
IMPACTO DE LOS TRATAMIENTOS CON MICROONDAS O ULTRASONIDOS SOBRE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE HARINAS SIN GLUTEN DE PSEUDOCEREALES Y MAÍZ

TRABAJO FIN DE GRADO EN NUTRICIÓN
HUMANA Y DIETÉTICA

Facultad de Medicina Universidad de
Valladolid

Curso 2018-2019



Autora: Lucía Aguado Cisneros

Tutor: Francisco Javier Arias Vallejo

Tutora externa: M^a Felicidad Ronda
Balbás

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos.....	p.6
Resumen	p.7
Abstract.....	p.8
1. Introducción.....	p.9
2. Justificación.....	p.14
3. Objetivos.....	p.15
4. Material.....	p.15
4.1 Harinas	p.15
4.2 Equipos y material fungible (anexo iv)	p.16
4.3 Reactivos (anexo ii)	p.16
5. Métodos.....	p.16
5.1 Determinación de la humedad.....	p.16
5.2 Tratamiento de las harinas.....	p.16
5.2.1 Humidificación de las harinas y tratamiento microondas.	p.16
5.2.2 Tratamiento con ultrasonidos.....	p.17
5.3 Fraccionamiento proteico de osborne.....	p.17
5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).	p.19
5.5 Tratamiento con urea.....	p.20
5.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	p.20
5.7 Colorimetría	p.21
5.8 Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de fourier (FTIR).	p.21
5.9 Análisis estadístico	p.21
6. Resultados y discusión.....	p.22
6.1 Cambios en la humedad con los diferentes tratamientos.	p.22
6.2 Impacto de los tratamientos en el perfil proteico.....	p.23
6.2.2 Análisis de la composición proteica de los extractos crudos de las harinas de quinua, trigos sarraceno y maíz. Efecto del tratamiento con microondas.....	p.24
6.2.3 Efecto del tratamiento con ultrasonidos	p.30
6.3 Efecto de los tratamientos físicos sobre el color de las harinas	p.31
6.4 Resultados obtenidos con FTIR.	p.33
6.4.1 Harinas	p.33
6.4.2 Fracciones proteicas del trigo sarraceno	p.34
6.5 Principales observaciones obtenidas con DSC.....	p.37
7. Conclusiones	p.38

8. Bibliografía	p.40
9. Anexos	p.44
9.1 Anexo i: diagrama de flujo del fraccionamiento proteico de osborne	p.44
9.2 Anexo ii: espectros obtenidos en ftir	p.45
9.3 Anexo iii: curvas de flujo de calor obtenidas mediante dsc	p.47
9.4 Anexo iv equipos y material fungible utilizados y disponibles en los laboratorios de procerealtech y bioforge	p.49
9.5 Anexo v: reactivos	p.51
9.6 Anexo vi: composición gel SDS-PAGE.	p.52

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Composición proximal de las harinas nativas de trigo sarraceno, quinua y maíz.....	p.15
Tabla 2: Composición PLBX5.....	p.20
Tabla 3: Humedad de las harinas nativas y tratadas con MW.....	p.22
Tabla 4: Humedad de las harinas nativas y tratadas con US.....	p.22
Tabla 5: Cambios en el color de las distintas harinas y cambios observados en el tratamiento.....	p.32
Tabla 6: Principales picos observados en la DSC.....	p.38
Tabla 7: Reactivos empleados.....	p.51
Tabla 8: Composición gel SDS-PAGE.	p.52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Análisis de las concentraciones de estudio en condiciones reductoras de las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz.	p.23
Figura 2: Análisis en condiciones reductoras de las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz con diferentes tiempos de extracción.	p.23
Figura 3: Electroforesis en condiciones reductoras de las harinas nativas y tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz.	p.24
Figura 4: Electroforesis en condiciones no reductoras de las harinas nativas y tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz.	p.24
Figura 5: Electroforesis en condiciones reductoras de la harina de quinua tratada con microondas y segregada (MW-1).	p.25
Figura 6: (ampliación figura 4) Perfil proteico de la harina de quinua nativa y tratada con microondas (MW-2) en condiciones reductoras.	p.26
Figura 7: (ampliación Figura 4) Perfil proteico de la harina de quinua nativa y tratada con microondas (MW-2) en condiciones no reductoras.	p.26
Figura 8: Análisis en condiciones reductoras del maíz tratado con microondas y segregada (MW-1).	p.26
Figura 9: Análisis de las fracciones proteicas del trigo sarraceno en condiciones reductoras.	p.27
Figura 10: Análisis de las fracciones proteicas del trigo sarraceno en condiciones no reductoras. De izquierda a derecha, marker, albúminas (nativas y tratadas), globulinas (nativas y tratadas), prolaminas (nativas y tratadas) y glutelinas (nativas y tratadas).	p.28
Figura 11: Electroforesis del tratamiento de urea de las harinas tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz en condiciones reductoras	
Figura 12: Efecto del tratamiento ultrasonidos en harinas de quinua y trigo sarraceno en condiciones reductoras.	p.29
Figura 13: Efecto del tratamiento ultrasonidos en harinas de quinua y trigo sarraceno en condiciones no reductoras.	p.30
Figura 14: Espectros de FTIR de las harinas nativas de maíz, quinua y TS.	p.30
Figura 15: Espectro de FTIR de las harinas de TS nativa (negro) y tratada con microondas (rojo) y ultrasonidos (verde). Ampliación de la longitud de onda correspondiente a los enlaces amido I (1740-1630 cm ⁻¹) y II (1630-1510 cm ⁻¹).	p.33
Figura 16: Espectro de FTIR de las fracciones proteicas del TS y BSA. A	p.34
Figura 17: Espectro de las fracciones proteicas de TS nativas (negro) y tratadas con microondas (rojo) y comparación con BSA (albúmina).	p.35
Figura 18: Diagrama de flujo del procedimiento de fraccionamiento proteico de Osborne. C es centrifugación, L, liofilización e I incubación.	p.44

Figura 19: Espectro FTIR de la harina nativa de maíz (negro) y de la harina de maíz tratada con microondas (roja)	p.44
Figura 20: Ampliación de la región amido I (1740-16030 cm^{-1}) y amido II (1630-1510 cm^{-1}) de las harinas de maíz nativa (negro) y tratada con microondas (rojo)	p.44
Figura 21: Espectro FTIR de la harina nativa de quinoa (negro) y de la harina de quinua tratada con microondas, MW-2 (roja) y tratada con ultrasonidos (verde)	p.45
Figura 22: Ampliación del espectro FTIR de la región amido I (1740-16030 cm^{-1}) y amido II (1630-1510 cm^{-1}) de las harinas de quinua nativa (negro) y tratada con microondas (rojo) y ultrasonidos (verde).....	p.45
Figura 23: Termograma DSC de la harina nativa de maíz (azul) y de la harina de maíz tratada con microondas (MW-2) (rojo). Ambas sin agua.	p.46
Figura 24: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul) , quinua (rojo) y maíz (verde)	p.46
Figura 26: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul) , quinua (rojo) y maíz (verde) realizado una semana después de haber sido sometidas a DSC hasta 200°C, pudiendo indicar una irreversibilidad de los procesos.....	p.46
Figura 27: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul) y de la harina de trigo sarraceno tratada con microondas (rojo). Ambas sin agua.	p.47
Figura 27: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul), quinua (rojo) y maíz (negro).....	p.47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS :

- TS: trigo sarraceno
- HMT: heat-moisture treatment
- ESPGHAN: European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
- MW: microondas.
- MW-1: tratamiento microondas 1, con segregación.
- MW-2: tratamiento microondas 2, sin segregación
- US: ultrasonidos.
- PLB: protein loading buffer
- SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- DSC: calorimetría diferencial de barrido
- FTIR: espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
- Ab: albúminas.
- Gb: globulinas.
- PL: prolaminas.
- Gl: glutelinas.
- MK: marker
- BSA: albúmina de suero bovina

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Javier Arias Vallejo y a Felicidad Ronda Balbás la oportunidad que nos han dado a mi compañera y a mi de realizar este trabajo experimental, así como sus correcciones y sus enseñanzas. También a todo el equipo de los laboratorios Bioforge y ProcerealTech, especialmente a Ángela García Solaesa y a Rocío García Lera, por acompañarnos tanto en todo el proceso. También a Antonio Vela Corona por explicarnos detalladamente todo su trabajo.

A mis amigas por todo su apoyo porque estudiar este grado y realizar este estudio no habrían sido un camino tan bonito si no lo hubiese recorrido con ellas.

Y por supuesto, no podía dejar de agradecer a mi familia, muy especialmente a mis padres todo su tiempo y dedicación. Gracias por creer en mí y por no dejarme abandonar en ningún momento; por vosotros me he atrevido aprovechar esta oportunidad y otras muchas más. Sé que siempre habéis deseado lo mejor para mí y yo solo espero poderos devolver a partir de ahora todo lo que os merecéis

RESUMEN

Dada la creciente demanda de productos de panadería sin gluten, la industria desarrolla y aplica nuevos tratamientos como el tratamiento hidrotérmico con microondas o el ultrasonidos; que provocan modificaciones físicas en las harinas tratadas. Sin embargo, no se conocen en profundidad los cambios que producen dichos tratamientos en las proteínas de estas materias primas cuyo valor nutricional original es alto. Por ello, este trabajo analiza el impacto de los tratamientos microondas y ultrasonidos sobre la fracción proteica de harinas sin gluten de trigo sarraceno, quinoa (pseudocereales) y maíz (cereal).

Una vez humedecidas y tratadas con microondas las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz o tratadas con ultrasonidos las harinas de ambos pseudocereales, se estudió su efecto sobre las proteínas mediante diferentes técnicas. Extractos de todas las harinas nativas y tratadas, y las fracciones proteicas del trigo sarraceno obtenidas por el procedimiento de Osborne, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Se comprobó que la magnitud de los cambios en las proteínas observados por esta técnica, en el caso del tratamiento con microondas, eran mayores para la quinua y el maíz que para el trigo sarraceno. El tratamiento con ultrasonidos no obtuvo diferencias apreciables en ninguna de las dos harinas tratadas. Los espectros de las harinas nativas y tratadas obtenidos con la espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) no mostraron diferencias significativas entre sí, aunque permitieron analizar la efectividad del fraccionamiento. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) puso de manifiesto ciertos cambios tras el tratamiento, pero no permitió extraer resultados concluyentes respecto al impacto de los tratamientos sobre las proteínas. Se estudiaron también los cambios de color, probablemente debidos a la Reacción de Maillard; siendo estos más marcados en el tratamiento microondas y casi despreciables en el caso de ultrasonidos. Por tanto, la magnitud del efecto sobre las proteínas de los tratamientos varía no solo en función del tratamiento aplicado, sino también de la harina.

Palabras clave: pseudocereales, maíz, fracción proteica, tratamiento microondas, tratamiento ultrasonidos.

ABSTRACT

The bakery process of gluten-free flours is a challenge for the food industry, due to its growing demand. For that reason, new treatments such as Heat Moisture-Treatment (HMT) and ultrasound treatment are tested. Such techniques are equally applied to traditional products like maize flour or to new alternatives like pseudo cereals because of its high and healthy protein content. Nevertheless, there is few information about the protein changes caused by the mentioned treatments. This study analyses the impact of microwave and ultrasound treatment on the protein fraction of gluten-free flour of pseudo cereals and maize.

The moisture content of quinoa, buckwheat and maize flour was changed and adapted for the microwave treatment, which was applied to the tree flours. The ultrasound treatment was only studied on the quinoa and buckwheat flours. After the treatments were done, the protein profile of the flours and Osborne protein fractions of buckwheat was analysed by SDS-PAGE electrophoresis. Infrared transmission spectroscopy with Fourier transform (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) were also carried out to determine protein changes and a colorimetry was done to check out colour changes. It was assessed that the impact of microwave treatment on the protein profile observed with SDS-PAGE was bigger in quinoa, followed with maize, and small differences could be appreciated on buckwheat, and ultrasound treatment provokes no appreciable changes. Moreover, FTIR analysis did not show qualitative differences in the flour structures but a low effectivity of fractionization process. DSC results shed different changes in the observed peaks. Furthermore, Maillard Reaction happened in all the samples, but browning was more intense in the microwaved ones. Therefore, the size of the impact of the treatments on the proteins is different depending not only of the kind of treatment but also of the flour.

Keywords: pseudocereals, maize, protein fraction, microwave treatment, ultrasound treatment.

1. INTRODUCCIÓN.

El gluten es un conjunto de proteínas, mayormente gliadinas (prolaminas) y gluteninas (glutelinas), presente en el trigo. Existen, además, gliadinas similares en el centeno, la cebada y la avena que también se denominan gluten por extensión. Forman parte de las proteínas de almacenamiento de estos cereales y de él depende la calidad de la masa de pan y otros productos alimentarios cuya base son estas harinas. Este conjunto de proteínas también está asociado a un pequeño porcentaje de lípidos (8%) y carbohidratos (9%). Las proteínas y los lípidos asociados en el gluten, lipoproteínas, son responsables de las propiedades viscoelásticas y confieren a la masa la capacidad de retener gas durante la fermentación, generando un producto final con corteza elástica y esponjoso; mientras que los carbohidratos, pentosanos como el β -glucano, fijan una gran cantidad de agua. Debido a sus únicas cualidades elásticas, los productos derivados de estos cereales tienen una amplia aceptación y tradición en la industria alimentaria, que además lo emplea como aditivo (Biesiekierski, 2017) (Belitz, Grosch, & Schierberle, 2011).

Este conjunto de proteínas ha ganado en popularidad en los últimos años dado el creciente número de casos diagnosticados de enfermedad celiaca y otras enfermedades menos estudiadas, como la sensibilidad al gluten no celiaca, (Czaja-Bulsa, 2015) (Padalino, Conte, & Del Nobile, 2016)(Moscoso J., & Quera P., 2015). Según la ESPGHAN (2012), la enfermedad celiaca es una enfermedad sistémica inmunomediada, provocada por el gluten en individuos genéticamente susceptibles y tanto ésta como la sensibilidad al gluten no celiaca presentan remisión de los síntomas con una adherencia a la dieta sin gluten (Coronel Rodríguez, Espín Jaime, & Guisado Rasco, 2015), ya que las gliadinas del gluten tienen secuencias peptídicas resistentes a la proteólisis por su alto contenido en prolina y glutamina. Estos residuos de glutamina son desaminados por la enzima transglutaminasa 2, que crea residuos cargados negativamente en la gliadina que aumentan la afinidad de los péptidos DQ2, activando linfocitos CD4+ responsables de la respuesta inmune y desencadenantes de la respuesta sistémica de la enfermedad celiaca (Arentz Hansen, McAdam, Molberg, Fleckenstein, Lundin *et al*, 2002).

El gluten no es una proteína esencial y por tanto su eliminación de la dieta no debería producir ningún tipo de carencia; sin embargo, como consecuencia del cambio en el patrón dietético, estos pacientes suelen consumir mayores cantidades de grasa y azúcar y menores de fibra (El Khoury, Balfour-Ducharme, & Joye, 2018). Se produce así un desequilibrio nutricional agravado por la inadecuación dietética de los productos especiales sin gluten, que tienen un menor contenido proteico y un mayor aporte de grasa y sal que sus homólogos con gluten (Melini &

Melini, 2019) . A este problema, se suman otros desafíos para el consumidor como el encarecimiento en el presupuesto destinado a la compra (Federación de Asociaciones de Celíacos de España, 2019) , muy relacionado con la dificultad para encontrar productos seguros y a la menor escala en la que estos alimentos son producidos por la industria alimentaria. La normativa vigente define un producto sin gluten como “aquel cuyo contenido en gluten es < 20 mg/kg (<20 ppm)”(Comisi & Europea, 2014), norma actualmente en revisión debido al desconocimiento del nivel realmente seguro para el paciente.

Todo ello supone un reto para la industria, que trabaja constantemente por la mejora organoléptica de los productos sin gluten intentando crear un producto económico, seguro y de alta calidad nutricional.

Alternativa a los cereales con gluten: pseudocereales y maíz.

El trigo es uno de los cultivos más extendidos en Europa, y más en la dieta mediterránea. Por ello, se buscan otros cultivos que sí son comunes en el resto del mundo y que no ocasionen los ya mencionados problemas. Son varias las alternativas más empleadas hasta la actualidad en la fabricación de productos sin gluten; entre ellos el arroz, sorgo y maíz. No obstante; en los últimos años comienzan a introducirse nuevas alternativas, como las harinas de pseudocereales. Según el American Heritage Dictionary of English language, “un pseudocereal es cualquier planta que no pertenece a la familia de las gramíneas, pero produce frutas y semillas utilizadas como harina para pan y otros alimentos básicos”. A diferencia de las gramíneas, son plantas dicotiledóneas y , al ser su estructura diferente, también se observan diferencias en su composición (Alvarez-Jubete, Arendt, & Gallagher, 2010). Su principal componente es el almidón y su contenido proteico, entre el 12% y 18,9 %, es superior al de los cereales; destacando el importante aporte en aminoácidos como cisteína y metionina (ambos esenciales). Además, la distribución de las fracciones proteicas también es distinta, siendo mayoritarias las albúminas y globulinas mientras que en los cereales la mayor parte de las proteínas pertenecen a las prolaminas y glutelinas, como proteínas de reserva. Cabe destacar también su alto contenido en fibra en relación con la de cereales refinados, ya que se molturan de forma integral (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010). Por tanto, los pseudocereales y sus harinas suponen una nueva oportunidad para el desarrollo de alimentos sin gluten que mejoren las inadecuaciones dietéticas previamente mencionadas.

A continuación, se detallan las características de algunos pseudocereales y cereales interesantes en la dieta sin gluten. El maíz, como sustituto tradicional en la dieta sin gluten, y la quinua y el trigo sarraceno como nueva oportunidad dentro de la creciente utilización de pseudocereales.

I) *Maíz*

Es una planta de la familia de las Poaceae, gramínea, anual y domesticada en México. Su grano está cubierto por el pericarpio, cubierta fibrosa que encierra al grano; éste está constituido por endospermo y germen. El primero contiene almidón y proteínas de reserva para la planta en su desarrollo y en la segunda están el eje embrionario o planta nueva y el escutelo. Las proteínas de las semillas del maíz se clasifican típicamente en zeinas y no zeinas. Las zeinas se corresponden con la fracción de las prolaminas, proteínas de almacenaje principales en este cereal. Sin embargo, su proteína es de baja calidad ya que tiene bajos niveles de aminoácidos esenciales, especialmente lisina. (Špaleková & Gálová, 2018)(Vivodík, Gálová, Balážová, Petrovicová, & Hložáková, 2016).

II) *Quinoa (Chenopodium quinoa)*

La quinoa, como recoge el diccionario de la Real Academia Española o quinoa como normalmente se le denomina, es una dicotiledónea de la familia de las Amaranthaceae. Es nativa de la región de los Andes (Sudamérica) que está adaptada a altitudes de entre 2000 y 4000 m y es resistente al frío y a escasas precipitaciones. Por lo que su cultivo se ha extendido en todo el mundo por su gran adaptabilidad. Su color depende de la variedad y cambia de blanco a amarillo hasta rojo y su estructura es similar a la del amaranto; en ella, el grano está envuelto en un doble pericarpio que contiene saponinas, que deben ser eliminadas antes de su consumo (Mir, Riar, & Singh, 2018). Dentro, en el grano, se pueden distinguir el embriogermo, que forma una espiral y que rodea al perispermo, rico en almidón. Este, junto con el revestimiento de la semilla, representa la fracción de salvado rica en grasas y proteínas, especialmente en lisina y metionina (Alonso-Miravalles & O'Mahony, 2018).

Su harina contiene 6,5 veces más hierro que el trigo, altos niveles de Vitamina E y 10 veces más folato que el trigo, por lo que actualmente es considerada uno de los principales ingredientes funcionales (Sohaimy, Mohamed, Shehata, Mehany, & Zaitoun, 2018). De hecho, la promoción de la quinoa forma parte de una estrategia para contribuir a la seguridad alimentaria de la FAO.

III) *Trigo Sarraceno o Alforfón (Fagopyrum esculentum)*

Originario de Asia, crece preferentemente climas cálidos y puede cultivarse en casi todos los tipos de suelo menos en aquellos arenosos. Dentro de Europa, Polonia es la principal productora de trigo sarraceno (TS). En las semillas de alforfón, cuya forma es triangular, las reservas de almidón se almacenan en el endospermo, como en los cereales comunes, y el embrión, rico en grasa y proteína, se extiende a través del endospermo almidonado. Las proteínas del TS tienen

una buena composición proteica y un buen balance de aminoácidos, siendo rico en lisina y arginina. Su contenido en prolina y glutamina es muy inferior al del trigo.

Son muchas las investigaciones que se han realizado sobre su potencial como alimento funcional; de hecho, los extractos de trigo sarraceno muestran un efecto en la hipercolesterolemia. Este efecto se debe, posiblemente, a un mecanismo de reducción de la absorción intestinal del colesterol dietético. También se han estudiado otras capacidades relacionadas con la prevención y tratamiento del cáncer, ya que se ha demostrado *in vivo e in vitro* su capacidad antioxidante, por la inhibición de la proliferación celular, ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Contiene unos compuestos, denominados fagopiridoles, que ejercen un rol similar a la insulina y demuestran una reducción de la glucemia en un importante número de estudios (Giménez-Bastida & Zieliński, 2015). En relación con las anteriores observaciones, se comprobó que la sustitución de una parte de la harina de trigo en la composición de un pan en China tenía un efecto positivo en el control de la glucemia (Liu, Brennan, Serventi, & Brennan, 2017). Por ello, el trigo sarraceno es un nuevo alimento cuya inclusión en el patrón dietético puede ser interesante.

La panificación sin gluten y cereales, un nuevo reto

El pan es un alimento de consumo diario en nuestro patrón dietético; cuyo aporte puede suponer una dosis de nutrientes que mejoren nuestra salud o a la inversa, un consumo repetido de nutrientes inadecuados que deterioren nuestra salud.

A pesar de que las harinas derivadas de las anteriores semillas no contienen gluten y poseen buenas características nutricionales, llevar a cabo el proceso de panificación presenta grandes dificultades. Esto se debe a la ausencia de una red que propicie la elasticidad y viscosidad del gluten. De hecho, los panes sin gluten no pueden retener el gas necesario para la correcta formación de la miga salvo que otro gel lo reemplace. Por tanto, para reformular estos panes, se aumenta la cantidad de aquellos ingredientes que podrían formar una fase continua de estabilización: los almidones, de una única harina o varias, y los hidrocoloides. No obstante, al aumentar el contenido en almidón en la formulación, el pan pierde valor nutritivo en cuanto a micronutrientes, fibra y proteínas, además de un tener color más claro que no atrae tanto al consumidor (Schober, 2009).

El almidón y la harina de maíz son frecuentemente empleados en la formulación de los productos sin gluten comercializados (Roman, Belorio, & Gomez, 2019); pero la investigación avanza para buscar mejores resultados, y son varios los experimentos realizados con pseudocereales. En este proceso de búsqueda, se encontró que si en la formulación de panes

sin gluten se sustituía parte del almidón de patata con harina de pseudocereales se obtenían productos con un gran contenido en fibra calcio y hierro, y un mayor contenido en polifenoles. Además, el volumen del pan aumentaba de forma significativa y tenía una miga más suave con respecto a la formulación con almidón de patata (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010) . Por otra parte, sustituyendo en diferentes proporciones las harinas de arroz y maíz por quinua en una receta control, pero manteniendo el almidón de maíz y añadiendo α -glucosidasa fúngica, la calidad del pan sin gluten resultante mejoraba. Concretamente, cuando la harina de quinua suponía un 75% de la composición del producto, se obtenía un pan de un volumen 33% superior, con una corteza más oscura y un interior más claro; semejante al pan con gluten de trigo. Además, obtuvieron una correlación positiva entre la cantidad de harina de quinua blanca empleada y la elasticidad del pan (Elgeti *et al.*, 2014). No obstante, se ha de indicar que, al perder el salvado, también pierde su importante riqueza en fibra; algo que por otra parte ocurre también en el pan tradicional no integral. Los resultados de la sustitución en la formulación de panes sin gluten con pseudocereales son muy variados debido a la distinta formulación de los panes elegidos como control, del porcentaje de sustitución y del pseudocereal empleado; por lo que es clave buscar la correcta formulación de los ingredientes y continuar con la búsqueda de materias primas que proporcionen un gel que aporte viscosidad al pan.

Tratamientos microondas y ultrasonidos

Son múltiples los tratamientos destinados a cambiar la viscosidad de las harinas, entre ellos el tratamiento con microondas y ultrasonidos. Las ondas microondas son ondas de radio de alta frecuencia que generan movimiento de las moléculas cuya estructura es de un dipolo eléctrico, lo que comúnmente se emplea para calentar alimentos y fruto de este aumento de temperatura puede haber cambios en la composición química. Pero la utilidad de este tratamiento no se limita al calentamiento; de hecho, se ha estudiado el efecto de diversos tratamientos con microondas para mejorar la panificación de productos sin gluten en las propiedades estructurales y funcionales de los granos de cereales (Villanueva, Harasym, Muñoz, & Ronda, 2018), aunque la investigación con la harina de pseudocereales es, en contraste, muy escasa. Por ejemplo, en el pretratamiento de harina de trigo sarraceno tártaro con microondas durante 4 minutos a 150 W no se observaron cambios en su composición ni en la estructura primaria de las proteínas, pero si mejoró la funcionalidad de la harina (Sun *et al.*, 2018). El contenido en agua y en agua ligada de las harinas es fundamental para entender y adecuar el tratamiento con microondas. A parte, un aumento en la humedad de la muestra combinado con un calentamiento permite la movilidad molecular y los cambios estructurales de la harina. Por ello es necesario modificar el porcentaje de humedad de la harina antes de someterla a tratamiento.

En la harina de arroz, se comprobó que una humedad del 30% obtenía la mayor diferencia positiva con respecto a la viscosidad de la harina sin tratar y, por tanto, una mejora de las propiedades panificables de esta harina (Villanueva *et al.*, 2018).

Por otra parte, el uso del tratamiento ultrasonidos (US) se está extendiendo en el procesamiento de alimentos. Su mecanismo, se basa en ondas sonoras de frecuencia superior a la percibida por el oído humano que viajan por una solución, provocando cambios de presión y temperatura proporcionales a la cantidad de energía aplicada al sistema (Vera, Valenzuela, Yazdani-Pedram, Tapia, & Abugoch, 2019). El tratamiento es uniforme en toda la muestra y es un factor importante la concentración de la harina en el medio.

Los cambios de presión producidos por las ondas ultrasonidos son los buscados para obtener el efecto deseado, en este caso, sobre los granos de almidón, cambiando su tamaño y su cristalinidad, afectando así a su viscosidad. Estos cambios de presión producen que las moléculas que componen la solución cambien inmediatamente a estado de vapor, formando cavidades que viajan a zonas de mayor presión y estallan (es decir, el vapor regresa al estado líquido) produciendo cambios en la superficie de la muestra (Jambrak *et al.*, 2010). Este efecto se llama cavitación, y puede intervenir en la reducción del tamaño de agregados proteicos (Vera *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICACIÓN

ProCerealtech es un grupo de investigación de la Universidad de Valladolid multidisciplinar, en el que investigadores del Área de Tecnología de los Alimentos estudian las propiedades físicoquímicas, sensoriales y nutricionales de los alimentos y la mejora de la calidad de los productos basados en cereales y derivados sin gluten mediante la modificación física de las harinas. Una de sus múltiples líneas de investigación es la modificación de la funcionalidad de los tratamientos por microondas y ultrasonidos de las harinas sin gluten para su aplicación en el desarrollo de productos de panadería sin gluten.

Su trabajo se centra en la modificación de la viscosidad de las masas panarias resultantes de estas harinas sometidas a los pretratamientos ya mencionados. Estas modificaciones se realizan buscando un impacto en la gelatinización del almidón. No obstante, los distintos procesamientos afectan a la harina en su conjunto; por lo que podrían observarse cambios en su composición nutricional y características organolépticas no buscadas y debidas a otros constituyentes.

Las proteínas son biomoléculas y nutrientes esenciales cuya calidad es necesario mantener. No profundizar en el estudio de las proteínas de estas materias primas y centrarse sólo en la

ausencia de gluten limitaría el resultado de la investigación y la calidad del producto final. Por ello, este trabajo estudia las modificaciones a nivel proteico debidas a los tratamientos aplicados, aportando un nuevo enfoque a la investigación hasta ahora ya realizada y relacionándolo también con líneas de trabajo de otros equipos.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar el efecto a nivel proteico de los tratamientos microondas o ultrasonidos en las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz, para discutir la idoneidad del tratamiento aplicado. Se incluyen como objetivos secundarios:

- La optimización del procedimiento para el fraccionamiento proteico y evaluación de su efectividad.
- Caracterización proteica de las harinas nativas y tratadas con microondas o ultrasonidos.
- Optimización de las variables de estudio electroforético para cada harina.
- Análisis cualitativo de las estructuras de las harinas nativas y tratadas con microondas y ultrasonidos.

4. MATERIAL

4.1 HARINAS

- Harina de trigo sarraceno polaco (TS): de la variedad Kora, fue suministrado por Grupa Producentów Ekologicznych Dolina Grypki SP Z O (Miedzylesie, Polonia). Se obtuvo por molienda del grano con un molino Perten utilizando un tamiz de 1mm.
- Harina de maíz: fabricada en el Berrón, Asturias, España. Suministrado por ADPAN. Molida en molino de piedra.
- Harina de quinua: variedad Titicaca. Cultivada en Rodilana, Valladolid. La empresa suministradora fue "Extremeña arroces", Cáceres.

Su composición se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Composición proximal de las harinas nativas de trigo sarraceno, quinua y maíz.

	TS	Quinua	Maíz
Proteína (%)	12,63	14,04	7,73
Grasa (%)	3,01	5,53	3,5
Cenizas (%)	1,78	2,12	-
Humedad (%)	12,8	10,37	11,14

*Los valores de proteína, grasa y cenizas del TS y quinua fueron determinados por el laboratorio Agrolab Ibérica S.L.U en Burgos. Los valores de proteína y grasa del maíz fueron aportados por ADPAN. Los valores de la humedad de todas las harinas se determinaron tal y como indica el apartado 5.1

4.2 EQUIPOS Y MATERIAL FUNGIBLE (ANEXO IV)

4.3 REACTIVOS (ANEXO V)

5. MÉTODOS

5.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Se realizó mediante el método AACC Method 44-15.02, por pérdida de peso. Para ello, se pesan dos gramos de muestra en cápsulas de acero inoxidable con tapa que son introducidas en la estufa a 130°C durante 1 h con la cápsula abierta y la muestra bien distribuida. Transcurrido ese tiempo se sacaban de la estufa (Binder GmbH) y una vez tapadas se introducían en desecador hasta que alcanzaban la temperatura ambiente.

El porcentaje de humedad se estableció mediante el siguiente cálculo

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{peso de la cápsula+muestra})-(\text{peso cápsula+muestra desecada})}{\text{peso muestra}} \times 100$$

5.2 TRATAMIENTO DE LAS HARINAS

5.2.1 Humidificación de las harinas y tratamiento microondas.

En línea con el trabajo anterior de los investigadores, las harinas de pseudocereales y maíz fueron humedecidas hasta alcanzar una humedad del 30±0,5%, a partir de la humedad obtenida según lo indicado en el apartado 5.1, se calcula el agua a añadir con la siguiente fórmula:

$$\text{agua a añadir} = \frac{\text{Humedad buscada} \times \text{g harina} - \text{Agua de la harina}}{1 - \text{Humedad buscada}}$$

Con estos datos, se pulveriza poco a poco la cantidad de agua sobre la harina removiendo constantemente con la ayuda de una amasadora (Mezcladora-Batidora BEAR Varimixer Teddy). Una vez humedecida, la harina se envasa herméticamente en porciones de 100 gramos en bolsas de polipropileno y poliamida y se congela a -20°C hasta que se procede al tratamiento con microondas.

Las harinas fueron sometidas a un tratamiento hidrotérmico en microondas (SHARP R-314 IN (W)) al 900W de potencia máxima durante 24 minutos en ciclos de encendido/apagado de 20s/40s, sometiendo el recipiente a un giro continuo con un motor externo (worx D-LITE), en recipientes cilíndricos de polietileno cerrados por una película de papel film apto para microondas de cuatro capas agujereado para permitir la salida del vapor generado durante el proceso. La temperatura máxima que alcanza el tratamiento es de 150° C, aproximadamente. Una vez terminado el tratamiento, las muestras se mantuvieron en el microondas en giro continuo con la puerta abierta durante 15 minutos para su enfriamiento. Las muestras fueron

pesadas, y molidas (molino Fidibus Médium) hasta alcanzar un tamaño homogéneo y conservadas a temperatura ambiente hasta su análisis. En el caso de la quinua y el maíz, se observó la formación de aglomerados de harina durante la humidificación, cuyo interior mostraba un color más oscuro tras el tratamiento microondas que el resto de la harina, por lo que en un primer procedimiento se segregó el producto obtenido por tamizado (con un tamiz CISA) separando los aglomerados cuyo interior era más oscuro, y considerando como producto únicamente la harina de un tamaño $<250\ \mu\text{m}$ (MW-1). Se realizó un segundo tratamiento microondas cuyo producto fue triturado íntegramente, sin segregación de aglomerados oscuros (MW-2).

5.2.2 Tratamiento con ultrasonidos

La muestra al 10 % (p/v) (22,23 g de harina en 200 g de agua) fue tratada a 24 kHz (considerados ultrasonidos de potencia) durante 60 minutos al 80% (es decir, de cada segundo 0,8s está encendido y 0,2s apagado), a una temperatura de $20\pm 3^\circ\text{C}$, con una potencia máxima de 180 W en un equipo Hielscher UP400St con sonda de titanio S24d22D. Una vez terminado el tratamiento se liofilizó la harina, se hizo pasar a través de un tamiz (CISA) de $250\ \mu\text{m}$ para que la harina recuperase su forma original, y se mantuvo en refrigeración hasta su análisis.

5.3 FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE OSBORNE

Este fraccionamiento, publicado por Osborne en 1924, es frecuentemente empleado en el estudio de las proteínas vegetales, que se clasifican en 4 fracciones en función de su solubilidad:

- a) Albúminas (Ab): solubles en agua
- b) Globulinas (Gb): solubles en sal
- c) Prolaminas (Pl): solubles en alcohol
- d) Glutelinas (Gl): solubles en ácidos o bases. Suele considerarse como la fracción proteica remanente de las anteriores extracciones.

En este trabajo se separaron las fracciones en función de su solubilidad de la harina nativa y tratada de trigo sarraceno según el método propuesto por Adebawale, Emmambux, Beukes y Taylor, (2011), con posteriores modificaciones

A partir de 5 gramos de harina de harina sin desgrasar de trigo sarraceno nativa y tratada con microondas se realizaron las siguientes extracciones:

- 1) Extracción de albúminas: se disuelven 5 gramos de harina en 25 ml de agua destilada y se agita en un agitador de vaivén durante 1 h a 4°C . Después se centrifuga a 10000 g, 20 min a 4°C y se extrae el sobrenadante. Se repite este proceso 2 veces más para dializar

los 3 sobrenadante obtenidos contra 25 L de agua destilada a 4°C durante 72h con 2 cambios de agua, en unas tripas con un punto de corte de entre 12000 y 14000 kDa. El extracto dializado se congela a -20°C para liofilizarlo. Esa fracción liofilizada son las albúminas.

- 2) Extracción de globulinas: al pellet del último centrifugado de la extracción de las albúminas se le añaden 25 ml de NaCl 1,25 M y se somete a agitación continua en vaivén a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo centrifugamos a 12000g durante 35 min a 4°C, obteniendo el sobrenadante. Se repite una vez el proceso anterior y luego se realiza una agitación de 1 h a 4°C para centrifugarlo otra vez a 12000g durante 35 min a 4°C para obtener el tercer sobrenadante. Después se dializan los tres sobrenadantes contra 25 L de agua destilada a 4°C durante 48h con 3 cambios de agua. Al ser insolubles en agua destilada, durante la diálisis las globulinas precipitan, por lo que es necesario lavar bien la tripa antes de congelar su contenido para finalmente y liofilizarlo.

Después de esta extracción, lavamos el pellet con 25 ml de agua destilada sometiéndole a una agitación en vaivén de 1h y se centrifuga 20 minutos, desechando el sobrenadante obtenido.

- 3) Extracción de prolaminas: se realiza con un alcohol en este caso terbutanol al 60 % (v/v). Al pellet resultante del último lavado del paso 2) se le añaden 25 ml de este disolvente sometiéndole a agitación durante 1 hora y a centrifugación a 12000 g, 35 min 4°C, obteniendo así el primer sobrenadante. Se repite una agitación con posterior centrifugación en las mismas condiciones y se agita una tercera vez toda la noche, con posterior centrifugación a 12000 g, 35 min 4°C. Los tres sobrenadantes obtenidos son dializados contra 25 L de agua destilada durante 48 h con 2 cambios de agua.

- 4) Extracción de glutelinas: el pellet resultante de la última extracción, se resuspendió en 100 ml de agua destilada con 20 µL de amilasa (Termamyl 2X) y fue incubado toda la noche a 35°C. Después de este periodo, la prueba del Lugol fue realizada para comprobar la ausencia de almidón y cuando esta ausencia fue confirmada, se centrifugó a 10000g durante 20 min, desechando el sobrenadante obtenido. Se realizan tres lavados, necesarios para eliminar la enzima. Tras estos lavados se obtuvo un pellet que contenía las glutelinas. En el caso del trigo sarraceno tratado con microondas, esa cantidad de amilasa y ese tiempo no fueron suficientes eliminar el almidón y por tanto se dejó en incubación una mañana más con 1000 µL de amilasa.

Una vez liofilizadas, todas las fracciones obtenidas son conservadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis

Con respecto al procedimiento original, en las extracciones 2 y 3, se aumentó la velocidad y el tiempo de centrifugación de las 10000g y 20 min originales debido a la observación en el sobrenadante de partículas en suspensión.

En el **Anexo I** se adjunta un diagrama de flujo del procedimiento del fraccionamiento proteico de Osborne para facilitar el seguimiento del proceso.

5.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE).

La electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) se empleó para separar las proteínas de las harinas nativas, tratadas con microondas o ultrasonidos y de las fracciones proteicas del TS en función de su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico en condiciones desnaturalizantes, según el método Laemmli (1970) utilizando un equipo Electrophoresis power supply EPS301 y vertical electrophoresis sistem Hoefer miniVE. El tampón empleado en la dilución de las muestras de proteínas en el gel para su posterior análisis fue en ocasiones PLBx5, cuya composición se indica en la **Tabla 2**, o PLBx1 (dilución 5 veces del x5). Las electroforesis fueron realizadas en condiciones reductoras, para lo cual el tampón de carga contenía 2-ME y en condiciones no reductoras, en las que el tampón de carga no tenía este compuesto. Todas las electroforesis de este trabajo se realizaron a una intensidad de 300V y 25mA por gel durante 1h y 15 min, aproximadamente, con un gel de apilamiento o stacking del 4% y un gel de desarrollo o resolving del 12,5%. La composición de estos geles se indica en el **anexo VI**.

Tabla 2: Composición PLBx5

	Cantidad usada PLBX5	Concentración Final PLBX5
Tris 1M pH 6.5	1,56 mL	312,5 mM
SDS (dodecil sulfato sódico)	0,5 g	10%
Glicerol	2,5 mL	50%
2-ME(*)	1,25 mL	25%
Azul de bromofenol 2%	16 µL	0,00625 %
Agua ultrapura MQ (**)	1,25 mL	25%

* Aporta al gel las condiciones reductoras.

Después, la tinción del gel se realizó con Comassie Brilliant Blue durante 20 minutos y su desteñido fue realizado con agua destilada para poder fotografiar las bandas proteicas. Las fotos de dichas tinciones fueron realizadas con el equipo El logic 100 imaging system (Kodak) con trans-iluminación y se compararon los pesos moleculares de las bandas obtenidas con un patrón estándar de pesos moleculares (Thermo Scientific protein biology): β -galactosidasa (116 kDa),

albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), lactato deshidrogenada (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

5.5 TRATAMIENTO CON UREA.

Este tratamiento fue realizado con objeto de mejorar la extracción de las proteínas en las harinas tratadas con microondas para descartar una ausencia de las bandas proteicas por una extracción no suficientemente potente, ya que la urea es un agente desnaturizante muy potente. Para ello, se preparan una disolución de urea 8M en la que luego se diluyen las muestras de las harinas a analizar; para cada dilución se emplearon 120 mg de harina tratada y 4 ml de urea 8M

Como esta concentración de urea es demasiado elevada para poder realizar una electroforesis, se dializan las disoluciones de urea en medio litro de agua destilada con las muestras hasta conseguir una concentración final óptima cercana a 0,5M. El producto obtenido de la diálisis es agitado con un agitador de vaivén a 4°C durante una noche y centrifugado posteriormente durante 50 minutos.

Después, lo mezclamos con PLBx5 en una proporción 4:1, respectivamente. Se somete a extracción durante 24h y después se realiza la electroforesis descrita en el apartado 5.4. En cada pocillo se pinchan 20 μ l, por lo que, a partir de los datos de la Tabla 1 se calcula que en cada pocillo hay una cantidad de proteína de 60 μ g de trigo sarraceno, 67 μ g de quinua y 37 μ g de maíz.

5.6 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

Esta técnica termoanalítica se emplea en las harinas nativas y tratadas con microondas. En la calorimetría de barrido diferencial se someten una referencia y una determinada muestra a un incremento constante de temperatura y se determina la diferencia de flujo calorífico entre ambas, que se expresa en una curva. Los picos observados en esta curva corresponden a liberación de energía o absorción de energía por la muestra, dependiendo de si el proceso es exotérmico o endotérmico. Así, pueden estudiarse los cambios de fase o la estabilidad de ciertos compuestos, ya que además de indicarnos la temperatura a la que suceden dichos procesos podemos calcular la entalpia de estos integrando el área bajo la curva correspondiente.

Los análisis fueron realizados en las harinas nativas y tratadas con microondas en un equipo DSC 3 STAR* System (Mettler Toledo). Se pesaron 10-15 mg de cada harina en cápsulas de aluminio de 40 μ L de volumen en ausencia de agua (cada una con su humedad de equilibrio), para evitar la gelatinización del almidón. Las muestras fueron calentadas de 0 a 200°C a una velocidad constante de 5°C/min bajo un flujo de N₂ de 50 mL/min

5.7 COLORIMETRÍA

Se realizó el estudio del color de las harinas de trigo sarraceno, quinua y maíz nativas y tratadas con microondas y, además, las muestras de quinua y trigo sarraceno tratadas con ultrasonidos. Para este procedimiento empleamos un colorímetro PCE-CSM5 (Tobarra, Albacete). Los resultados, promedio de 5 mediciones, se obtuvieron usando un observador patrón 10º y un iluminante patrón D65 y se expresaron en coordenadas del espacio CIE L*a*b. Los valores L*, a* y b* fueron obtenidos directamente mediante el colorímetro. Los valores de h y C* se calcularon a partir de las anteriores empleando las siguientes ecuaciones (1) y (2), respectivamente. La ecuación 3 corresponde a la diferencia de color entre dos muestras, empleada para valorar los cambios de color en conjunto.

$$(1) h = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

$$(2) C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$(3) \Delta E: [(\Delta L^*) + (\Delta a^*) + (\Delta b^*)]^2$$

L* es la luminosidad del color (acromática); valores cercanos a 100 indicarían luz blanca y valores cercanos a 0 rendimientos negros. C* es la saturación o croma y nos da idea de la viveza del color. h es el tono del color. Valores de h=0 indica tono rojo; h=90 tono amarillo; h=180 tono verde y h=270, tono azul.

5.8 ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

Las harinas nativas y tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz, las tratadas con ultrasonidos de quinua y trigo sarraceno y las fracciones proteicas de este último fueron analizadas por el sistema de espectrofotometría Tensor 27 FTIR (Bruker), con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), que mide los cambios que se producen en un haz de infrarrojos reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra. Los espectros resultantes fueron observados con el software OPUS (versión 6.5). La FTIR fue realizada con un total de 64 scans con un rango de barrido de entre 600-4000 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ en el modo absorbancia.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) de todos los datos obtenidos en la colorimetría con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc). Los datos se compararon mediante la prueba LSD de Fisher (p < 0,05) para comprobar la existencia de diferencias significativas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detallan, analizan y discuten los resultados obtenidos de los métodos empleados para obtener una valoración del impacto producido en las proteínas, así como una valoración de las propias técnicas de análisis. Los resultados son comparados con otros autores para relacionarlos con las investigaciones realizadas hasta el momento, a fin de obtener una visión más completa de los resultados.

6.1 CAMBIOS EN LA HUMEDAD CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

Los tratamientos microondas y ultrasonidos, así como otros procedimientos necesarios para estos tratamientos, modificaron el contenido en humedad de las muestras (**Tablas 3 y 4**). El tratamiento con ultrasonidos y la liofilización posterior hacen que la humedad de la harina tras el tratamiento sea inferior a la del tratamiento microondas, incluso en aquel que sí contiene las partes quemadas. Este último tiene una humedad inferior a la del primer tratamiento, por lo que los agregados formados, al ser incluidos, disminuyen la humedad media de las harinas MW-2.

Tabla 3: humedad de las harinas nativas y tratadas con MW

Muestra	Humedad nativa (%)	Humedad previa al tratamiento microondas (%)	Humedad postratamiento microondas (%)
Quinoa (MW-1)	10,37	29,79	9,02
Quinoa (MW-2)	10,37	29,79	8,11
Trigo Sarraceno	12,86	30,04	9,07
Maíz MW-1	11,14	30,16	7,92
Maíz MW-2	11,14	20,16	5,58

*donde MW-1 se corresponde con el primer tratamiento de la harina y MW-2 se corresponde con el segundo tratamiento de la harina, que contiene también las partes quemadas.

Tabla 4: humedad de las harinas nativas y tratadas con US

Muestra	Humedad nativa (%)	Humedad tras tratamiento US y liofilización (%)
Quinoa	10,37	7,40
Trigo Sarraceno	12,86	6,69

6.2 IMPACTO DE LOS TRATAMIENTOS EN EL PERFIL PROTEICO.

6.2.1 Optimización de las condiciones de análisis.

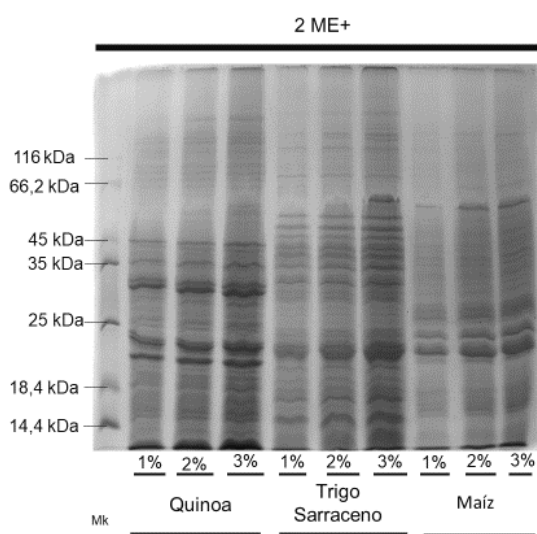


Figura 1: Análisis de las concentraciones de estudio en condiciones reductoras de las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz. De izquierda a derecha, marker, quinua (1, 2 y 3%), trigo sarraceno (1,2,3%) y maíz (1,2,3 %)

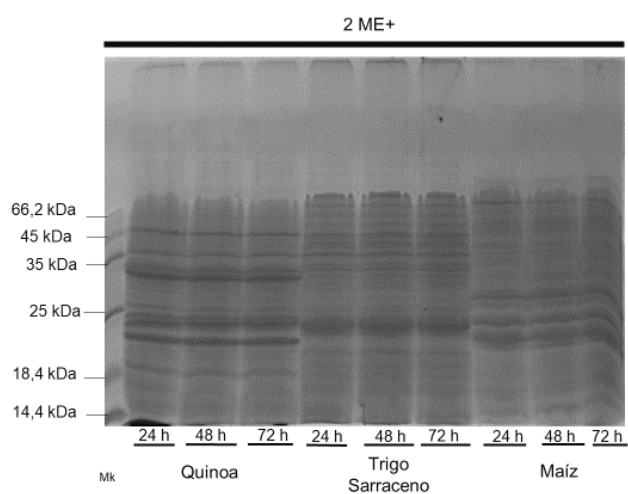


Figura 2: Análisis en condiciones reductoras de las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz con diferentes tiempos de extracción. De izquierda a derecha; marker, quinua (24,48,72 h), trigo sarraceno (24,48,72 h) y maíz (24, 48 y 72h)

Para que las condiciones de estudio permitieran realizar unas correctas observaciones, se realizó un análisis previo de las condiciones de concentración de la muestra y del tiempo de extracción con el PLB para la electroforesis SDS-PAGE.

En cuanto a la concentración de las muestras (**Figura 2**), a pesar de que cada tipo de harina tiene distinta concentración de proteína, los mejores resultados de entre las tres concentraciones comparadas se obtenían con un 3% de concentración de las muestras; por lo que en todas las electroforesis se emplearon 3 mg de la harina

estudiada y 100 µl de PLB; en cada pocillo se pipetearon 15 µl de la disolución de la harina con el buffer, por lo que, a partir de los datos de la **Tabla 1**, se calculó que la cantidad de proteína final en cada pocillo fue de 63 µg para la quinua, 56 µg para el

trigo sarraceno, y 34 µg para el maíz.

El análisis de los diferentes tiempos de extracción (**Figura 2**) mostró que no se apreciaban diferencias en cuanto a la obtención de resultados según el tiempo de extracción, por lo que el resto de las electroforesis se realizaron con un periodo de extracción de 24 h y PLBx1. También el tiempo de ebullición fue determinado en 5 minutos y la centrifugación de las muestras de electroforesis se realizó siempre a 20000g durante 5 minutos.

6.2.2 Análisis de la composición proteica de los extractos crudos de las harinas de quinua, trigos sarraceno y maíz. Efecto del tratamiento con microondas.

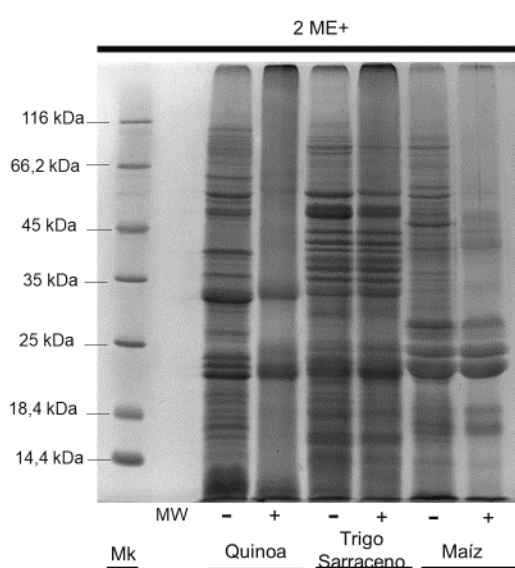


Figura 3: Electroforesis en condiciones reductoras de las harinas nativas y tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz. De izquierda a derecha, harina de quinua MW-2 (nativa y tratada, trigo sarraceno (nativa y tratada) y maíz MW-2 (nativa y tratada)

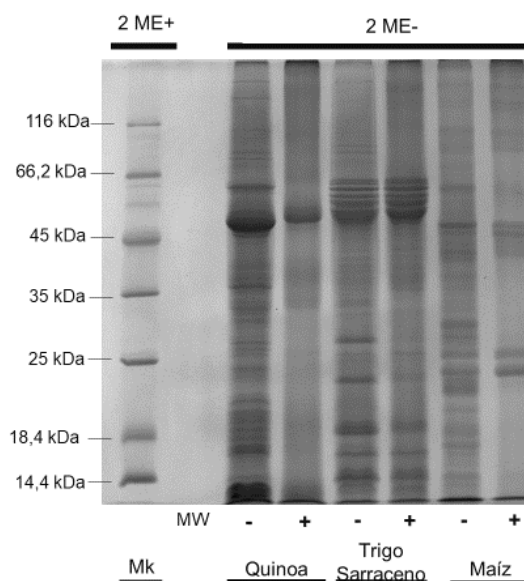


Figura 4: Electroforesis en condiciones no reductoras de las harinas nativas y tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz. De izquierda a derecha, harina de quinua MW-2 (nativa y tratada, trigo sarraceno (nativa y tratada) y maíz MW-2 (nativa y tratada)

La caracterización de las proteínas de las muestras se realizó en condiciones reductoras y no reductoras, para estudiar los cambios observados en la extracción debidos a un agente capaz de romper los puentes disulfuro. Una vez caracterizada las proteínas, se destacan los cambios visibles en las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz, tras la aplicación del tratamiento microondas. Estos cambios no afectan por igual a todas las muestras y, para mejor comprensión de los resultados, se detallan los cambios una a una.

6.2.2.1 Quinua

La quinua, en una primera electroforesis, parecía ser la más afectada por el tratamiento microondas. Sin embargo, se hipotetizó que estas pérdidas podían deberse a la eliminación por tamización de una serie de granos, ya mencionados, formados durante la humidificación de la harina y quemados con el tratamiento microondas. Para descartar este efecto, se realizó una electroforesis en las mismas condiciones de ambas partes (los aglomerados y la harina de tamaño menor de 250µm), como se muestra en la **Figura 5**, y se repitió el tratamiento, pero moliendo la integridad de la harina resultante (**Figuras 3 y 4**). Tras esto, se concluyó que no había diferencias entre el perfil proteico de los aglomerados oscuros y el resto de la harina. Tampoco se observaron diferencias entre el perfil electroforético obtenido entre el producto segregado o el producto íntegro.

A partir de estos resultados, el resto de la electroforesis y pruebas se realizó con la harina procedente del segundo tratamiento (MW-2), considerado más representativo por los investigadores. En el perfil proteico en condiciones reductoras de la quinua (**Figura 6**) se observan bandas de desde los 116 kDa hasta por debajo de 14,4 kDa. La mayor intensidad de estas bandas se aprecia en 3 zonas claramente diferenciadas: por debajo de 14,4 kDa, entre 20 y 25 kDa y entre 30 a 39 kDa. A su vez, en condiciones no reductoras (**Figura 7**) la banda con mayor intensidad y grosor se corresponde con un peso molecular que sería cercano a 50 kDa. Estos pesos moleculares corresponderían a la Chenopodina, la principal proteína de la quinua. Esta proteína se caracteriza por tener un peso molecular de 320 kDa que

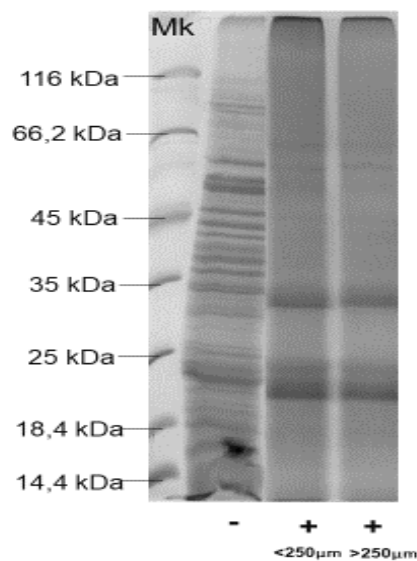


Figura 5: Electroforesis en condiciones reductoras de la harina de quinua tratada con microondas y segregada (MW-1). De izquierda a derecha harina nativa de quinua, harina no quemada de quinua y de tamaño <250µm, y aglomerados formados durante el proceso de >250µm

consiste en 6 subunidades cuyo peso está entre los 52 y 59 kDa (correspondiente a la intensidad de la banda principal del gel no reductor). A su vez, cada una de estas 6 subunidades está compuesta por dos polipéptidos, uno llamada α (de entre 30-40 kDa y predominancia de aminoácidos ácidos) y uno llamada β (de entre 20-25 kDa y predominancia de aminoácidos básicos). Ambos polipéptidos están unidos por enlaces disulfuro, de ahí que se corresponda por las dos bandas observadas con mayor intensidad en condiciones reductoras. Las otras bandas con intensidad, por debajo de los 14,4 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, corresponden a la albúmina 2S (Janssen *et al.*, 2017).

Con el tratamiento microondas, observamos una ausencia de bandas en el perfil proteico con respecto a la nativa; a excepción de la Chenopodina (**Figuras 6 y 7**), una globulina que parece ser la principal proteína de reserva de este pseudocereal. Una pequeña banda que parece conservarse entre los 45 y 66 kDa (cerca de los 50 kDa) podría ser una Chenopodina que no fue procesada postsintéticamente (Brinegar & Goundan, 1993).

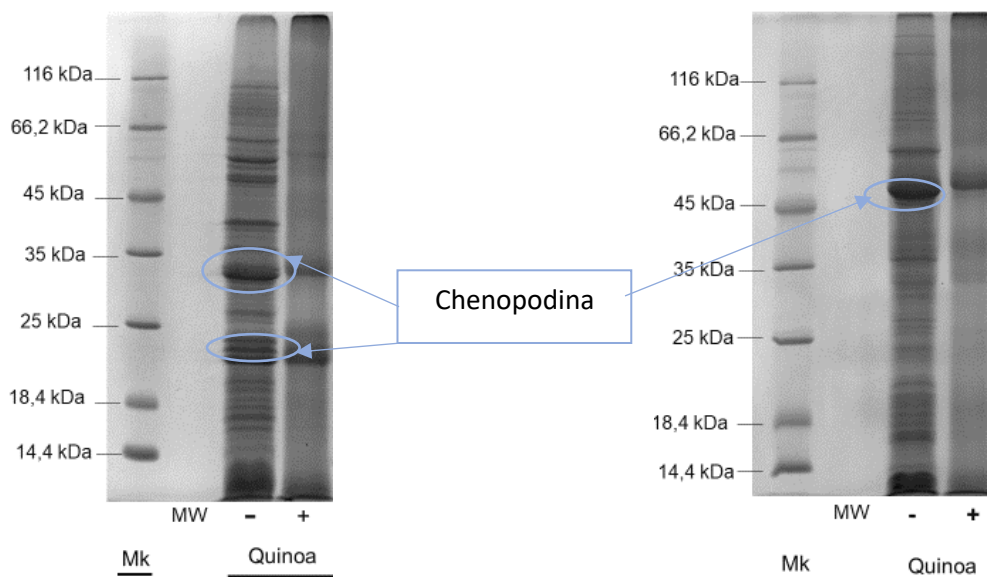


Figura 6: (ampliación figura 4) Perfil proteico de la harina de quinua nativa y tratada con microondas (MW-2) en condiciones reductoras.

Figura 7: (ampliación figura 5) Perfil proteico de la harina de quinua nativa y tratada con microondas (MW-2) en condiciones no reductoras.

6.2.2.2 Maíz

Al observarse una disminución del número e intensidad de bandas en el maíz tratado al microondas, se repitió el procedimiento de análisis como en la quinua; es decir, se analizaron por separado los agregados cuyo tamaño era mayor de $>250 \mu\text{m}$ y el resto de la harina (MW-1) resultante del tratamiento. También se repitió el tratamiento microondas y se molió el producto íntegro (MW-2), que fue el utilizado en el resto de las pruebas como representativo al observar igual que en el caso anterior, que no había diferencias entre estas partes (**Figura 8**)

En el maíz en condiciones reductoras se observa una mayor concentración de bandas desde los 66,2 kDa hasta los 14,4 kDa. En estas mismas condiciones con el tratamiento, se observa una pérdida o disminución de la intensidad de las bandas desde 45 kDa hasta cerca de los 66 kDa. Se mantienen las bandas de mayor intensidad con un peso molecular menor de 25 kDa y entre que podrían corresponderse con las zeinas (de 22 kDa, 19 kDa, 17 kDa y 15 kDa), las principales prolaminas y proteínas de reserva

del maíz (Erny, Marina, & Cifuentes, 2007). No obstante, estas pérdidas en el perfil proteico

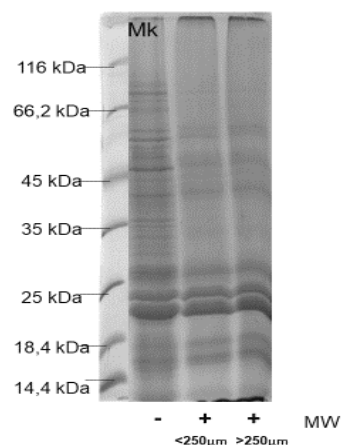


Figura 8: Análisis del maíz en condiciones reductoras tratado con microondas y segregada (MW-1). De izquierda a derecha harina nativa de maíz, harina no quemada de maíz y de tamaño $<250 \mu\text{m}$, y aglomerados formados durante el proceso de $>250 \mu\text{m}$

son menores que en la quinua, puesto que se observan mayores diferencias entre la tratada y la harina nativa que en esta que para el maíz.

6.2.2.3 Trigo sarraceno

Las proteínas nativas del trigo sarraceno tienen pesos moleculares desde 116 kDa hasta aproximadamente los 14,4 kDa en condiciones reductoras. Hay un gran número de bandas desde 66,2 kDa hasta pesos moleculares inferiores a 25 kDa. Los principales cambios observados en condiciones reductoras (**Figura 3**) tras el tratamiento microondas están en dos bandas, la de 116 kDa y en otra por encima de 66,2 kDa, que están ausentes en la harina tratada. También pierde en intensidad en algunas bandas en torno a 14,4 kDa. La caracterización de las proteínas se pormenoriza a continuación, con el estudio de las fracciones proteicas.

6.2.2.4 Fracciones proteicas del trigo sarraceno

El proceso de preparación estas muestras fue algo distinto de las anteriores. Se disolvieron 4 mg de cada liofilizado en 200 μ L de PLBx1 sin 2-ME para obtener una solución de 20 μ g/ μ L. De esta dilución se cogen 40 μ L y se diluyen en 120 μ L de PLB con o sin 2-ME en función de las condiciones del gel (reductor o no reductor). Con esta dilución 5 μ g/ μ L se cargó en cada pocillo

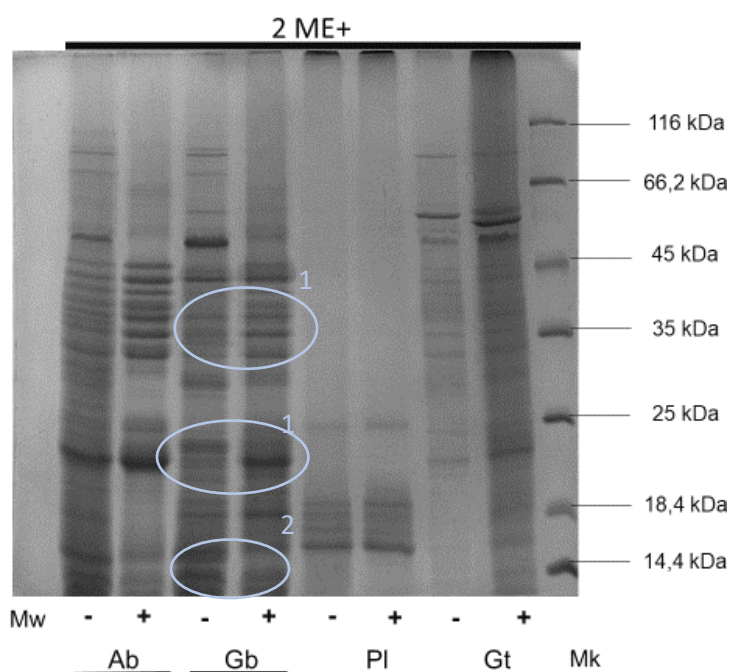


Figura 9: Análisis de las fracciones proteicas del trigo sarraceno en condiciones reductoras. De izquierda a derecha albúminas (nativas y tratadas), globulinas (nativas y tratadas), prolaminas (nativas y tratadas) y glutelinas nativas y tratadas, marker

75 μ g. Igualmente, las muestras fueron sometidas a una ebullición posterior de 5 min y una centrifugación de 5 min a 2000 g.

Albúminas: Las bandas observadas por debajo de 14,4 kDa en el gel en condiciones reductoras y de 16 kDa en condiciones no reductoras podrían corresponder con las albúminas 2S (Radovic, Maksimovic, Brkljacic, Varkonji Gasic, & Savic, 1999). Las diferencias en el perfil proteico de esta fracción en la literatura son

consistentes. Javornik, 2014, encontró 8 bandas de peso molecular entre 17 y 67 kDa, pero Tang & Wang solo encontraron las bandas correspondientes a las albúminas 2S. Por tanto, podría

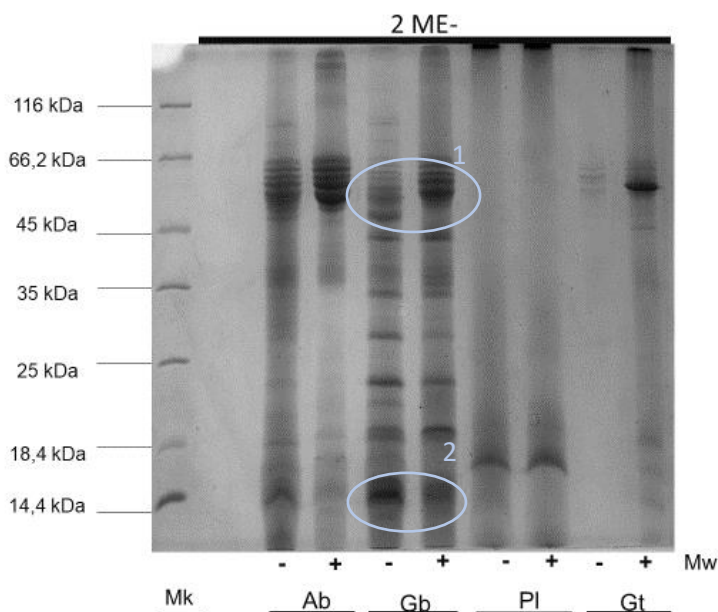


Figura 10: Análisis de las fracciones proteicas del trigo sarraceno en condiciones no reductoras. De izquierda a derecha, marker, albúminas (nativas y tratadas), globulinas (nativas y tratadas), prolaminas (nativas y tratadas) y glutelinas (nativas y tratadas)

No obstante, al extraer primero las albúminas con agua destilada y luego las globulinas con NaCl 0,5M también parece obtenerse una única albúmina (Tang & Wang, 2010). Estos últimos, centrifugaron a menor velocidad, agitaron solo durante 1h, pero con una proporción muestra disolvente 1:5 p/v, mientras que en el procedimiento seguido en el apartado 5.3 la proporción es 1:4 p/v.

Globulinas: distinguimos 3 tipos de globulinas (Janssen *et al.*, 2017). Globulinas 13S, parecidas a las del mismo tipo de las leguminosas. Cada una consta de dos polipéptidos una ácida de entre 30-38 kDa y una básica de entre 23 y 25 kDa unidas por puentes de disulfuro (**Figuras 9 y 10 indicadas como 1**). La bibliografía también describe unas globulinas 8S, similares a la vicilina, constituidas por subunidades de alto (57- 58 kDa) y bajo (26-36 kDa) peso molecular. Un tercer y último tipo son las globulinas 2S: proteínas solubles en sal similares a las albúminas 2S (**Figuras 9 y 10 indicadas como 2**).

Prolaminas: se observan bandas de entre 14 y 18 kDa y una banda en torno a 25 kDa en condiciones reductoras y en condiciones no reductoras una única banda entre 18,4 y 14,4 kDa. Otros autores (Nałęcz, Dziuba, Minkiewicz, Dziuba, & Szerszunowicz, 2009) encontraron proteínas con un peso molecular de entre 22, 32, 39, 50, 59 kDa mientras que Javornick & Kreft (1984), encontraron una única banda en torno a los 17 kDa.

pensarse que el resto de las bandas observadas, al coincidir con las también observadas en las globulinas, pueda deberse a que los límites para la extracción de las fracciones no estén bien diferenciados. Cada autor realizó de forma diferente la obtención de las albúminas; tanto Radovic, Maksimovic, Brkljacic, Varkonji, Gasic y Savic, (1999) como Javornick y Kreft, (1984) extrajeron a la vez las globulinas y las albúminas y luego las

Glutelinas: en condiciones reductoras se observan bandas de por encima de los 14,4 kDa hasta los 66,2 kDa, mientras que en condiciones no reductoras solo se observan dos bandas una cercana a los 55 kDa y otra por debajo de los 25 kDa. La diferencia en la intensidad de las bandas entre nativa y tratada puede deberse a la diferencia en el tiempo y cantidad de amilasa empleada en su extracción, mayor en el caso de la fracción de la harina tratada con microondas y detallada en el **apartado 5.3, extracción 4**. Esta diferencia podría ocasionar una mayor proporción de otros hidratos de carbono distintos al almidón para la fracción de las glutelinas de la harina nativa con respecto a aquella denominada tratada.

Las fracciones proteicas parecen no estar bien diferenciadas según el esquema de Osborne, ni en literatura ni en este estudio. Pese a las diferencias en bibliografía, se observa mayor cantidad de bandas en las fracciones de las albúminas y globulinas, por lo que se confirma que son sus proteínas mayoritarias. En cuanto a los cambios observados tras el tratamiento microondas, que se aprecia una ausencia de bandas con un peso molecular superior a 66,2 kDa en condiciones reductoras tanto en la fracción de albúminas como de globulinas. A pesar de estas pérdidas, parece ser la harina menos afectada en cuanto a perfil proteico.

6.2.2.4 Tratamiento con urea y resumen del impacto observado

Los cambios observados tras el tratamiento microondas en las harinas de trigo sarraceno y quinua, coinciden con las observaciones de otros investigadores bajo las mismas condiciones de tratamiento microondas (Manso, 2018). Al tratar semillas de soja con microondas, pero a baja humedad, también se observó una disminución del número e intensidad de bandas en condiciones reductoras y no reductoras (Mizutani et al., 2019). Sin embargo, la falta de humidificación previa al tratamiento, la menor potencia del tratamiento, el reducido tiempo de este (40s) y la diferencia del tipo de materia prima, dificultan extraer cualquier relación o comparación del efecto del tratamiento sobre las proteínas con los resultados expuestos en este trabajo.

Tras observar que el tratamiento microondas afectaba el perfil proteico de las harinas, sobre todo de quinua y maíz, se realizó un tratamiento con urea descrito en el **apartado 5.5** para intentar mejorar la extracción de las proteínas y descartar su ausencia de la electroforesis por

problemas en la extracción, ya que se observan unos acúmulos en la parte superior de los geles

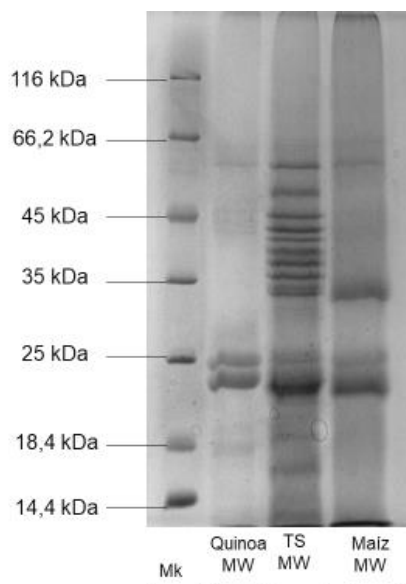


Figura 11: Electroforesis del tratamiento de urea de las harinas tratadas con microondas de quinua, trigo sarraceno y maíz en condiciones reductoras

(Figuras 3 y 4) que pueden ser agregados de proteína que el PLBx1 no es capaz de extraer. No obstante, el resultado fue una menor extracción de las proteínas de las harinas tratadas (Figura 11), que no permite mejorar el resultado de la solubilización de las proteínas en el PLBx1, y permanece la duda acerca de qué ha pasado con dichas proteínas. Este efecto es distinto para cada pseudocereal, pero el maíz y la quinua comparten un mayor impacto, como ya se ha explicado anteriormente.

6.2.3 Efecto del tratamiento con ultrasonidos

Las muestras nativas y tratadas con ultrasonidos de quinua y trigo sarraceno fueron ajustadas en peso por humedad, ya que de lo contrario el perfil proteico de las tratadas aparecía con mayor intensidad. Después de este ajuste, no se observan apenas cambios en el perfil proteico de las harinas tras el tratamiento con ultrasonidos. Excepto en la banda de proteínas más cercana a 116 kDa, tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras (Figuras 12 y 13). En relación con estos resultados, tras tratar aislados de proteína de quinua con ultrasonidos con diferentes tiempos, no se observaron pérdidas de perfil proteico, aunque con menor tiempo, y mayor potencia y con varios tiempos. Más concretamente 700W, 20kHz y un máximo de 30 min (Vera et al., 2019). A su vez, la afectación del perfil de la quinua tratada con ultrasonidos es muy inferior a la tratada con microondas, mientras que este impacto es igual para ambos tratamientos en el caso del trigo sarraceno.

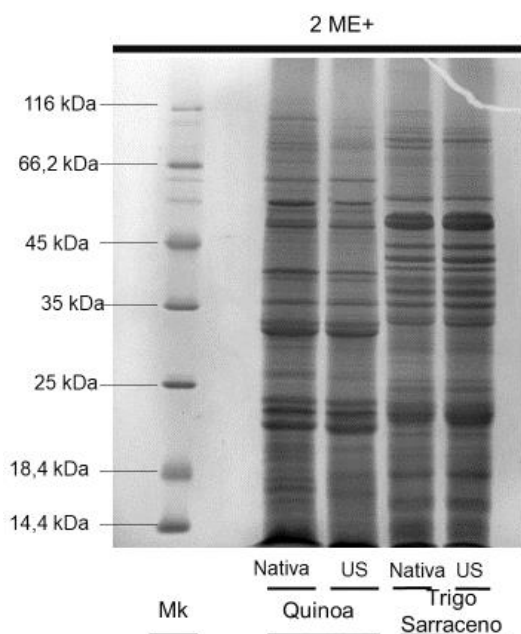


Figura 12: Efecto del tratamiento ultrasonidos en harinas de quinua y trigo sarraceno en condiciones reductoras. De izquierda a derecha marker, harina de quinua (nativa y tratada con ultrasonidos), harina de trigo sarraceno (nativa y tratada con ultrasonidos).

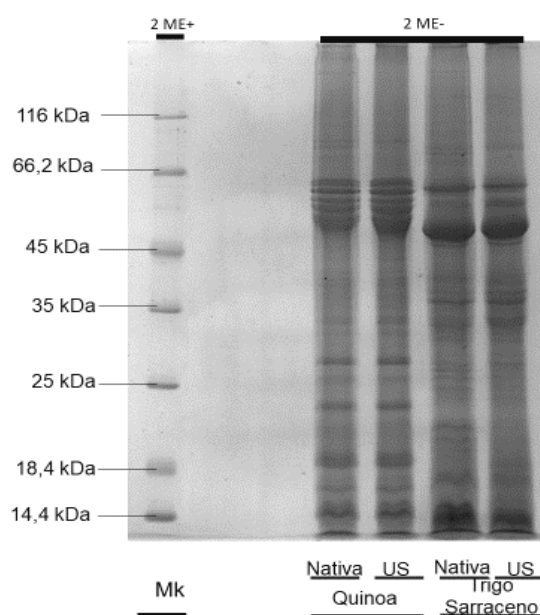


Figura 13: Efecto del tratamiento ultrasonidos en harinas de quinua y trigo sarraceno en condiciones no reductoras. De izquierda a derecha, marker, harina de quinua (nativa y tratada con ultrasonidos), harina de trigo sarraceno (nativa y tratada con ultrasonidos).

6.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FÍSICOS SOBRE EL COLOR DE LAS HARINAS

En la **Tabla 5** se exponen los datos medios obtenidos en la colorimetría de las todas harinas nativas y tratadas con microondas realizada según **el punto 5.7**. Las letras que acompañan a estos valores son los grupos homogéneos obtenidos tras el ANOVA e indican si estas medidas son significativamente diferentes entre sí con una probabilidad del 95%; los valores con una letra en común en la misma columna no muestran diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

En vista de estos resultados, podemos decir que no hay diferencias significativas en cuanto a luminosidad (L^*) entre el maíz y el maíz MW-1. Sin embargo, el resto de las muestras tratadas sí tuvo diferencias significativas en comparación con sus nativas; y todas se oscurecían (su L^* era inferior). Los tratamientos ultrasonidos producen un cambio en la luminosidad menor que el tratamiento microondas (su incremento es de entre 12 y 17 para microondas frente a un 2,3 en ultrasonidos en quinua y 11,4 para microondas y 2,4 en ultrasonidos para TS). Estudios previos de tratamiento hidrotérmico (HMT) de almidón de TS sometido a tratamiento hidrotérmico encontraron un oscurecimiento de la harina, más marcado cuanto mayor era la temperatura del tratamiento (Sindhu, Devi, & Khatkar, 2019). Sin embargo, el cambio de L^* fue inferior al obtenido en nuestras muestras, lo que teniendo en cuenta que el tiempo de tratamiento fue muy inferior en nuestro caso con respecto a las 6h descritas por Sindhu *et al* (2019); el mayor oscurecimiento de nuestras harinas podría explicarse por la presencia de otros componentes, como las proteínas. En el caso de la harina (completa) de quinua tratada con ultrasonidos otros autores encontraron oscurecimientos poco marcados, mayores cuanto mayor era el tiempo del tratamiento (Zhu & Li, 2019).

Todas las muestras presentaron tonos (h) comprendidos entre 0 y 90 grados, lo que significa que tuvieron tonalidades entre el rojo y el amarillo. En general el tono (h) de las harinas disminuye su valor con el tratamiento hidrotérmico (HMT); y más, en el caso de las harinas molidas íntegramente sin selección alguna de partículas. Nos encontramos, otra vez, con que este cambio es mayor en el tratamiento microondas que en el ultrasonido, en el que los cambios son muy ligeros.

En el caso de la saturación (C^*), también podemos decir que aumenta en el caso de las harinas tratadas con microondas; salvo en el maíz. La saturación con respecto a la nativa de la harina de este cereal que ha sufrido el tratamiento MW-1 disminuye ligeramente y para el tratamiento MW-2 el incremento obtenido no es significativo. Por el contrario, la C^* de las harinas tratadas con ultrasonidos disminuye con respecto a sus nativas, de forma ligera pero significativa.

Tabla 5: Cambios en el color de las distintas harinas observados en el tratamiento.

Muestra	Tratamiento	L*	ΔL^*	a*	b*	C*	h	ΔE nativas
Maíz	nativa	77,67 fg	--	4,83 e	27,98 i	27,90 g	80,07 i	---
Maíz	MW-1	76,54 ef	1,1	5,56 f	26,28 gh	26,87 f	78,05 h	2,17
Maíz	MW-2	73,73 d	3,9	8,56 h	26,81 h	28,14 g	72,29 d	5,55
Quinoa	nativo	75,95 e	--	3,34 d	13,13 d	13,55 d	75,72 f	---
Quinoa	MW-1	63,76 b	12,2	11,77 i	25,66 f	28,23 g	65,36 b	19,4
Quinoa	MW-2	58,9 a	17,1	13,85 j	26,26 g	29,68 h	62,20 a	23,94
Quinoa	US	73,65 d	2,3	2,82 c	11,23 c	11,58 c	75,89 f	3,02
TS	nativo	80,91 h	--	2,01 a	8,34 b	8,58 b	76,46 g	---
TS	MW	69,56 c	11,4	6,20 g	14,16 e	15,46 e	66,35 c	13,42
TS	US	78,54 g	2,4	2,35 b	7,72 a	8,07 a	73,06 e	2,47
SE		0,52		0,07	0,20	0,15	0,15	

L* es luminosidad (coordinada acromática); a* y b* coordinadas cromáticas; C* es la saturación o croma y h es el tono; ΔE : diferencia entre la muestra nativa y el correspondiente tratamiento. MW-1 tratamiento microondas con segregación de fracción gruesa. MW-2 tratamiento microondas con producto íntegro (ver sección de materiales y métodos); TS: trigo sarraceno. ΔL^* : Diferencia entre la luminosidad de la muestra tratada y la correspondiente nativa; SE: Error estándar agrupado obtenido del análisis ANOVA. Valores en columna sin ninguna letra en común son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para entender mejor estos cambios y diferencias entre tratamientos de forma global, debemos fijarnos en la diferencia de color entre dos muestras (ΔE), puesto que en caso de que sea inferior a 3 se considera una diferencia apenas perceptible. Ambos tratamientos con ultrasonidos tienen una diferencia casi inapreciable, pero los tratamientos microondas sí provocaron cambios perceptibles en el color de la harina, siendo el cambio menos intenso en el maíz intermedio en el trigo sarraceno y muy marcado en la quinua. Además, los tratamientos que contienen la harina íntegra tratada, sin segregar las partes más oscuras, tienen más diferencia de color con respecto a la nativa que el primer tratamiento, y una diferencia de entre 4,14 para el maíz y 5,32 en el caso de la quinua (datos no mostrados en la tabla) con respecto al tratamiento que no contiene los aglomerados oscuros. Por tanto, la molienda del producto íntegro provoca un cambio en la diferencia de color similar en ambas harinas. Se obtiene como conclusión que la harina que en conjunto es más diferente en color y tiene cambios más marcados para los valores L*, a* y b* es la quinua homogeneizada con los aglomerados más oscuros.

El oscurecimiento y formación de compuestos de color pardo pueden estar atribuidos al pardeamiento no enzimático o Reacción de Maillard. Este conjunto de reacciones se produce entre una amina principalmente primaria y azúcares, dando como resultado la formación de melanoidinas. La cantidad de melanoidinas formadas depende del tipo de hidratos de carbono,

tipo de aminoácidos, tiempo y temperatura de cocción y actividad de agua, entre otros (Chen et al., 2019) . Estos cambios de color son más marcados en las harinas de pseudocereales que en el maíz, probablemente, por su mayor contenido proteico (**Tabla 1**). No es posible establecer, no obstante, una relación directa entre el efecto en el perfil proteico de cada muestra tratada con microondas puesto que tanto los tratamientos MW-1 como MW-2 obtuvieron un perfil con SDS-PAGE idénticos pero los cambios de color son más marcados en el caso de los tratamientos que contenían el producto íntegro (MW-2)

6.4 RESULTADOS OBTENIDOS CON FTIR.

Los resultados de FTIR nos permiten analizar el espectro resultante de la radiación con infrarrojos de una muestra; que permite hacer un estudio cualitativo de las distintas estructuras químicas de las mismas y observar modificaciones tras el tratamiento. Se estudiaron, sobre todo, las señales de las regiones localizadas según Pretsch *et al* como tensión del enlace C-O de los carbohidratos (840-1170 cm^{-1}), señal de los hidroxilos de los carbohidratos (1200-1400 cm^{-1}), tensión de los grupos amido I y II de las proteínas, (1740-1630 cm^{-1} y 1630-1510 cm^{-1} , respectivamente) grupos metileno de los lípidos (2700-3000 cm^{-1}) y la señal de los grupos N-H y H-O de amidas y lípidos (3000-3700 cm^{-1}). Para resumir mejor los resultados los agruparemos en dos: aquellos de las harinas nativas y tratadas y los procedentes de las fracciones proteicas.

6.4.1 Harinas

Se corroboró la composición de las harinas nativas, pudiéndose observar que la que tenía mayor proporción de carbohidratos es la harina de maíz (observando las señales de entre 840-1170 cm^{-1} Y 1200-1400 cm^{-1} , correspondientes a grupos propios de los hidratos de carbono) mientras que la que mayor contenido en proteínas (observando las señales de entre 1740-1630 cm^{-1} y 1630-1510 cm^{-1} , tensión de los grupos amido I y II de las proteínas) y lípidos (observando, la señal correspondiente a los grupos metileno de los lípidos, entre 2700-3000 cm^{-1}) es la harina de quinua. La harina de trigo sarraceno presenta una señal intermedia de hidratos de carbono y proteínas (**Figura 14**).

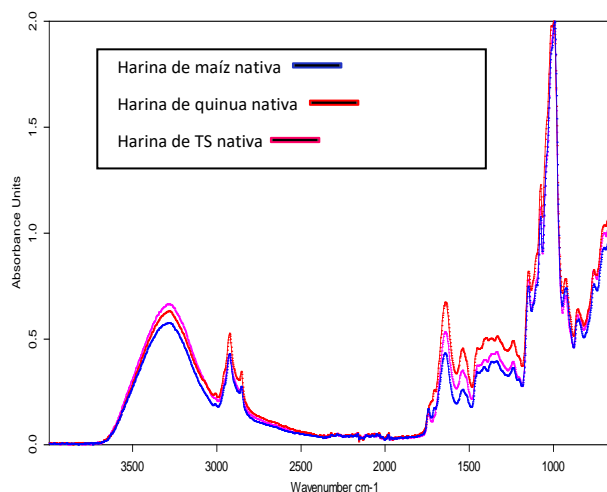


Figura 14: Espectros de FTIR de las harinas nativas de maíz, quinua y TS

Por otra parte, la comparación de los espectros normalizados de las harinas nativas, tratadas con microondas y ultrasonidos, no mostró diferencias significativas; observándose una proporción similar de las distintas estructuras moleculares presentes en las harinas (**Figura 15 y anexo II**). Por tanto, a nivel cualitativo, no se observan cambios tras el tratamiento ultrasonidos o microondas.

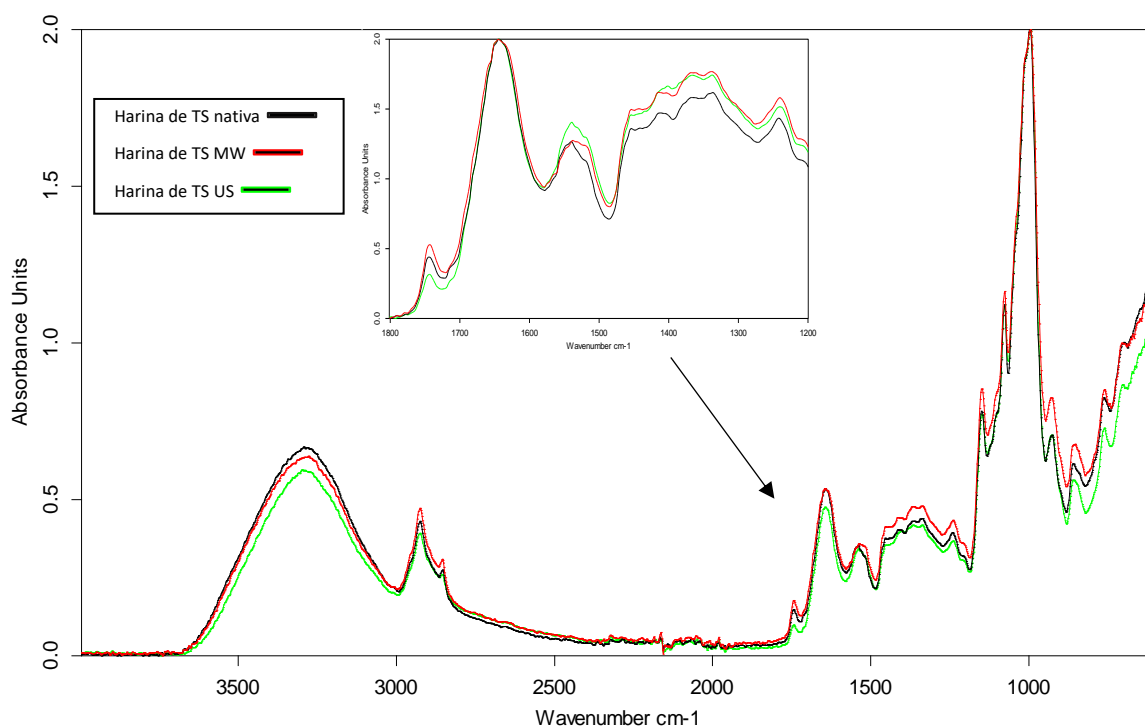


Figura 15: Espectro de FTIR de las harinas de TS nativa (negro) y tratada con microondas (rojo) y ultrasonidos (verde). Ampliación de la longitud de onda correspondiente a los enlaces amido I (1740-1630 cm⁻¹) y II (1630-1510 cm⁻¹).

6.4.2 Fracciones proteicas del trigo sarraceno

Los resultados de su análisis no dejaron lugar a dudas de la existencia en estas muestras de otros compuestos, debido a la presencia de enlaces no propios de las proteínas. Esta afirmación se puede realizar al comparar dichos espectros con el de albúmina sérica bovina pura (BSA). De hecho, todas las fracciones proteicas obtenidas a partir del TS presentan señales pertenecientes a estructuras químicas que podrían ser de hidratos de carbono observando las señales de entre 840-1000 cm⁻¹, tensión del enlace C-O, y 1200-1400 cm⁻¹, señal de los grupos hidroxilo, (**Figura 16**). Además, las prolaminas tienen una mayor proporción de enlaces que puedan pertenecer a estructuras de lípidos teniendo en cuenta la mayor señal de esta fracción entre 2700-3000 cm⁻¹, perteneciente a los grupos metileno de los lípidos (**Figura 16**). Estos lípidos probablemente se hayan extraído con las prolaminas debido al agente extractor utilizado (tercbutanol). En general

la señal correspondiente a las fracciones proteicas de la harina nativas y tratada con microondas de trigo sarraceno no tuvo diferencias significativas, salvo en el caso de las globulinas. La fracción de las globulinas de la harina tratada con microondas con respecto a la nativa obtuvo mayor señal en la región 1200 a 1400 cm^{-1} correspondientes a enlaces propios de hidratos de carbono, y menor en la región comprendida entre 3000-3700 cm^{-1} correspondiente a la señal de los grupos N-H y H-O de amidas y lípidos (**Figura 17, b**). Esto indica una ligera, aunque mayor proporción de proteínas frente a carbohidratos en las globulinas de la harina tratada con microondas con respecto a esta misma proporción para las globulinas de la harina que no han sufrido tratamiento, a pesar de que en la extracción de ambas fracciones fue idéntica y simultánea. Esto podría explicar la ligera, aunque mayor intensidad de las bandas observadas en esta fracción respecto a su correspondiente nativa en las **Figuras 9 y 10** con la misma concentración de muestra para ambas.

Por lo que respecta a la fracción de las glutelinas, también se observó una disminución de la señal propia de las proteínas en el espectro FTIR de dichas glutelinas nativas, comprobado una vez normalizadas y comparando con el resto de las fracciones obtenidas por el método de

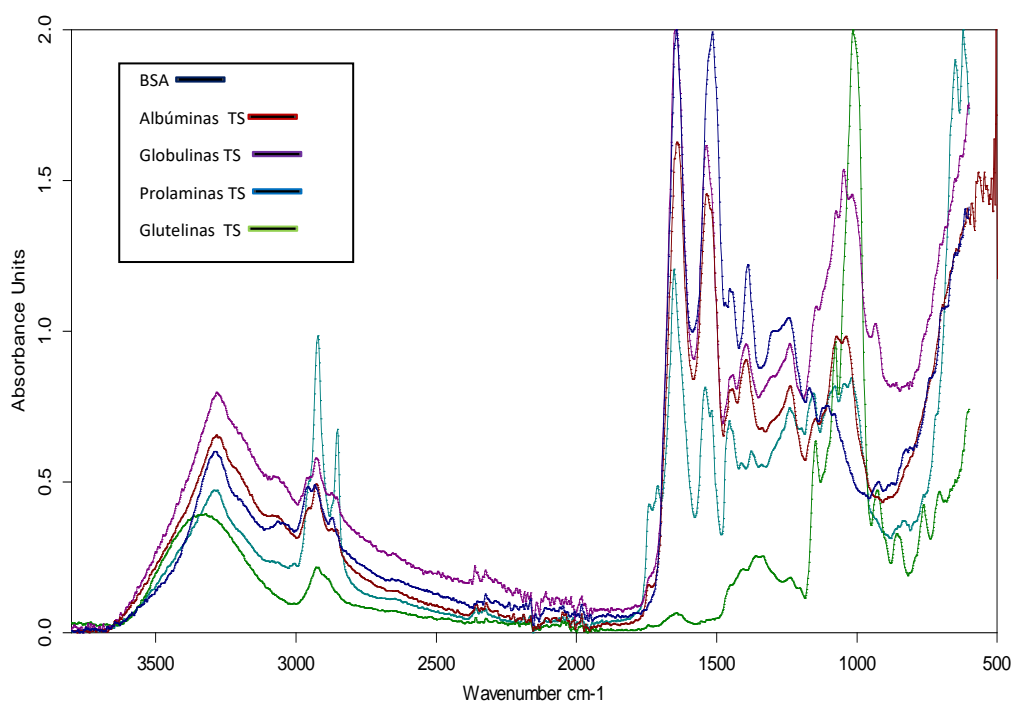


Figura 16: Espectro de FTIR de BSA y de las fracciones proteicas del TS y BSA.

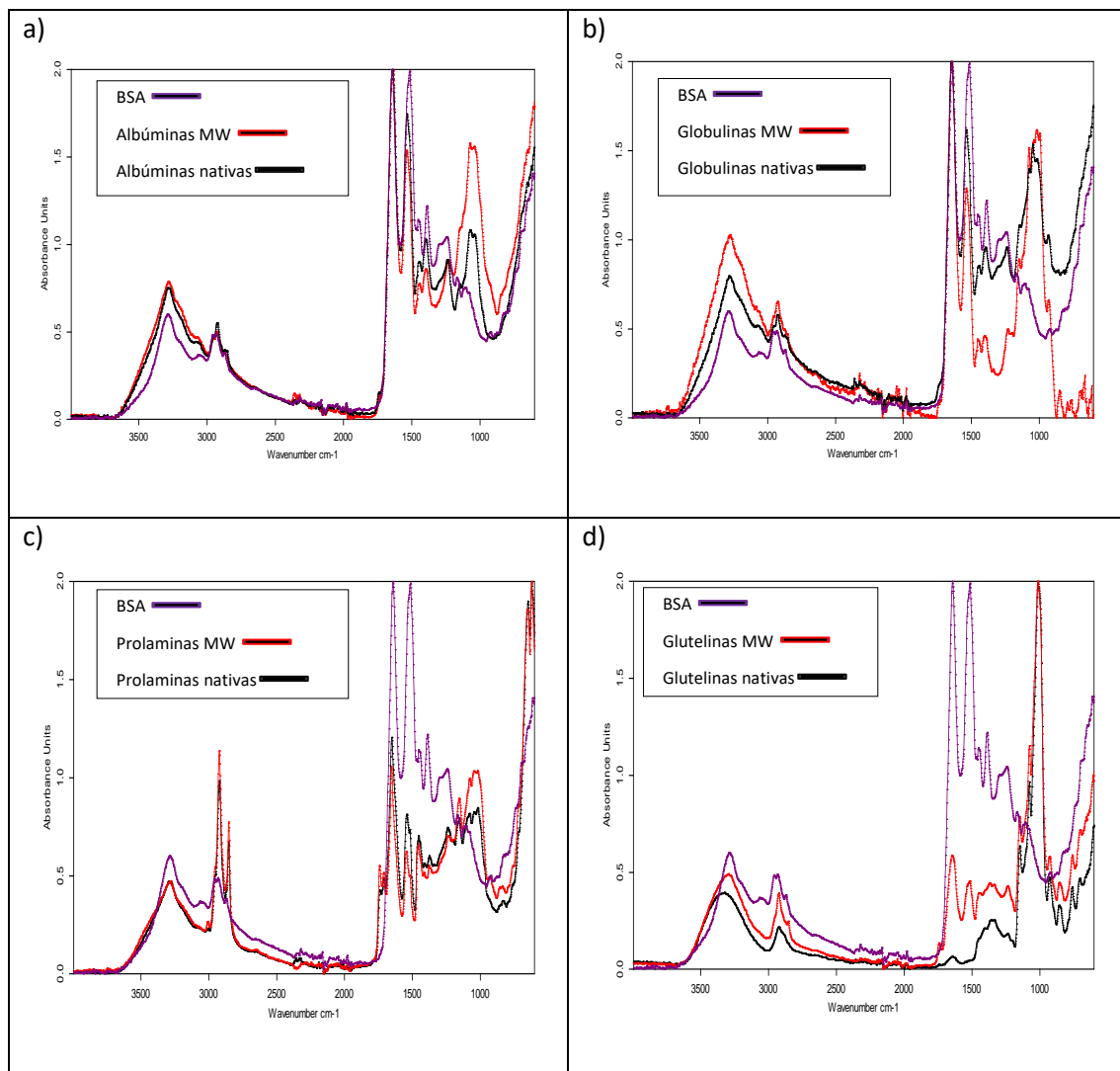


Figura 17: Espectro de FTIR de las fracciones proteicas de TS nativas (negro) y tratadas con microondas (rojo) y comparación con BSA (morado). De izquierda a derecha y de arriba abajo (a) albúminas, (b) globulinas, (c) prolaminas, (d) glutelinas.

Osborne (**Figura 16**). Por lo que respecta a la fracción tratada con microondas, la señal correspondiente a las proteínas es mayor y, sin embargo, disminuye la señal de carbohidratos (**Figura 17, d**). Puesto que las fracciones nativas y las tratadas con microondas fueron sometidas a los mismos procesos para su fraccionamiento, salvo en la cantidad de amilasa y el tiempo empleado para obtener esta fracción; parece ser que a mayor tiempo de acción de la amilasa utilizado en la fracción llamada microondas, conduce a una mayor eliminación de dicho almidón. (a pesar de que la prueba de Lugol fuera negativa en ambos casos). Estas observaciones presentan similitud con las realizadas en el **apartado 6.2.2** sobre la diferente intensidad de las bandas observadas entre ambas fracciones, nativa y tratada. Por tanto, la muestra nativa presenta más proporción de hidratos de carbono en relación con las proteínas; es decir, que su fraccionamiento no ha sido adecuado.

6.5 PRINCIPALES OBSERVACIONES OBTENIDAS CON DSC

Se llevó a cabo el análisis del comportamiento de las harinas de quinua, trigo sarraceno y maíz nativas y tratadas con microondas a temperaturas de hasta 200°C y sin agua. Como resultado, se observaron 3 picos en el caso del TS y el maíz nativo y 2 para la quinua, que sufrieron modificaciones en el caso de sus homólogas tratadas con microondas (**Tabla 6**). Los termogramas de las harinas nativas y tratadas con microondas obtenidos con DSC se adjuntan en el **Anexo III**.

En el caso del trigo sarraceno, un primer pico fue observado a una temperatura de 55,8°C en el caso de la harina nativa y a 56,41°C en el caso de la tratada con microondas, cuya entalpía es también mayor. Se observa un segundo pico a los 83,62°C en el caso de la nativa, que desaparece en la harina tratada. Según un estudio en el que se realizó la DSC de las proteínas de trigo sarraceno con un tampón fosfato 0,5M se obtuvo un pico en torno a 80°C que indican podrían corresponder a las globulinas 8S (Tang, 2007). Este estudio no nos permite determinar que ese pico se corresponda con dichas globulinas por la ausencia de la solubilización de la harina en un medio en nuestro caso, que es un factor de estudio determinante. En la quinua se observó un primer pico (**Tabla 6**) en torno a los 48°C y cuya entalpía era de 2,01 J/g muestra un incremento de ambos valores en el caso de la harina tratada con microondas. Para ambos pseudocereales tratados respecto a los nativos, se comprueba que es necesaria más energía para que tenga lugar este primer proceso endotérmico. El maíz muestra 3 picos (**Tabla 6**), el primero de ellos a los 62,56°C, cuya temperatura y entalpía son inferiores en el caso de la tratada con microondas. Este cambio tiene un sentido contrario al observado en los pseudocereales. Un segundo pico fue observado en el termograma del maíz a los 85,22°C que desaparecía en el caso de la harina tratada con microondas.

El pico observado a mayor temperatura en las tres muestras podría deberse a la fusión de la amilopectina (Maache-Rezzoug, Zarguili, Loisel, Queveau, & Buléon, 2008)(Biliaderis, 2009).

En vista de los resultados obtenidos, se observan distintos efectos del tratamiento microondas para cada una de las muestras. No obstante, es común a las tres muestras la permanencia del primer pico, aunque haya cambiado su temperatura y entalpía. La desaparición del segundo pico en todas las muestras tratadas probablemente indique una irreversibilidad de este proceso, sea cual sea.

Un segundo barrido en las harinas nativas fue realizado para comprobar la reversibilidad de todos los procesos observados y el resultado fue la ausencia de picos en este segundo barrido (**Figuras 25 y 26, anexo II**), por lo que una vez que la muestra alcanza una temperatura de 200°C

estos procesos, sean cuales sean, no parecen ser reversibles. Sin embargo, pueden aparecer algunos picos observados en las harinas nativas tras el tratamiento microondas (el primero y el segundo en el TS y maíz y ambos en la quinua) porque este tratamiento alcanza una temperatura cercana a los 150°C. Este efecto puede verse también en ciertas proteínas; por ejemplo, se observó que la reversibilidad de la desnaturalización de la albúmina sérica bovina era menor cuanto mayor era la temperatura de calentamiento a la que había sido sometida (Michnik, 2003).

Tabla 6: Principales resultados de la DSC.

	H%	ΔH_1 (J/g bs)	Tp ₁ (°C)	ΔH_2 (J/g bs)	Tp ₂ (°C)	ΔH_3 (J/g bs)	Tp ₃ (°C)
TS Nativo	12,86	0,90	55,8	0,06	83,62	283,44	155,16
TS MW	9,07	1,35	56,41	-	-	162,34	159,89
Quinua Nativa	10,37	2,01	48,23	-	-	212,16	163,8
Quinua (MW-2)	8,11	3,95	55,9	-	-	128,44	167,85
Maíz nativo	11,14	1,34	62,56	0,37	85,22	232,55	161,34
Maíz (MW-2)	7,92	0,80	52,58	-	-	111,15	175,83

*Donde H% es la humedad de la muestra, ΔH la entalpía del proceso, bs significa base seca y TP es la temperatura del pico

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado el impacto del tratamiento microondas y de ultrasonidos sobre la fracción proteica de harinas sin gluten de quinua, trigo sarraceno y maíz, concluyéndose que:

1. Un periodo de extracción de la muestra con el PLB de 24h y una concentración del 3% (p/v) de muestra/PLBx1 son suficientes para un correcto análisis proteico mediante SDS-PAGE.
2. El perfil proteico obtenido mediante SDS-PAGE de las harinas tratadas con microondas presentaba mayores cambios en las bandas para las harinas de quinua, seguidos del maíz que eran apenas apreciables en el trigo sarraceno.
3. La ausencia de bandas en las harinas de quinua y maíz tratadas con microondas puede deberse a un cambio en la solubilidad de las proteínas que dificulta su extracción con PLBx1. El tratamiento con urea 8M tampoco mejoró la extracción de las proteínas.

4. El impacto del tratamiento ultrasonidos sobre el perfil proteico sarraceno fue inapreciable para ambas harinas y mucho menor que en el microondas en el caso de la quinua.
5. Las fracciones proteicas más predominantes en la harina de TS son las albúminas y globulinas, lo que concuerda con las fuentes bibliográficas. Sin embargo, pese a la modificación del fraccionamiento, este método no es efectivo para la extracción pura de fracciones, debido a la presencia detectada de carbohidratos y lípidos.
6. El fraccionamiento proteico de Osborne puede requerir nuevos cambios o adaptaciones para el estudio del trigo sarraceno. El agua destilada y el NaCl 1,25M no mostraron la selectividad deseada debido a la presencia de ciertas proteínas en ambas extracciones.
7. La Reacción de Maillard probablemente intervenga en los cambios de color de las harinas y ocurre en ambos tratamientos. El oscurecimiento y los cambios de color son mayores en las harinas tratadas con microondas que en el caso de las tratadas con ultrasonidos.
8. No se puede establecer una relación directa entre el efecto en el perfil proteico de cada muestra tratada obtenido con SDS-PAGE con sus cambios de color. Los cambios de color son más marcados en el caso de los tratamientos que contenían el producto íntegro, pero no había diferencias entre el perfil proteico de ambos tratamientos (MW-1 y MW-2).
9. Los espectros de las harinas nativas y tratadas no indicaron modificaciones cualitativas de los grupos funcionales observados tras los distintos tratamientos.
10. Los resultados de la calorimetría diferencial de barrido no permiten establecer conclusiones con respecto a los cambios proteicos de las harinas tratadas con microondas.
11. Se requieren nuevos trabajos que mejoren el conocimiento actual de los cambios proteicos de las harinas tratadas con microondas, sobre todo, mejorando su extracción.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adebowale, A. E. (2011). Fractionation and characterization of teff proteins. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.08.002>
- Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. (2018). Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein-Rich Ingredients. *Foods*, 7(5), 73. <https://doi.org/10.3390/foods7050073>
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014>
- ArentzHansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E. A., Jørgensen, T. J. D., ... Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803-809. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35381>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schierberle, P. (2011). *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 32, 78-81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Biliaderis, C. G. (2009). and Related Physical Properties of Starch. En *Starch*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00008-2>
- Brinegar, C., & Goundan, S. (1993). Isolation and Characterization of Chenopodin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 182-185. <https://doi.org/10.1021/jf00026a006>
- Chen, W., Ma, X., Wang, W., Lv, R., Guo, M., Ding, T., ... Liu, D. (2019). Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 95(October 2018), 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.030>
- Comisi, & Europea, P. (2014). *Reglamento de ejecución (UE) N o 828/2014 de la Comisión*. 2014, 2014-2017.
- Coronel Rodríguez, C., Espín Jaime, B., & Guisado Rasco, M. (2015). Enfermedad celiaca. *Pediatr Integral* 2015, 102-118.
- Czaja-Bulsa, G. (2015). Non coeliac gluten sensitivity - A new disease with gluten intolerance. *Clinical Nutrition*, 34(2), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.08.012>
- El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I. J. (2018). A review on the gluten-free diet: Technological and nutritional challenges. *Nutrients*, 10(10), 1-25. <https://doi.org/10.3390/nu10101410>
- Elgeti, D., Nordlohne, S. D., Föste, M., Besl, M., Linden, M. H., Heinz, V., Becker, T. (2014). Volume and

- texture improvement of gluten-free bread using quinoa white flour. *Journal of Cereal Science*, 59(1), 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.010>
- Erny, G. L., Marina, M. L., & Cifuentes, A. (2007). CE-MS of zein proteins from conventional and transgenic maize. *Electrophoresis*, 28(22), 4192-4201. <https://doi.org/10.1002/elps.200700323>
- Federación de Asociaciones de Celíacos de España. (2016). *Informe de precios sobre productos sin gluten 2019*. 1-6.
- Giménez-Bastida, J. A., & Zieliński, H. (2015). Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7896-7913. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02498>
- Jambrak, A. R., Herceg, Z., Šubarić, D., Babić, J., Brnčić, M., Brnčić, S. R., ... Gelo, J. (2010). Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.051>
- Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J. A., Deleu, L. J., & Delcour, J. A. (2017). Proteins of Amaranth (*Amaranthus* spp.), Buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and Quinoa (*Chenopodium* spp.): A Food Science and Technology Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 39-58. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12240>
- Javornick, B., & Kreft, I. (1984). Characterization of buckwheat protein.
- Liu, W., Brennan, M., Serventi, L., & Brennan, C. (2017). Buckwheat flour inclusion in Chinese steamed bread: potential reduction in glycemic response and effects on dough quality. *European Food Research and Technology*, 243(5), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2786-x>
- Maache-Rezzoug, Z., Zarguili, I., Loisel, C., Queveau, D., & Buléon, A. (2008). Structural modifications and thermal transitions of standard maize starch after DIC hydrothermal treatment. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 802-812. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.047>
- Manso, S. (2018). *Modificación de harinas sin gluten de alto valor nutricional por tratamiento microondas. Efecto sobre las fracciones proteicas*. Valladolid.
- Melini, V., & Melini, F. (2019). Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients*, 11(1), 170. <https://doi.org/10.3390/nu11010170>
- Michnik, A. (2003). Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 71(2), 509-519. <https://doi.org/10.1023/A:1022851809481>
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2018). Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 75(Marzo), 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.016>
- Mizutani, Y., Shibata, M., Yamada, S., Nambu, Y., Hirotsuka, M., & Matsumura, Y. (2019). Effects of heat

- treatment under low moisture conditions on the protein and oil in soybean seeds. *Food Chemistry*, 275(Septiembre 2018), 577-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.139>
- Moscoso J., Felipe, Quera P., R. (2015). *Enfermedad celiaca. Revisión*. 26(5), 613-627. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872016000200010>
- Nałęcz, D., Dziuba, J., Minkiewicz, P., Dziuba, M., & Szerszunowicz, I. (2009). Identification of oat (*Avena sativa*) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) proteins and their prolamin fractions using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *European Food Research and Technology*, 230(1), 71-78. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1143-8>
- Padalino, L., Conte, A., & Del Nobile, M. (2016). Overview on the General Approaches to Improve Gluten-Free Pasta and Bread. *Foods*, 5(4), 87. <https://doi.org/10.3390/foods5040087>
- Pretsch, E., Seibil, J., Simon, W., & Clerc, T. (s.f.). *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Madrid: Alhambra
- Radovic, R. S., Maksimovic, R. V., Brkljacic, M. J., Varkonji Gasic, I. E., & Savic, P. A. (1999). 2S albumin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1467-1470. <https://doi.org/10.1021/jf980778s>
- Roman, L., Belorio, M., & Gomez, M. (2019). Gluten-Free Breads: The Gap Between Research and Commercial Reality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12437>
- Schober, T. J. (2009). Manufacture of Gluten-Free Specialty Breads and Confectionery Products. En *Gluten-Free Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1002/9781444316209.ch9>
- Sindhu, R., Devi, A., & Khatkar, B. S. (2019). Physicochemical, thermal and structural properties of heat moisture treated common buckwheat starches. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2480-2489. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03725-6>
- Sohaimy, S., Mohamed, S., Shehata, M., Mehany, T., & Zaitoun, M. (2018). Compositional Analysis and Functional Characteristics of Quinoa Flour. *Annual Research & Review in Biology*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/38435>
- Špaleková, A., & Gálová, Z. (2018). Comparison of american and european maize (*Zea mays* L.) protein profiles. *Journal of Central European Agriculture*, 19(2), 453-465. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/19.2.2147>
- Sun, X., Li, W., Hu, Y., Zhou, X., Ji, M., Yu, D., ... Luan, G. (2018). Comparison of pregelatinization methods on physicochemical, functional and structural properties of tartary buckwheat flour and noodle quality. *Journal of Cereal Science*, 80, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.016>
- Tang, C. H. (2007). Thermal properties of buckwheat proteins as related to their lipid contents. *Food Research International*, 40(3), 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.014>

- Vera, A., Valenzuela, M. A., Yazdani-Pedram, M., Tapia, C., & Abugoch, L. (2019). Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51(October 2018), 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.026>
- Villanueva, M., Harasym, J., Muñoz, J. M., & Ronda, F. (2018). Microwave absorption capacity of rice flour. Impact of the radiation on rice flour microstructure, thermal and viscometric properties. *Journal of Food Engineering*, 224, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.030>
- Vivodík, M., Gálová, Z., Balážová, Ž., Petrovicová, L., & Hložáková, T. K. (2016). Genetic variation and relationships of old maize genotypes (*Zea mays* L.) detected using sds-page. *Potravinárstvo*, 10(1), 532-536. <https://doi.org/10.5219/661>
- Zhu, F., & Li, H. (2019). Modification of quinoa flour functionality using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52(October), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.027>

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I: DIAGRAMA DE FLUJO DEL FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE OSBORNE

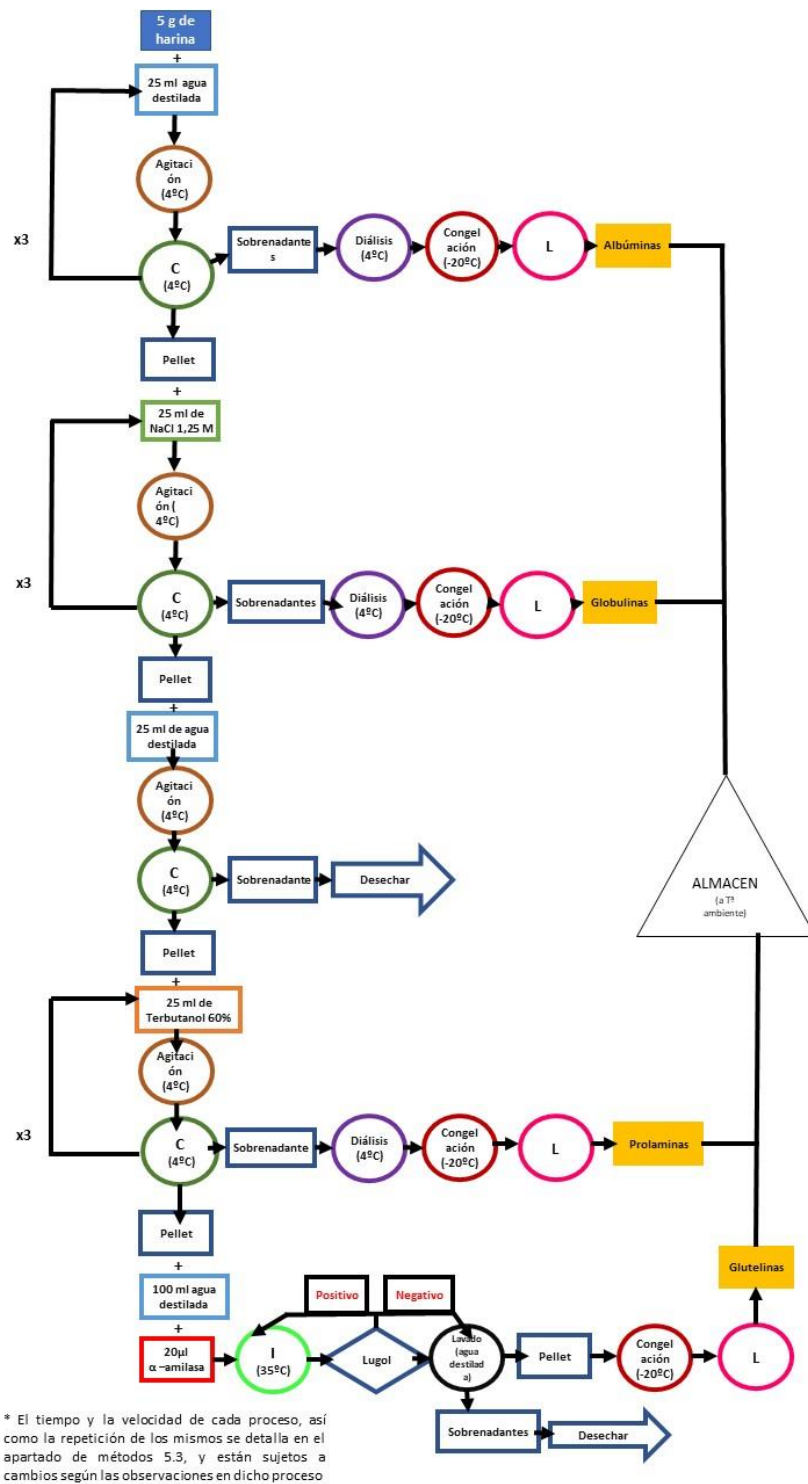


Figura 18: Diagrama de flujo del procedimiento de fraccionamiento proteico de Osborne. C es centrifugación, L, liofilización e I incubación.

9.2 ANEXO II: ESPECTROS OBTENIDOS EN FTIR

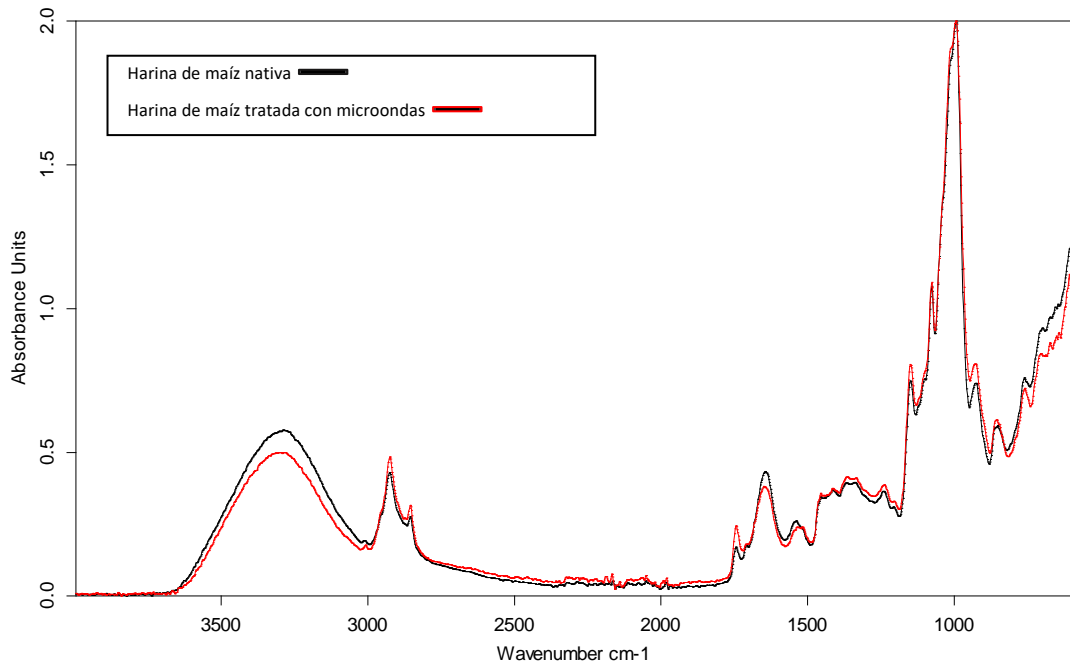


Figura 19: Espectro FTIR de la harina nativa de maíz (negro) y de la harina de maíz tratada con microondas (rojo)

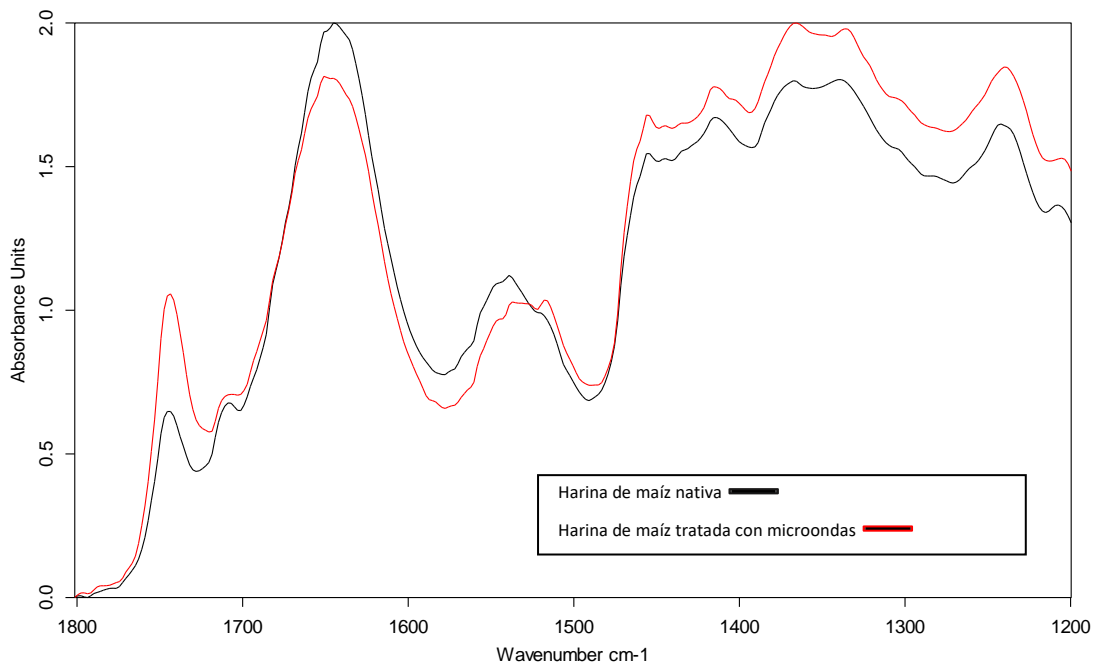


Figura 20: Ampliación de la región amido I (1740-16030 cm^{-1}) y amido II (1630-1510 cm^{-1}) de las harinas de maíz nativa (negro) y tratada con microondas (rojo)

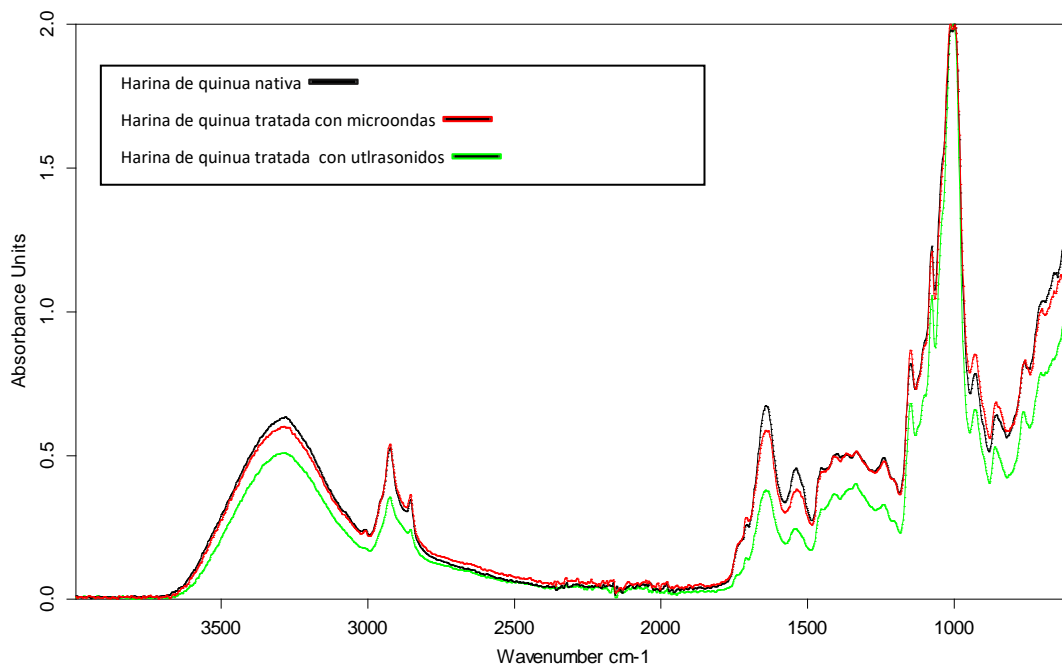


Figura 21: Espectro FTIR de la harina nativa de quinua (negro) y de la harina de quinua tratada con microondas, MW-2 (rojo) y tratada con ultrasonidos (verde)

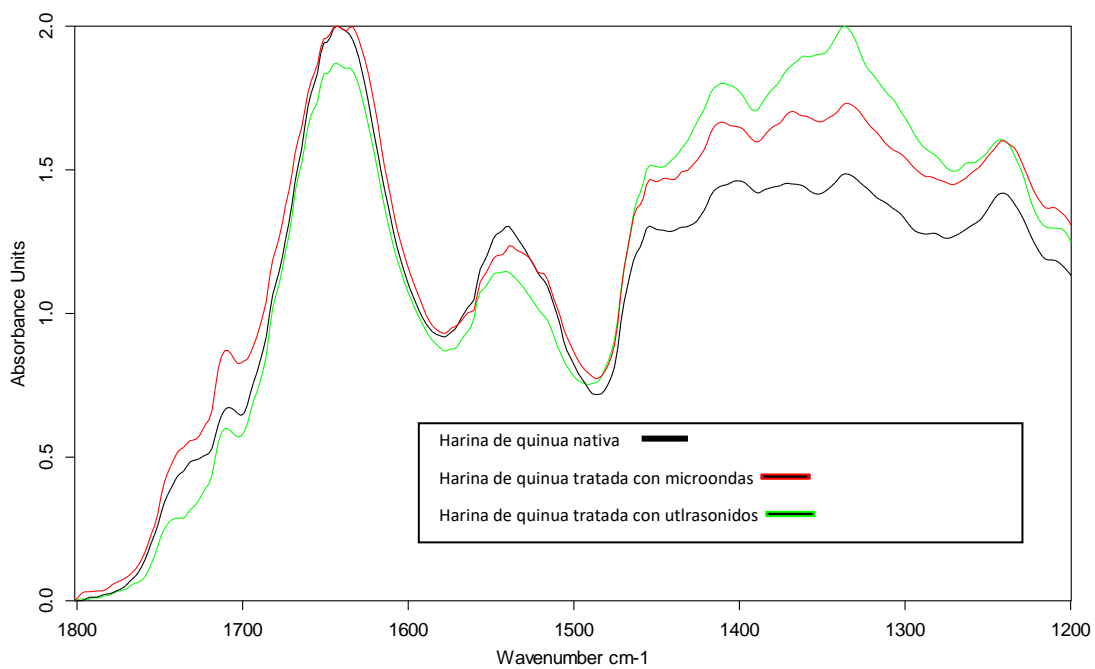


Figura 22: Ampliación del espectro FTIR de la región amido I (1740-16030 cm⁻¹) y amido II (1630-1510 cm⁻¹) de las harinas de quinua nativa (negro) y tratada con microondas (rojo) y ultrasonidos (verde)

9.3 ANEXO III: CURVAS DE FLUJO DE CALOR OBTENIDAS MEDIANTE DSC

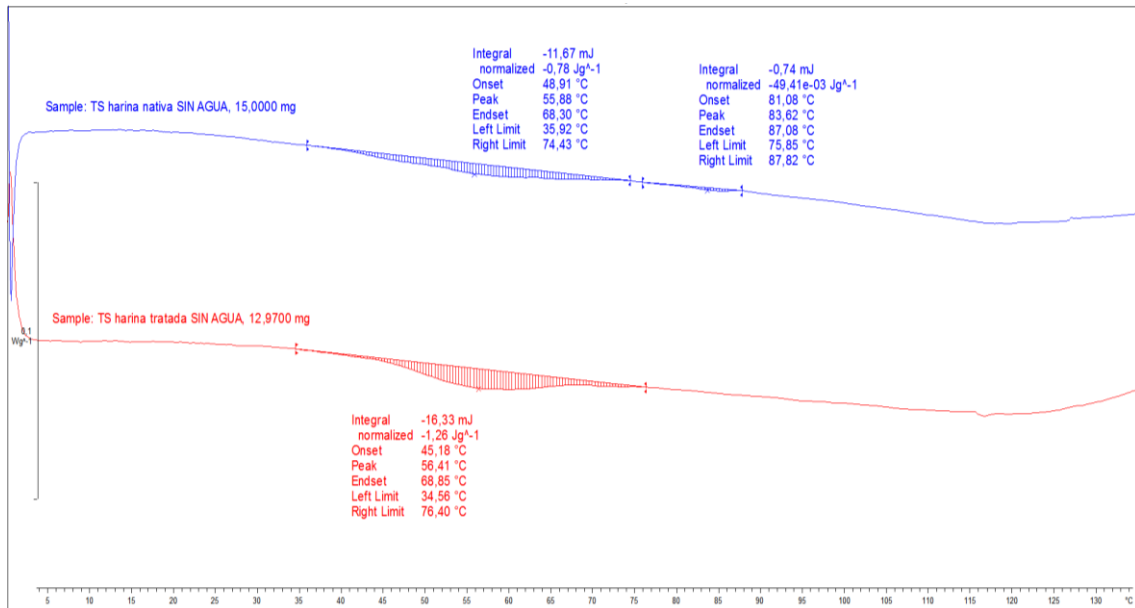


Figura 23: Termograma DSC de la harina nativa de maíz (azul) y de la harina de maíz tratada con microondas (MW-2) (rojo). Ambas sin agua.

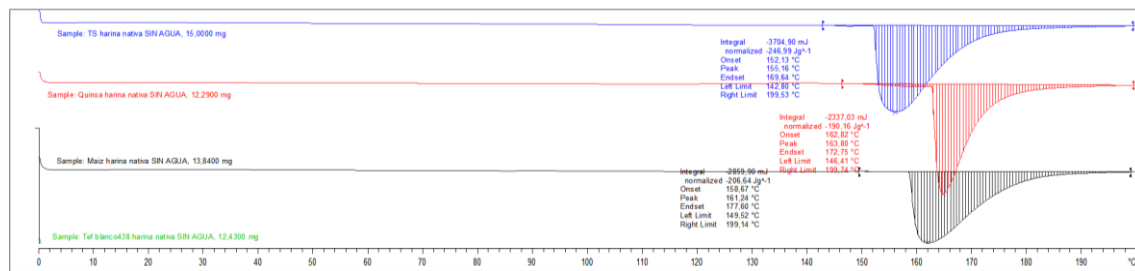


Figura 24: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul) , quinua (rojo) y maíz (verde)

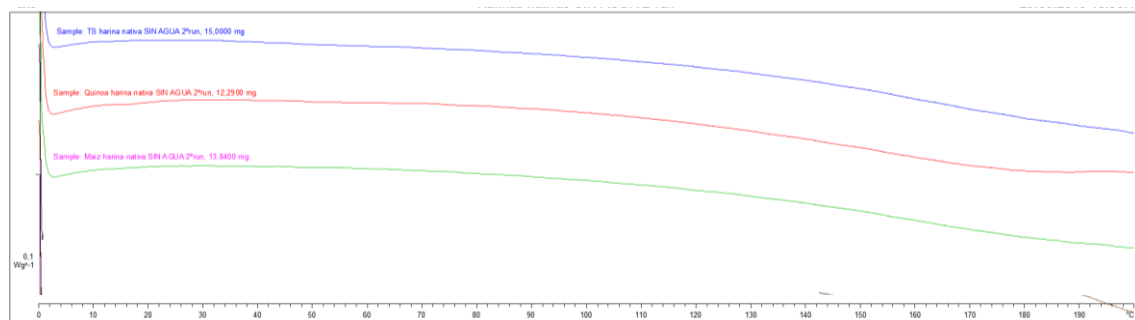


Figura 25: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul), quinua (rojo) y maíz (verde) realizado una semana después de haber sido sometidas a DSC hasta 200°C, pudiendo indicar una irreversibilidad de los procesos.

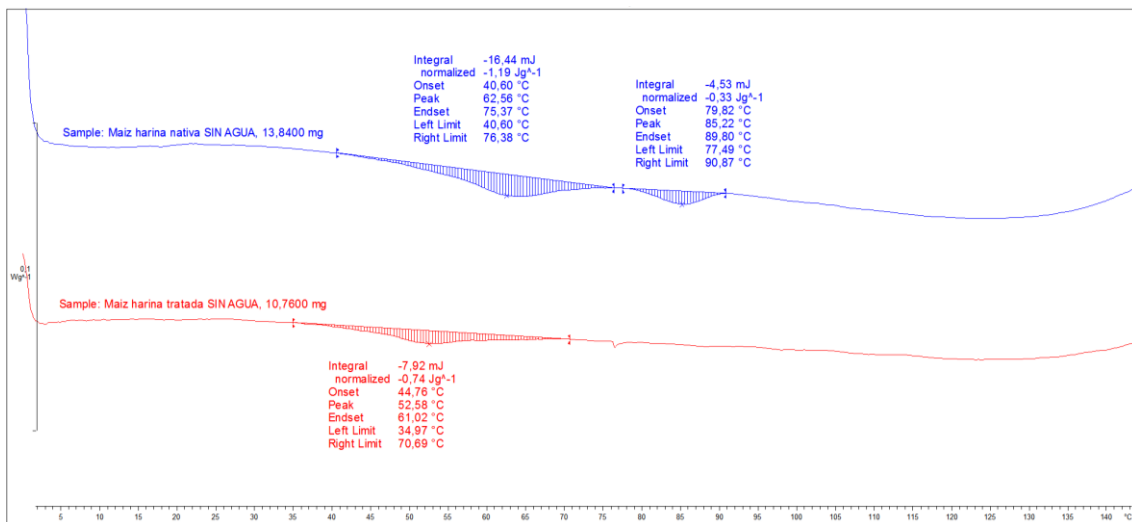


Figura 26: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul) y de la harina de trigo sarraceno tratada con microondas (rojo). Ambas sin agua.

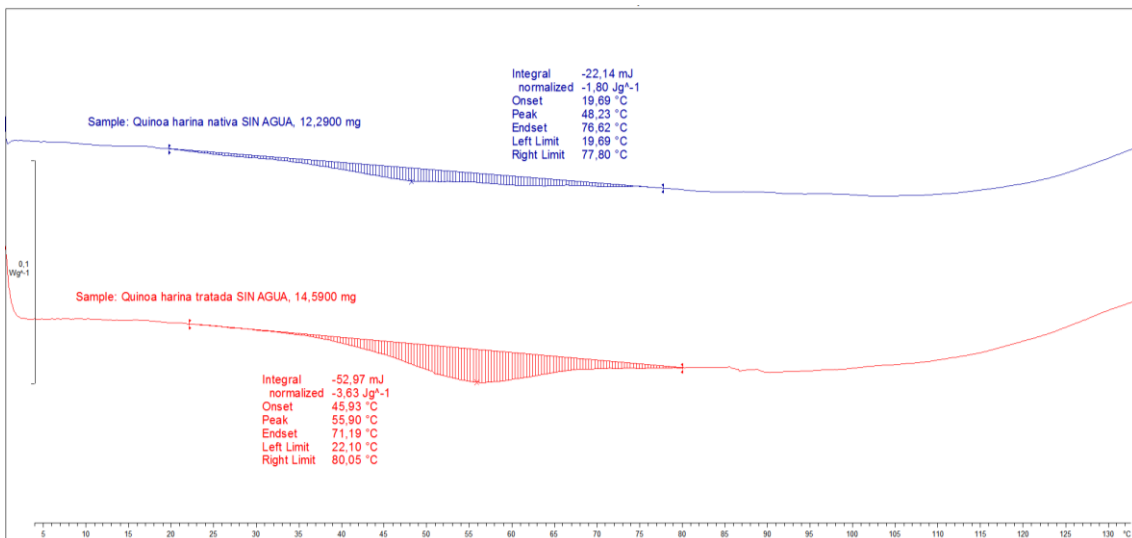


Figura 27: Termograma DSC de la harina nativa de trigo sarraceno (azul), quinua (rojo) y maíz (negro)

9.4 ANEXO IV EQUIPOS Y MATERIAL FUNGIBLE UTILIZADOS Y DISPONIBLES EN LOS LABORATORIOS DE PROCEREALTECH Y BIOFORGE

EQUIPOS:

1. Estufa FD115 (Binder).
2. Balanzas de precisión:
 - a. Cb complet (COBOS)
 - b. Precisión AX-200 (COBOS)
 - c. XPE205 DeltaRange (Mettler Toledo)
 - d. Entris 323Y-1S (Sartorius)
3. Mezcladora-Batidora Teddy Bear 5l (Varimixer)
4. Microondas R-314 IN (W) (Sharp)
5. Motor externo Microondas: Worx WX128.3 (D-LITE)
6. Centrífugas mini spin
 - a. Eppendorf
 - b. Sorvall XTR.
7. Agitador de vaivén Sorvall ST 16R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific)
8. Electrophoresis power supply EPS301
9. Vertical electrophoresis sistem (Hoefer miniVE)
10. Frigoríficos
11. Congeladores
12. Vortex REAX top (Heidolph)
13. Liofilizador (Virtis)
14. Equipos de agua Elix (Milli Pore)
15. Molino Fidibus médium (Komo)
16. Tamiz 250 μm y 500 μm (CISA)
17. Ultrasonidos UP400St con sonda de titanio S24d22D de 22 mm de diámetro (Hielcher)
18. Agitador diálisis MR Hei-Mix L (Heidolph)
19. Incubador ICP 260 (memmert)
20. Elogic 100 magic system equipo fotografía (Kodak)
21. Agitadores
 - a. Temperatura ambiente: Lab polimax (Heiddoph)
 - b. Cámara fría: orbital shaker SSL1
22. Baños maría:
 - a. Ecoline staredition (Lauda)
 - b. Eb w.2 (JULABO GmbH)

23. Preformador multiple gel
caster (Amersham
biosciencies)
24. Placa hervir muestras
(Thermo Fisher Scientific)

MATERIAL FUNGIBLE:

1. Guantes de nitrilo
2. Botes de polipropileno
3. Eppendorfs
4. Falcon con faldón (50 mL)
5. Falcon sin faldón (50 mL)
6. Botes centrífuga
7. Espátula metálica

8. Cápsulas para estufa
9. Pipetas labnet autoclavable
10. Botes de orina
11. Puntas para pipeta: D10, D200,
D1000 Diamond Gilson.
12. Pipetas pasteur
13. Tripas diálisis 12-14000 Daltons
14. Bolsas polipropileno y
poliamida
15. Vasos de precipitados de vidrio
16. Probetas
17. Gradillas para tubo
18. Parafilm 4 IN.X.250 FT. ROLL.
19. Cristales electroforesis 10 x10.
Hofer

9.5 ANEXO V: REACTIVOS

Tabla 7: Reactivos empleados.

Reactivo	Nombre completo	suministrador	Lot/ referencia	pureza
Tercbutanol	Tert-Butyl alcohol 2-Methylpropan- 2-ol	Fisher Scientific	1780447	-
NaCl	Sodium Chloride for analysis	PanReact AppliChem	000880433	99,5%
Ácido acético	Acetic acid glacial	Fisher Chemical	1870260	99%
Metanol	Methanol	Fisher Chemical	1871743	99,8%
Urea	Urea Colorless-to- white crystals	Fisher Scientific	L-15731	99%
TeMed	N,N,N',N'- Tetramethyl ethylenediamide	Thermo Scientific	TI2591665	-
SDS	SDS micropellets	Fisher Scientific	44299-53539	99%
Acrilamida	Acryl/Bis™ 37.5:1 (30:0.8) 40% (w/v) solution Ultra Pure	Iberlab	2I97C391	38,96%
PSA	Ammonium peroxidisulfate Molecular biology grade	Sharlau Chemie, S.A		98 %
Tris	Tris Hydrochloride	Apollo Scientific limited	-	-
Glicerol	Glycerol For Molecular Biology	Fisher BioReagents	13751	99,5%
2-Me	2- Mercaptoethanol	Acros organics	A0377355	99%
Bromofenol	Bromophenol Blue	Fisher Chemical	1364332	

9.6 ANEXO VI: COMPOSICIÓN GEL SDS-PAGE.

Tabla 8: Composición gel SDS-PAGE.

	Resolving gel (12%)	Stacking gel (4%)
Acrilamida 40%	2,25 mL	250 µl
Tris 1,5M pH 8,8	1,88 mL	
Tris 0,5M pH 6,8		0,625 mL
MQ	3,25 mL	1,585 mL
SDS 10%	75 µl	18,75 µl
PSA 10%	37,5 µl	18,75 µl
TEMED	3,75 µl	2,35 µl
V total	7,5 mL	2,5 mL

