-personas-adultas.pdf

Montonen, J., Knekt, P., Järvinen, R., Aromaa, A., y Reunanen, A. (2003). Whole-grain and

fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(3), 622–629. https://doi.org/10.1093/ajcn/77.3.622

Morales-Medina, R., Del Mar Muñío, M., Guadix, E. M., y Guadix, A. (2014a). Production of resistant starch by enzymatic debranching in legume flours. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1176–1183. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.027

Morales-Medina, R., Del Mar Muñío, M., Guadix, E. M., y Guadix, A. (2014b). Production of resistant starch by enzymatic debranching in legume flours. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1176–1183. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.027

Mudgil, D., Barak, S., y Khatkar, B. S. (2016). Effect of partially hydrolyzed guar gum on pasting, thermo-mechanical and rheological properties of wheat dough. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 131–135. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.064

Müller, S., y Wieser, H. (1995). The Location of Disulphide Bonds in  $\alpha$ -type Gliadins. *Journal of Cereal Science*, 22, 21–27.

Müller, S., y Wieser, H. (1997). The Location of Disulphide Bonds in Monomeric y-type Gliadins. *Journal of Cereal Science*, *26*, 169–176.

Murray, J. C. F. (2009). Cellulosics. In G. O. Phillips y P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (2nd ed., pp. 710–723). Boca Raton: Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9781845695873.710

Nugent, A. P. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, *30*(1), 27–54. https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x

OMS. (2018). Enfermedades no transmisibles. Retrieved February 1, 2019, from https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases

Onyango, C., Bley, T., Jacob, A., Henle, T., y Rohm, H. (2006). Influence of incubation temperature and time on resistant starch type III formation from autoclaved and acid-hydrolysed cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, *66*(4), 494–499. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.002

Ottenhof, M. -a., y Farhat, I. a. (2004). The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 40(3), 269–274. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.07.002

Öztürk, S., y Köksel, H. (2014). Production and characterisation of resistant starch and its utilisation as food ingredient: a review. *Quality Assurance and Safety of Crops y Foods*, 6(3), 335–346. https://doi.org/10.3920/QAS2013.0367

Ozturk, S., Koksel, H., Kahraman, K., y Ng, P. K. W. (2009). Effect of debranching and heat treatments on formation and functional properties of resistant starch from high-amylose corn starches. *European Food Research and Technology*, *229*(1), 115–125. https://doi.org/10.1007/s00217-009-1032-1

Ozturk, S., Koksel, H., y Ng, P. K. W. (2011). Production of resistant starch from acidmodified amylotype starches with enhanced functional properties. *Journal of Food Engineering*, *103*(2), 156–164. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.011

Park, E. Y., Baik, B.-K., y Lim, S.-T. (2009). Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and in vitro digestibility of waxy maize starch gel. *Journal of Cereal Science*, *50*(1), 43–48. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.02.004

Penn-Marshall, M., Holtzman, G. I., y Barbeau, W. E. (2010). African Americans May Have to Consume More Than 12 Grams a Day of Resistant Starch to Lower Their Risk for Type
2 Diabetes. *Journal of Medicinal Food*, 13(4), 999–1004. https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0195

Pérez Bravo, F. (2009). Epidemiología Y Fisiopatología De La Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista Médica Clínica Las Condes, 20*(5), 565–571.

Pi-Sunyer, F. X. (2002). Glycemic index and disease. *American Journal Clinical Nutrition*, 76(Suppl), 290S–8S. https://doi.org/10.1093/ajcn/76/1.290S

Planchot, V., Colonna, P., y Buleon, A. (1997). Enzymatic hydrolysis of α-glucan crystallites. *Carbohydrate Research*, *298*(4), 319–326. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00317-5
Prosky, L. (2008). Part 3: Measurement of Dietary Fibre and Dietary Fibre Components. In B. McCleary y L. Prosky (Eds.), *Advanced dietary fibre technology*. John Wiley y Sons.

Qi, L., y Hu, F. B. (2007). Dietary glycemic load, whole grains, and systemic inflammation in diabetes: the epidemiological evidence. *Current Opinion in Lipidology*, *18*(1), 3–8. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328011c6e0

Ragaee, S., y Abdel-Aal, E. S. M. (2006). Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, *95*(1), 9–18. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.012

Raigond, P., Ezekiel, R., y Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95*(10), 1968–1978. https://doi.org/10.1002/jsfa.6966

Reddy, C. K., Haripriya, S., Noor Mohamed, A., y Suriya, M. (2014). Preparation and characterization of resistant starch III from elephant foot yam (Amorphophallus paeonifolius) starch. *Food Chemistry*, *155*, 38–44. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.023

Reddy, C. K., Suriya, M., y Haripriya, S. (2013). Physico-chemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (Phaseolus vulgaris.L) starch by enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 220–226. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.060

Ribotta, P. D., Cuffini, S., León, A. E., y Añón, M. C. (2004). The staling of bread: An X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology*, *218*(3), 219–223. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0835-8

Román, L., Dura, Á., Martínez, M. M., Rosell, C. M., y Gómez, M. (2016). Combination ofextrusion and cyclodextrin glucanotransferase treatment to modify wheat floursfunctionality.FoodChemistry,199,287–295.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.040

Ronda, F., Quilez, J., Pando, V., y Roos, Y. H. (2014). Fermentation time and fiber effects

on recrystallization of starch components and staling of bread from frozen part-baked bread. *Journal of Food Engineering*, *131*, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.023

Rosell, C. M., Rojas, J. A., y Benedito de Barber, C. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, *15*, 75–81.

Rueda, M. M., Auscher, M.-C., Fulchiron, R., Périé, T., Martin, G., Sonntag, P., y Cassagnau, P. (2016). Rheology and Applications of Highly Filled Polymers: A review of current understanding. *Progress in Polymer Science*, 66, 22–53. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.007

Sabanis, D., Makri, E., y Doxastakis, G. (2006). Effect of durum flour enrichment with chickpea flour on the characteristics of dough and lasagne. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(12), 1938–1944. https://doi.org/10.1002/jsfa.2567

Sabanis, D., y Tzia, C. (2009). Effect of Rice, Corn and Soy Flour Addition on Characteristics of Bread Produced from Different Wheat Cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, *2*(1), 68–79. https://doi.org/10.1007/s11947-007-0037-7

Salinas, M., Carbas, B., Brites, C., y Puppo, M. (2015). Influence of Different Carob Fruit Flours (Ceratonia siliqua L.) on Wheat Dough Performance and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(7), 1561–1570. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1527-7

Salinas, M. V. (2013). Estudio de la Calidad Panadera, Sensorial y Nutricional de Panes Elaborados con Harina de Trigo Fortificada con Sales de Calcio e Inulina. Univerisad Nacional de La Plata.

Salmerón, J., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Wing, A. L., y Willett, W. C. (1997). Dietary Fiber, Glycemic Load, and Risk of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus in Women. *Journal of the American Medical Association*, *277*(6), 472–477. https://doi.org/10.1001@jama.1997.03540300040031

Santos, E., Rosell, C. M., y Collar, C. (2008). Gelatinization and retrogradation kinetics of high-fiber wheat flour blends: A Calorimetric approach. *Cereal Chemistry*, *85*(4), 455–

### 463. https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-4-0455

Sanz-Penella, J. M., Wronkowska, M., Soral-Smietana, M., Collar, C., y Haros, M. (2010). Impact of the addition of resistant starch from modified pea starch on dough and bread performance. *European Food Research and Technology*, *231*(4), 499–508. https://doi.org/10.1007/s00217-010-1294-7

Scheuer, P. M., de Francisco, A., de Miranda, M. Z., Ogliari, P. J., Torres, G., Limberger, V., ... Biondi, S. (2011). Characterization of Brazilian wheat cultivars for specific technological applications. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *31*(3), 816–826. https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300041

Schulze, M. B., Liu, S., Rimm, E. B., Manson, J. E., Willett, W. C., y Hu, F. B. (2004). Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(2), 348–356. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.348

Secretaría de Políticas Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Resolución Conjunta 229/2011 y 731/2011 - Modificación (2011). Buenos Aires, Argentina. Desde: http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/185000-189999/189995/norma.htm

Secretaría de Políticas Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011 - Modificación (2011). Buenos Aires, Argentina. Desde: http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/192067/norma.htm

Seow, C. C., y Teo, C. H. (1996). Staling of starch-based products: A comparative study by firmness and pulsed NMR measurements. *Starch/Staerke*, *48*(3), 90–93. https://doi.org/10.1002/star.19960480304

Shah, A., Masoodi, F. A., Gani, A., y Ashwar, B. A. (2016). In-vitro digestibility, rheology, structure, and functionality of RS3 from oat starch. *Food Chemistry*, *212*, 749–758. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.019

Shamai, K., Bianco-Peled, H., y Shimoni, E. (2003). Polymorphism of resistant starch type III. *Carbohydrate Polymers*, *54*(3), 363–369. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00192-9

Sheard, N. F., Clark, N. G., Brand-Miller, J. C., Franz, M. J., Pi-Sunyer, F. X., Mayer-Davis, E., ... Geil, P. (2004). Dietary Carbohydrate (Amount and Type) in the Prevention and Management of Diabetes: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, *27*(9), 2266–2271. https://doi.org/10.2337/diacare.27.9.2266

Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiandra, D., y Belton, P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: Findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology*, *11*(12), 433–441. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00035-8

Shewry, P. R., y Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, *25*, 207–227.

Shi, M., Chen, Y., Yu, S., y Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. *Food Hydrocolloids*, *33*(1), 19–25. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.018

Shi, M., y Gao, Q. (2011). Physicochemical properties, structure and in vitro digestion of resistant starch from waxy rice starch. *Carbohydrate Polymers*, *84*(3), 1151–1157. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.004

Silverio, J., Fredriksson, H., Andersson, R., Eliasson, A.-C., y Åman, P. (2000). The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. *Carbohydrate Polymers*, *42*(2), 175–184. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00140-X

Sjöö, M., y Nilsson, L. (2018). *Starch in Food - Structure, Function and Applications*. (M. Sjöö y L. Nilsson, Eds.) (2nd ed.). Cambridge: Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1360/zd-2013-43-6-1064

Slade, L., y Levine, H. (1987). *Industrial polysaccharides: the impact of biotechnology and advanced methodologies*. (S. S. Stivalo, V. Crescenzi, y I. C. M. Dea, Eds.). New York: Gordon and Breach Science Publishers.

Stauffer, C. E. (1990). *Functional Additives for Bakery Foods* (1st ed.). New York: Van Nostrand Reinhold.

Stauffer, C. E. (2007). Principles of dough formation. *Technology of Breadmaking*, (Chapter 11), 299–332. https://doi.org/10.1007/0-387-38565-7\_11

Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering. Agricultural Engineering* (2nd ed.). East Lansing, Michigan, USA: Freeman Press. https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90090-6

Steffen, L. M., Jacobs, D. R. J., Stevens, J., Shahar, E., Carithers, T., y Folsom, A. R. (2003). Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(February), 383–390. Retrieved from http://libezp.lib.lsu.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=tr ueydb=edsagryAN=edsagr.US201301958804ysite=eds-liveyscope=siteyprofile=edsmain

Stokes, D. J., y Donald, A. M. (2000). In situ mechanical testing of dry and hydrated breadcrumb in the environmental scanning electron microscope (ESEM). *Journal of Materials Science*, *35*(3), 599–607. https://doi.org/10.1023/A:1004720209547

Subsecretaría de Alimentos y Bebidas. (n.d.). Intercambio Comercial de Alimentos y Bebidas. Retrieved January 30, 2019, from http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Intercambio comercial de Alimentos y Bebidas/

Surendra Babu, A., y Parimalavalli, R. (2018). Effect of pullulanase debranching and storage temperatures on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *17*(2), 208–216. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.04.005

Tatham, A. S., y Shewry, P. R. (2012). The S-poor prolamins of wheat, barley and rye:Revisited.JournalofCerealScience,55(2),79–99.

#### https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.013

Tebben, L., Shen, Y., y Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in wholewheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in*FoodScienceyTechnology,81(February),10–24.https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.015

Tester, R. F., Karkalas, J., y Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, *39*(2), 151–165. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001

Tian, Y. Q., Li, Y., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Wang, J. P., Jiao, A. Q., ... Talba, T. (2009). β-Cyclodextrin (β-CD): A new approach in bread staling. *Thermochimica Acta*, 489(1–2), 22–26. https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.01.025

Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocolloids*, *11*(2), 181–193. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80025-2

Tomasik, P. (2003). *Chemical and Functional Properties of Food Polysaccharides*. (P. Tomasik, Ed.) (1st ed.). Boca Raton: CRC Press.

Topping, D. L., Fukushima, M., y Bird, A. R. (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(01), 171–176. https://doi.org/10.1079/PNS2002224

Tovar, J., Melito, C., Herrera, E., Rascón, A., y Pérez, E. (2002). Resistant starch formation does not parallel syneresis tendency in different starch gels. *Food Chemistry*, *76*(4), 455–459. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00306-5

Tsatsaragkou, K., Papantoniou, M., y Mandala, I. (2015). Rheological, Physical, and Sensory Attributes of Gluten-Free Rice Cakes Containing Resistant Starch. *Journal of Food Science*, *80*(2), E341–E348. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12766

Ukai, T., Matsumura, Y., y Urade, R. (2008). Disaggregation and Reaggregation of Gluten Proteins by Sodium Chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 1122–

### 1130. https://doi.org/10.1021/jf0725676

Urade, R. (2017). Gliadins from wheat grain : an overview , from primary structure to nanostructures of aggregates, (Osborne 1924).

Uthayakumaran, S., Newberry, M., Phan-Thien, N., y Tanner, R. (2002). Small and large strain rheology of wheat gluten. *Rheologica Acta*, *41*(1), 162–172. https://doi.org/10.1007/s003970200015

Utrilla-Coello, R. G., Bello-Pérez, L. A., Vernon-Carter, E. J., Rodriguez, E., y Alvarez-Ramirez, J. (2013). Microstructure of retrograded starch: Quantification from lacunarity analysis of SEM micrographs. *Journal of Food Engineering*, *116*(4), 775–781. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.026

Vamadevan, V., y Bertoft, E. (2014). Structure-function relationships of starch components. *Starch - Stärke*, *66*, 1–14. https://doi.org/10.1002/star.201400188

Vamadevan, V., y Bertoft, E. (2018). Impact of different structural types of amylopectinonretrogradation.FoodHydrocolloids,80,88–96.https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.029

Van Bockstaele, F., De Leyn, I., Eeckhout, M., y Dewettinck, K. (2008). Rheological Properties of Wheat Flour Dough and the Relationship with Bread Volume. I. Creep-Recovery Measurements. *Cereal Chemistry*, *85*(6), 753–761. https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-6-0753

Vasanthan, T., y Bhatty, R. S. (1998). Enhancement of Resistant Starch (RS3) in Amylomaize, Barley, Field Pea and Lentil Starches. *Starch - Stärke*, *50*(7), 286–291. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(199807)50:7<286::AID-STAR286>3.0.CO;2-0

Venn, B. J., Kataoka, M., y Mann, J. (2014). The use of different reference foods in determining the glycemic index of starchy and non-starchy test foods. *Nutrition Journal*, *13*, 1–6. https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-50

Wang, J., Si, X., Shang, W., Zhou, Z., Strappe, P., y Blanchard, C. (2017). Effect of single or

combined administration of resistant starch and chitosan oligosaccharides on insulin resistance in rats fed with a high-fat diet. *Starch/Staerke*, 69(7–8), 1–9. https://doi.org/10.1002/star.201600209

Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., y Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(5), 568–585. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143

Wang, S., y Zhu, F. (2016). Formulation and Quality Attributes of Quinoa Food Products. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(1), 49–68. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1584-y

Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, *24*, 115–119. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004

Willett, W., Manson, J., y Liu, S. (2002a). Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 274S–280S. https://doi.org/10.1093/ajcn/76.1.274S

Willett, W., Manson, J., y Liu, S. (2002b). Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes 1–3, *76*(April 2001), 274–280.

Williamson, G., Belshaw, N. J., Self, D. J., Noel, T. R., Ring, S. G., Cairns, P., … Parker, M. L. (1992). Hydrolysis of A- and B-Type Crystalline Polymorphs of Starch by α-Amylase, β-Amylase and Glucoamylase-1. *Carbohydrate Polymers*, *18*(3), 179–187. https://doi.org/Doi 10.1016/0144-8617(92)90062-U

Wolever, T. M. S. (2003). Carbohydrate and the regulation of blood glucose and metabolism. *Nutrition Reviews*, *61*(5), S40-8. https://doi.org/10.131/nr.2003.may.S40

Wongprayoon, S., Tran, T., Gibert, O., Dubreucq, E., Piyachomkwan, K., y Sriroth, K. (2018). Pullulanase Debranching of Various Starches Upgrades the Crystalline Structure and Thermostability of Starch-Lauric Acid Complexes. *Starch/Staerke*, *70*, 1–11. https://doi.org/10.1002/star.201700351

Xu, J., Wang, W., y Li, Y. (2019). Dough properties, bread quality, and associated

interactions with added phenolic compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, *52*, 629–639. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.052

Xu, Y., Qiu, M., Li, Y., Qian, X., Gu, J., y Yang, J. (2016). Polyamines mediate the effect of post-anthesis soil drying on starch granule size distribution in wheat kernels. *The Crop Journal*, *4*(6), 444–458. https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.05.004

Yadav, B. S., Sharma, A., y Yadav, R. B. (2010). Effect of storage on resistant starch content and in vitro starch digestibility of some pressure-cooked cereals and legumes commonly used in India. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(12), 2449–2455. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02214.x

Yang, Y., Song, Y., y Zheng, Q. (2011). Rheological behaviors of doughs reconstituted from wheat gluten and starch. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(4), 489–493. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0255-x

Yi, J., Kerr, W. L., y Johnson, J. W. (2009). Effects of waxy wheat flour and water on frozen dough and bread properties. *Journal of Food Science*, *74*(5), E278–E284. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01180.x

Yoo, S.-H., y Jane, J.-L. (2002). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, *49*(4), 297–305.

Yovchev, A. G., Briggs, C., Stone, A. K., Hucl, P., Nickerson, M. T., y Scanlon, M. G. (2017). Effect of Salt Reduction on Dough Handling and the Breadmaking Quality of Canadian Western Red Spring Wheat Varieties. *Cereal Chemistry Journal*, *94*(4), 752–759. https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-17-0026-R

Zannini, E., Waters, D. M., y Arendt, E. K. (2014). The application of dextran compared to other hydrocolloids as a novel food ingredient to compensate for low protein in biscuit and wholemeal wheat flour. *European Food Research and Technology*, *238*(5), 763–771. https://doi.org/10.1007/s00217-014-2161-8

Zhang, H., y Jin, Z. (2011a). Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, *86*(4), 1610–1614.

https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.070

Zhang, H., y Jin, Z. (2011b). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 865–867. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.066

Zhou, J.-C., Peng, Y.-F., y Xu, N. (2007). Effect of trehalose on fresh bread and bread staling. *Cereal Foods World*, *52*(6), 313–316. https://doi.org/10.1094/CFW-52-6-0313

Zhou, W. (2014). *Bakery Products Science and Technology*. (W. Zhou, Y. H. Hui, I. De Leyn, M. A. Pagani, C. M. Rosell, J. D. Selman, y N. Therdthai, Eds.) (2nd ed.). Oxford: Wiley-Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781118792001

# Capítulo 10

# Anexos

# Capítulo 10: Anexos

	PRUEBA DE DIFERENC	IA CON UN CONTROL	
mbre:		-	
aluador N°:		Fe	cha:
DIFERENCI	AS GLOBALES		
trucciones			000000000000
Jd ha recib	ido 5 muestras, una codificada con K (Control)	y 4 muestras codificadas de tre	s dígitos cada una.
signele un	valor de acuerdo a la escala	pecto al control K (Observe y p	ruebe el producto)
nsidere que	e a veces puede haber una o más muestras igu	ales al control	
0	Ninguna Diferencia	MUESTRA	PUNTAJE
2	_		
3	-		
4	-		
5			A.
6	_		-
7	_		
8	Diferencia Extrema		·
3	Providencia Parletina		
COLOR DF	LA CORTEZA		
trucciones			
Utilizando la	as mismas muestras y procedimiento, el atribu	to a evaluar en esta instancia es	COLOR DE LA CORTEZA
Mire la cort	eza de la muestra únicamente y asígnele un va	lor de acuerdo a la escala.	
		MUESTRA	DUNTAR
-4	Moderadamente menos tostado	WIDESTRA	PUNTAJE
-2	Ligeramente menos tostado		
-1	Apenas menos tostado		-
0	Igual al control		
1	Apenas mayor color tostado		
2	Ligeramente mayor color tostado		
3	Moderadamente mayor color tostado		
4	wucho mayor color tostado		
COHESIVID	AD		
Cohesivida	d es un atributo relacionado a la textura, que	evalúa el grado de deformación	que puede recibir
		-	
alimento a	intes de que disgregue.		
alimento a trucciones	antes de que disgregue.		
alimento a trucciones comprima l	intes de que disgregue. La muestra con los molares y evalúe la cantidad	l de deformación antes de la ro	tura.
alimento a trucciones comprima l Asígnele un	intes de que disgregue. i la muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala	l de deformación antes de la ro	tura.
alimento a strucciones comprima l Asígnele un	intes de que disgregue. i la muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cobesiva	l de deformación antes de la ro MUESTRA	tura. PUNTAJE
alimento a strucciones comprima l Asígnele un -4 -3	intes de que disgregue. i a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva	l de deformación antes de la ro MUESTRA	tura. PUNTAJE
alimento a strucciones Comprima I Asígnele un -4 -3 -2	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	tura. PUNTAJE
alimento a <u>strucciones</u> comprima i usignele un -4 -3 -2 -1	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidac valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Apenas menos cohesiva	l de deformación antes de la ro MUESTRA	tura. PUNTAJE
alimento a strucciones comprima i signele un -4 -3 -2 -1 0	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidac valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Apenas menos cohesiva Igual al control	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a <u>strucciones</u> comprima l signele un -4 -3 -2 -1 0 1 -	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidac valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l tsignele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 2	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva ligual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l ssignele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Mucho más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l sisgnele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Apenas menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l tsignele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN	ntes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Ugeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima i sisignele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones trucciones gebe la miri	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l sisignele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Sa del pan y asígnele un valor de acuerdo a la e	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l sisgnele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Se del pan y asignele un valor de acuerdo a la e	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima i signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig -4	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig -4 -3	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Apenas menos cohesiva lugual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva s te del pan y asignele un valor de acuerdo a la e Mucho menos cocido Moderadamente menos cocido	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 4 COCCIÓN trucciones uebe la míg -4 -3 -2 -2	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ligeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l sisgnele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva lugeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Ser del pan y asígnele un valor de acuerdo a la e Mucho menos cocido Moderadamente menos cocido Ligeramente menos cocido	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l sisgnele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva Ugeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva Se del pan y asígnele un valor de acuerdo a la e Mucho menos cocido Moderadamente menos cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Apenas menos cocido Apenas menos cocido Apenas menos cocido Apenas menos cocido Jugeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Apenas menos cocido Jugera menos menos menos menos menos cocido Jugera menos	de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima li signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones sebe la mig -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones sebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Igual al control Apenas más cohesiva ligual al control Apenas más cohesiva Ugeramente más cohesiva Moderadamente más cohesiva Mucho más cohesiva : ga del pan y asignele un valor de acuerdo a la e Mucho menos cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Igual al control Apenas más cocida Igual al control Apenas más cocida	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima i signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva lugual al control Apenas més cohesiva Ligeramente más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho més cohesiva Mucho més cohesiva Mucho més cohesiva Mucho més cohesiva Mucho més colesiva Mucho més colesiva Mucho més cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Ligual al control Apenas más cocida Ligeramente más cocida Moderadamente más cocida	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima i signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Mucho menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva Ligeramente más cohesiva Ligeramente más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más cohesiva Mucho más colesiva Mucho más colesiva Mucho más colesiva Mucho más colesiva Mucho más colesiva Mucho más cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente más cocida Mucho más cocida Mucho más cocida	i de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE
alimento a trucciones comprima l signele un -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 COCCIÓN trucciones uebe la mig -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 3 4 -2 -2 -1 0 1 2 -2 -1 0 1 2 -2 -2 -1 0 1 2 -2 -2 -1 0 1 2 -2 -2 -1 0 1 2 -2 -2 -1 -1 0 1 2 -2 -2 -1 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -2 -1 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2 -2	Intes de que disgregue. a muestra con los molares y evalúe la cantidad valor de acuerdo a la escala Mucho menos cohesiva Moderadamente menos cohesiva Ligeramente menos cohesiva lugual al control Apenas más cohesiva Lugeramente más cohesiva Mucho más colesiva Mucho más cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente menos cocido Ligeramente más cocida Ligeramente más cocida Mucho más cocida Mucho más cocida	l de deformación antes de la ro MUESTRA	PUNTAJE

Anexo A. Planilla de evaluación para la prueba de diferencias con un control

#### UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS Aceptabilidad de pan tipo Francés

Cons. Nº

Sexo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Edad:

Usted va a recibir dos muestras de pan codificadas con números de tres dígitos. Utilizando la siguiente escala, por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo comenzando por la aceptabilidad general. Primero evalúe todos los atributos de la muestra \_\_\_\_\_, y luego recién prosiga con la muestra \_\_\_\_\_.

Escala Hedónica	
Puntaje	Nivel de aceptación
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta moderadamente
6	Me gusta un poco
5	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me disgusta un poco
3	Me disgusta moderadamente
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

MUESTRA Nº

MUESTRA Nº

Aceptabilidad general	
Textura	
Color	
Apariencia	
Sabor	

Aceptabilidad general	
Textura	
Color	
Apariencia	
Sabor	

1. ¿Usted consume pan blanco tipo francés? Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

2. ¿Con qué frecuencia semanal lo hace?

De1a2\_\_\_, De3a5\_\_\_, De6a7\_\_\_.

Comentarios:

Anexo B. Planilla de evaluación para las pruebas de aceptabilidad por escalas hedónicas

#### Pan blanco tipo francés:

<u>413:</u> Pan elaborado con 100% de harina de trigo, con un aporte de fibra dietaria aproximado de 2.2%. Una flautita de este pan (~75 g) cubre el 6.6% del valor diario de fibra dietaria recomendado.

<u>865:</u> Pan elaborado con 80% de harina de trigo y 20% de almidón resistente\*, con un aporte de fibra dietaria aproximado de 9.6%. Una flautita de este pan (~75 g) cubre el 28.8% del valor diario de fibra dietaria recomendado.

\*El almidón resistente es un tipo de almidón que no puede ser digerido por las enzimas del intestino delgado. Por esta razón, es capaz de atravesar el tracto gastrointestinal aportando un 64% de fibra dietaria. Para la preparación de la muestra se utilizó un tipo de almidón de maíz naturalmente resistente (Hi-Maize®).

Ingredientes para la preparación del pan:

Ingradiantes para la masa	Muestras	
ingredientes para la masa	413	865
Harina de trigo (%)	61.9	48.0
Almidón resistente (%)	_	12.0
Agua (%)	35.0	36.9
Levadura (%)	1.86	1.80
Sal (%)	1.24	1.20

#### Anexo C. Información nutricional utilizada en las pruebas de aceptabilidad



Anexo D. Micrografías SEM de ARsp0 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo E. Micrografías SEM de ARsp0 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo F. Micrografías SEM de ARsp4 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo G. Micrografías SEM de ARsp4 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo H. Micrografías SEM de ARsp4 a 6000× de a) estructura porosa y b) estructura compacta



Anexo I. Micrografías SEM de ARcp0 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo J. Micrografías SEM de ARcp0 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo K. Micrografías SEM de ARcp4 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×



Anexo L. Micrografías SEM de ARcp4 con magnificaciones a a)400×, b) 1000×, c) 2000× y d) 4000×

Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional



Anexo M. Micrografías SEM de ARcp4 a 6000× de estructuras compactas a) rugosa y b) lisa



Anexo N. Micrografías SEM a 6000× de superficies de fractura de a) ARcp0 y b) ARcp4

%C = porcentaje de cenizas %F = porcentaje de fibra dietaria total %H = porcentaje de humedad %HC = porcentaje de hidratos de carbono %L = porcentaje de lípidos %P = porcentaje de proteínas  $^{\circ} = \text{grado}$ °C = grados centígrados Å = Angstrom A = absorción farinográfica de agua *A* = en cinética de pérdida de humedad. proporción de agua perdida en la miga a = en digestibilidad in-vitro de almidón, constante de velocidad a\* = cromaticidad rojo-verde  $A_1$  y  $A_2$  = coeficientes pre-exponenciales en la ecuación de ajuste para RMN-<sup>1</sup>H AACC = American Association of Cereal Chemists AAM = área alveolar media

ABC = área bajo la curva

 $A_i$  = coeficiente pre-exponencial del modelo de decaimiento de protones

A-L = complejo amilosa lípido

*Al* = volumen de la alícuota

AR = almidón retrogradado

ARcp = almidón retrogradado preparado con pululanasa (40,96 ASPU/g almidón) con almacenamiento a 4 °C

ARcp0 = almidón retrogradado preparado con pululanasa (20 ASPU/g almidón) con almacenamiento a 0 °C

ARcp4 = almidón retrogradado preparado con pululanasa (20 ASPU/g almidón) con almacenamiento a 4 °C

ARsp = almidón retrogradado preparado sin pululanasa con almacenamiento a 4 °C

ARsp0 = almidón retrogradado preparado sin pululanasa con almacenamiento a 0 °C

ARsp4 = almidón retrogradado preparado sin pululanasa con almacenamiento a 4 °C

ASPU = Acid Stable Pullulanase Unit

AT = almidón de trigo

 $a_w$  = actividad acuosa

*b* = coeficiente de velocidad de incremento en la ecuación de Chapman

b\* = cromaticidad azul-amarillo

bh = base húmeda

*BI = browning index* o índice de pardeamiento

bs = base seca

c = en ensayos de fermentación,
coeficiente de forma de la curva en la ecuación de Chapman

c = en difractometría de rayos-X,constante de la Ley de Bragg

C = en digestibilidad in-vitro de almidón, concentración de maltosa liberada

*C* = en la ecuación de Attenburrow, constante de proporcionalidad

CAA: Código Alimentario Argentino

Cen = ceniza en el residuo de fibra

CG = carga glucémica

CIDCA = Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos CIE = Commission Internationale de l'Eclairage

 $C_{\infty}$  = en digestibilidad in-vitro de almidón, concentración de maltosa liberada a tiempo tendiente a  $\infty$ 

cm = centímetro

CMC = carboximetilcelulosa sódica

cP = centipoise

CPMG = secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill

cps = centipoises

CSLM = microscopía/microscopio confocal láser de barrido

Cys = cisteína

D(0,1) = décimo percentil

D(0,5) = quincuajécimo percentil

D(0,9) = nonagésimo percentil

D[4,3] = diámetro de De Broucker o media del momento de volumen

 $D_0$  = dureza de la miga a tiempo 0

Da = Dalton

DATEM = mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico

*DF* = dimensión fractal

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

<i>d<sub>hkl</sub></i> = distancia entre planos paralelos de una red cristalina	FG = en SEM, filamento de gluten; en ESEM, film de gluten
$D_{\infty}$ = dureza de la miga a tiempo tendiente a $\infty$ DNS = ácido 3,5-dinitrosalicílico	FITC = isotiocianato de fluoresceína FIT-U = unidades de actividad enzimática de la pepsina
DSC: calorimetría diferencial de barrido/calorímetro diferencial de	$F_{N \rightarrow P}$ = factor de conversión de nitrógeno a proteína bruta
barrido $D_t$ = dureza de la miga a tiempo t	g = gramo o fuerza centrífuga, según corresponda
E = estabilidad farinográfica	G = gelatinización
$E_A$ = módulo de Young de la pared alveolar	<i>G'</i> = módulo elástico o de almacenamiento
EC = Enzyme Commission	<i>G''</i> = módulo viscoso o de pérdida
ECNT = enfermedades crónicas no transmisibles	<i>G*</i> = módulo complejo GA = gránulo de almidón
$E_e$ , $E_1$ y $E_2$ = módulos elásticos del modelo de Maxwell	GAL = gránulos de almidón libres
$E_M$ = módulo de Young de la miga ESEM = microsconía/microsconio	<i>GH</i> = gluten húmedo <i>GI</i> = gluten index
electrónica/o de barrido ambiental	Gln = glicina
Exo = exotérmico	<i>GS</i> = gluten seco
F = grado de ablandamiento farinográfico	$H_0$ = en modelado de Avrami, entalpía asociada a la retrogradación a tiempo 0
FFT = transformada rápida de Fourier	$H_0$ = en ensayos sensoriales, hipótesis nula

$H_1$ = en ensayos sensoriales, hipótesis	<i>IR</i> = índice de retrogradación
alternativa	J = Joule
$H_{AG\infty}$ = entalpía asociada a la retrogradación a tiempo tendiente a $\infty$ en base almidón gelatinizable	<i>k</i> = constante de velocidad de cristalización
HDL-c = lipoproteínas de alta densidad	<i>k</i> = en cinética de pérdida de humedad, constante de velocidad
HG = hebra de gluten	$k_D$ = constante de velocidad de aumento
$H_{\infty}$ = entalpía asociada a la	de la dureza
retrogradación a tiempo tendiente a $\infty$	kDa = kiloDalton
HM = almidón resistente Hi-Maize 260	kg = kilogramo
HMW-GS: subunidad de glutenina de alto peso molecular	<i>k<sub>H</sub></i> = constante de velocidad de la retrogradación
HPMC = hidroxipropilmetilcelulosa	L = extensibilidad alveográfica
hs = horas	L = litros
$H_t$ = entalpía asociada a la	L* = luminosidad
retrogradación a tiempo t	LARC = Capacidad de retención de ácido
HT = harina de trigo	láctico
Hz = hertz	LMW-GS: Subunidad de glutenina de
<i>I</i> = intensidad de señal	bajo peso molecular
Io = intensidad de señal residual de	log a = ordenada al origen del logaritmo
decaimiento	de $G'$ en función del logaritmo de la
<i>IDG</i> = índice de desempeño del gluten	frecuencia
IDRF = ingesta diaria recomendada de fibra	log <i>b</i> = ordenada al origen del logaritmo de <i>G''</i> en función del logaritmo de la frecuencia
<i>IG</i> = índice glucémico	

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

LSD = Least significant difference	OMS = Organización Mundial de la Salud
m = masa	P = tenacidad alveográfica
M = molaridad/molar	p = valor de probabilidad
<ul> <li>m = pendiente del logaritmo de G" en función del logaritmo de la frecuencia</li> <li>mA = miliAmper</li> <li>mg = miligramo</li> </ul>	p/p = peso en peso p/v = peso en volumen $P_0 = valor del parámetro a tiempo 0$ P1 y P2 = en termogramas, picos en las
ml = militros	P50 = en porosidad de la miga, quincuagésimo percentil
mm = milimetro mM = milimolar/milimol	P90 = en porosidad de la miga, nonagésimo percentil
ms = milisegundo n = índice de Avrami o pendiente del	P99 = en porosidad de la miga, nonagésimo noveno percentil
<ul> <li>n = en reología, pendiente del logaritmo</li> <li>de G' en función del logaritmo de la frecuencia</li> <li>n = número de replicados</li> <li>N = número del r-tamaño de cajas</li> <li>N = Newton o normalidad/normal, según corresponda</li> <li>N = en porosidad de la miga, número de</li> </ul>	Pa = Pascal $P_{eqN}$ = peso de un equivalente de nitrógeno pH = logaritmo negativo de la concentración de protones Phe = fenilalanina $P_{\infty}$ = valor del parámetro a tiempo tendiente a $\infty$
alveolos nd = no detectado nm = nonémetro	pK <sub>a</sub> = logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
nin = nanometro	

PM = peso molecular	SSL = estearoil lactilato de sodio
PP = partículas proteicas	SuRC = capacidad de retención de
PPA = partículas proteicas con gránulos	sacarosa
Pro = prolamina	T = temperatura
<i>Prot</i> = proteína en el residuo de fibra	t = tiempo
$P_t$ = valor del parámetro a tiempo t	$T_1$ = tiempo de relajación spin-red
r = arreglo del tamaño de cajas	$t_1$ y $t_2$ = tiempos de relajación de la masa
R = peso del residuo	$t_{1/2}$ = tiempo de vida media
$r^2$ = coeficiente de determinación	<i>t</i> <sub>1/2H</sub> = tiempo de vida media de la retrogradación
RMN- <sup>1</sup> H = resonancia magnética nuclear de protones	$T_2$ = tiempo de relajación spin-spin
rpm = revoluciones por minuto	TD = tiempo de desarrollo farinográfico
RVA = viscoamilógrafo rápido	T <sub>e</sub> = temperatura de empaste
RVL = rango de viscoelasticidad lineal	t <sub>e</sub> = tiempo de empaste
s = segundo	T <sub>f</sub> = temperatura final
SCFA = ácidos grasos de cadena corta	TFO = tiempo de fermentación óptimo
<i>SCRC</i> = capacidad de retención de carbonato de sodio	T <sub>fR</sub> = temperatura final de la endoterma de fusión de la amilopectina retrogradada
SEM = microscopía/microscopio electrónica/o de barrido	T <sub>i</sub> = temperatura de inicio
SENASA = Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria	T <sub>iR</sub> = temperatura de inicio de la endoterma de fusión de la amilopectina retrogradada
SRC = capacidad de retención de solventes	T <sub>p</sub> = temperatura de pico

# Panificados con almidón resistente aptos para regímenes especiales: formulación y caracterización fisicoquímica, sensorial y nutricional

T <sub>p1</sub> = temperatura del pico P1	X = parámetro derivado de L*, a* y b*	
T <sub>p2</sub> = temperatura del pico P2	para el cálculo del browning index	
TPA = análisis del perfil de textura	$y_{\infty}$ = en cinética de pérdida de humedad,	
T <sub>pR</sub> = temperatura de pico de la endoterma de fusión de la amilopectina retrogradada	tendiente a $\infty$	
	$\alpha$ = nivel de significación estadístico	
Tyr = tirosina	$\gamma$ = deformación	
U = unidades de actividad enzimática de	$\gamma_0$ = amplitud de la deformación	
la α-amilasa	$\dot{\gamma}$ = gradiente de velocidad	
UF = unidades farinográficas	$\delta$ = ángulo de fase	
USP = United States Pharmacopeia	$\Delta H = entalpía$	
V = voltio	$\Delta H_{A-L}$ = entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido	
v/v = volumen en volumen		
$V_b$ = volumen de titulante necesario	$\Delta H_{AT}$ = entalpía de gelatinización en base almidón de trigo	
Vc = fracción volumétrica cristalizada	$\Delta H_{gel}$ = entalpía de gelatinización	
$V_{fe}$ = volumen de la fase etérea	$\Delta H_R$ = entalpía de la endoterma de	
$V_m$ = volumen de titulante necesario para titular la muestra	$\Delta T_R$ = rango de temperatura de la	
W = trabajo de deformación	retrogradada	
alveográfico	$\Delta V$ = incremento de volumen	
<i>WaRC</i> = capacidad de retención de agua	$\Delta V_{max}$ = incremento máximo de volumen	
x = en relajación de masa o RMN- <sup>1</sup> H,		
tiempo	$\varepsilon_1$ y $\varepsilon_2$ = estuerzos de decaimiento de la relajación de la masa	

 $\varepsilon_e$  = esfuerzo de equilibrio de la  $\omega$  = frecuencia de oscilación relajación de la masa  $\eta_f$  = viscosidad final  $\eta_{mín}$  = viscosidad mínima  $\eta_p$  = viscosidad de pico  $\theta$  = en difractometría de rayos-X, ángulo de Bragg  $\theta(t)$  = fracción volumétrica relativa aún por cristalizar al tiempo t  $\theta_H$  = fracción retrogradada  $\kappa$  = coeficiente pre-exponencial de la dimensión fractal  $\lambda$  = longitud de onda del haz incidente  $\mu$  = coeficiente de viscosidad  $\mu$ l = microlitro μm = micrómetro  $\mu$ s = microsegundo  $\rho_A$  = densidad de la pared alveolar  $\rho_M$  = densidad de la miga  $\sigma$  = esfuerzo de corte  $\sigma_0$  = amplitud del esfuerzo de corte  $\sigma_{crítico}$  = amplitud del esfuerzo de corte límite del rango de viscoelasticidad lineal