



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo
de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) de harinas de banano**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por el bachiller **Iván José León Sánchez**
como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

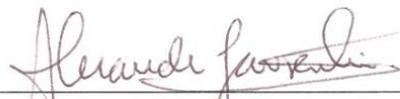
Tutor: Dr. Alexander Laurentin.

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL 2015

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DEL Br. IVÁN JOSÉ LEÓN SÁNCHEZ**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del **Br. IVÁN JOSÉ LEÓN SÁNCHEZ, C.I.: 20006130**, titulado **“DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* Y APROVECHAMIENTO POR EL GORGOJO DE ARROZ (*Sitophilus oryzae* L.) DE HARINAS DE BANANO”**, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los diez días del mes de abril del año dos mil quince.



Dr. Alexander Laurentin
(Tutor)



Dra. Mercedes Schnell
(Jurado)



Dra. Concepción Hernández
(Jurado)

RESUMEN

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en las plantas y representa la principal fuente de carbohidratos en las dietas humanas. Los bananos verdes contienen en su pulpa grandes cantidades de almidón resistente, lo cual hace de esta fruta un material adecuado para la producción de harina con gran aplicación en la reducción del índice glucémico, la diabetes y la prevención del cáncer de colon. En el presente Trabajo Especial de Grado se caracterizó la digestibilidad de la harina de los frutos de ocho plantas de banano, clones (genomio): 072 (AA), 014 (AAA), 118 (AAAA), 041 (AAB), 090 (ABB), 108 (AAAB), 009 (BB) y 093 (BBB). La digestibilidad *in vitro* fue analizada mediante la determinación de los parámetros: almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis *in vitro*, mientras que la digestibilidad *in vivo* de las harinas de banano fue evaluada mediante el uso del bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.). Se encontró que todas las harinas de banano tienen un tenor de almidón disponible superior a 65%, a excepción de la harina del clon 009 (BB) cuyo contenido fue de 41%. El contenido de almidón resistente total se encontró entre 32 – 44% y la tasa de α -amilólisis *in vitro* estuvo por debajo de 10% en todas las harinas crudas. Los biomarcadores supervivencia, variación de peso, cambios en la composición corporal y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz no resultaron ser buenos estimadores de la biodisponibilidad de las harinas de banano, puesto que no se registraron respuestas biológicas que pudieran correlacionarse con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. El biomarcador actividad similar a α -amilasa, por su parte, presentó un moderado desempeño al correlacionarse con el almidón disponible ($r = -0,796$; $p < 0,05$).

DEDICATORIA

A mi madre:
Carmen Elena

A mi padre:
Carlos José

A mi hermana:
Mariana

A mis tíos:
Cristóbal y Marilú.

A mi abuela:
Carmen

Les dedico este trabajo con el mismo cariño que ustedes me han brindado siempre. Son las personas más nobles y de buen corazón que he conocido. Ustedes son lo más valioso e importante de mi vida.

También le dedico este trabajo a mi amigo y compañero de estudios Carlos Monasterios y al Profesor Cesar Molina, quienes fueron parte de mi formación como científico y fallecieron prematuramente en años recientes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi familia:

Mamá, Papá, Mariana, tía Marilú, tío Cristóbal, abuela Carmen y abuela María.

A Luisa:

Quien ha sido siempre como una tía para mi hermana y para mí.

A mi tutor:

Alexander.

A mis amigos y compañeros de laboratorio:

Carlos González-Quilen, Carlos Prazuela, Roosevelt y Mayelí.

A mi amigo y compañero de estudios:

Daniel Landi.

A mis amigos del Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos del ICTA:

Carla, Iker y Romel

A mis profesoras y compañeras de laboratorio:

Ana, Meris y Mighay.

A mis jurados:

Concepción, Mercedes y Zurima.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. El Almidón	1
2. Biodisponibilidad del almidón	4
3. Clasificación nutricional del almidón	7
4. El almidón resistente	7
5. Caracterización de la digestibilidad del almidón	12
6. Empleo del bioensayo del gorgojo de arroz en estudios nutricionales	12
7. Aspectos generales y nutricionales del banano	13
II. ANTECEDENTES	18
III. OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Muestras utilizadas	24
2. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas de banano	25
2.1. Estimación del contenido de almidón disponible	26
2.2. Estimación del contenido de almidón resistente total	27
2.3. Estimación de la tasa de α -amilólisis	29
3. Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas de banano	31
3.1. Preparación de las dietas de harinas	31
3.2. Mantenimiento del cultivo de gorgojos y selección de individuos para el bioensayo	32
3.3. Bioensayo con el gorgojo de arroz	32
3.4. Determinación de la supervivencia	33
3.5. Determinación de la variación de peso	33
3.6. Estimación de la actividad similar a α -amilasa	34
3.7. Determinación de la composición corporal	35
3.7.1. Contenido de agua corporal	35
3.7.2. Contenido de grasa corporal	35
3.7.3. Contenido de nitrógeno proteico y de nitrógeno cuticular	36
3.7.4. Contenido de los otros componentes del cuerpo	38
3.8. Estimación de la excreción de ácido úrico	39
3.9. Análisis estadístico	41

V. RESULTADOS.....	42
1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas	44
1.1. Almidón disponible	44
1.2. Almidón resistente total.....	44
1.3. Tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i>	45
2. Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas	48
2.1. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano	49
2.2. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano	52
2.3. Cambios en la composición corporal.....	54
2.3.1. <i>Agua corporal</i>	54
2.3.2. <i>Grasa corporal</i>	54
2.3.3. <i>Nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular</i>	55
2.3.4. <i>Contenido de otros componentes</i>	55
2.4. Actividad similar a α -amilasa	59
2.5. Excreción de ácido úrico	60
VI. DISCUSIÓN	61
1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las harinas	61
2. Digestibilidad <i>in vivo</i> de las harinas	66
2.1. Control de calidad del bioensayo del gorgojo de arroz	66
2.2. Biomarcadores en las harinas de banano	69
2.2.1. <i>Supervivencia y variación de peso en el gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano</i>	69
2.2.2. Cambios en la composición corporal.....	70
2.2.3. <i>Actividad similar a α-amilasa</i>	73
2.2.4. <i>Excreción de ácido úrico</i>	75
3. Consideraciones finales y perspectivas futuras	77
VII. CONCLUSIONES.....	81
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
IX. ANEXOS	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón	11
Tabla 2. Clasificación, nombre común y forma de consumo de los clones de banano.	25
Tabla 3. Composición proximal de las harinas de banano.	42
Tabla 4. Contenido de almidón disponible en las harinas de banano.....	44
Tabla 5. Contenido de almidón resistente total en las harinas de banano.	45
Tabla 6. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis <i>in vitro</i> de las harinas de banano.....	46
Tabla 7. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en la harina de referencia.....	56
Tabla 8. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de harina de banano.....	57
Tabla 9. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.....	59
Tabla 10. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amilosa, amilopectina y almidón	2
Figura 2. Características esenciales de la amilopectina y su arreglo en el gránulo de almidón.	4
Figura 3. Composición proximal de las harinas de banano.....	43
Figura 4. Cinética de hidrólisis <i>in vitro</i> de las harinas de banano.....	47
Figura 5. Granulometría de la harina de maíz de referencia.	49
Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en la harina de referencia.....	50
Figura 7. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de harina de banano.....	51
Figura 8. Variación del peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo.	52
Figura 9. Variación del peso del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.....	53
Figura 10. Composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo, de referencia y de harinas de banano.	58

I. INTRODUCCIÓN

1. El Almidón

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en las plantas y se produce en forma de gránulos en el cloroplasto de las hojas verdes y el amiloplasto de semillas, legumbres y tubérculos (Ellis y col., 1998). Este polisacárido es la principal fuente de carbohidratos en las dietas humanas (Ratnayake y Jackson, 2008). Pocos nutrientes tienen un contenido de energía, por gramo, mayor que el almidón; siendo las grasas la principal excepción. Las proteínas tienen un contenido energético bastante alto, por gramo de material seco, pero en los alimentos usualmente se encuentran altamente hidratadas. Además, el rendimiento energético se ve disminuido debido al requerimiento de energía para el metabolismo de los productos de digestión proteicos (French, 1973).

El almidón contiene dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina (**Figura 1**). El primero consiste en unidades de D-glucosa conectadas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, es esencialmente lineal, presenta en promedio unos 500 monómeros de glucosa por cadena y tiene un peso molecular de $10^5 - 10^6$ g/mol (Takeda y col., 1989). En la amilosa, las unidades de glucosa muestran una torsión gradual que le otorga a la molécula una conformación helicoidal con seis monómeros por vuelta (Gallant y col., 1992). La amilopectina también posee una elevada masa molecular (10^7 a 10^9 g/mol), pero está muy ramificada. Los enlaces glucosídicos que unen residuos sucesivos de glucosa en la cadena de amilopectina son $\alpha(1\rightarrow4)$; los puntos de ramificación (cada 24 a 30 residuos) son enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Nelson y Cox, 2004; Sajilata y col., 2006).

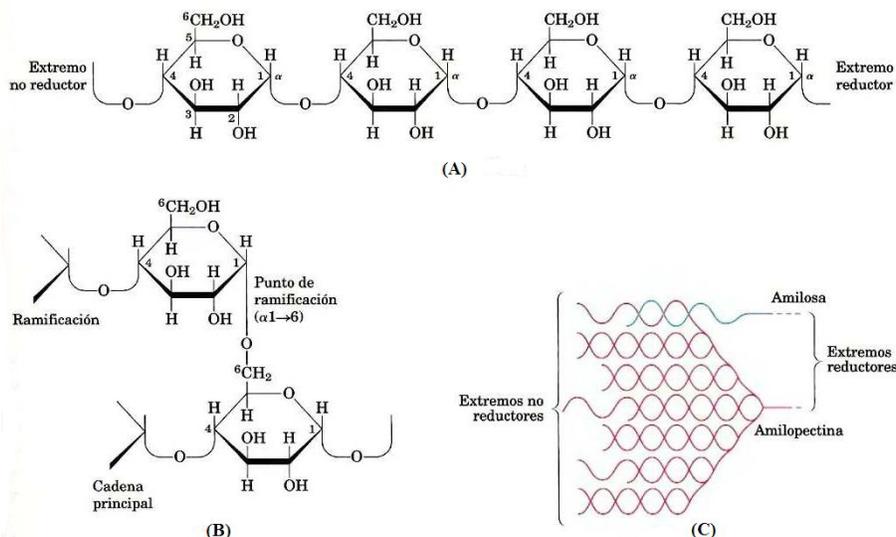


Figura 1. Amilosa, amilopectina y almidón

(A) Estructura química de la amilosa. (B) Punto de ramificación $\alpha(1\rightarrow6)$ de la amilopectina. (C) Agrupación de amilosa y amilopectina del tipo que podría encontrarse en el almidón. Adaptado de Nelson y Cox (2004).

La amilopectina es más abundante en los alimentos y constituye una mayor fracción del almidón que se encuentra en granos y tubérculos amiláceos (Mahan y Escott-Stump, 2008). Está integrada por tres tipos de cadenas, que son a menudo representadas en modelos de racimo (**Figura 2**). Una larga cadena central "C" se ramifica en múltiples cadenas "B" con longitudes de 23 – 35 residuos de glucosa; estas últimas dan lugar a otras cadenas "B" o a racimos de numerosas cadenas cortas "A" de 13 – 23 residuos de glucosa (Buléon y col., 1998, Sajilata y col., 2006).

El almidón se produce en forma de gránulos en los cloroplastos de hojas verdes y el amiloplasto de semillas, legumbres y tubérculos (Ellis y col., 1998). Estos gránulos muestran un grado de cristalinidad de 15 – 45% (Zobel, 1988) que se atribuye al entrelazamiento y a la formación de doble hélices entre las cadenas externas de la amilopectina. Expuestos al microscopio óptico, los gránulos de almidón exhiben un patrón

alternado de anillos concéntricos claros y oscuros que corresponden a las regiones amorfas y a las regiones semicristalinas (**Figura 2**). Las regiones amorfas contienen la mayor parte de la amilosa del gránulo y una cantidad considerable de amilopectina y las regiones cristalinas están formadas esencialmente por amilopectina (Sajilata y col., 2006). La existencia de patrones semicristalinos en el gránulo de almidón ha sido evidenciada mediante cristalografía de rayos X, siendo identificados tres tipos de estructuras (A, B y C) en base al patrón de difracción (Sarko y Wu, 1978).

En los gránulos de almidón tipo A, tales como los del maíz *waxy* o ceroso, el arroz y el trigo, se conoce la existencia de “puntos débiles” o huecos en su estructura externa, que son fácilmente penetrados por enzimas generando canales. Este tipo de gránulos son hidrolizados enzimáticamente con mayor facilidad que los gránulos de tipo B y tipo C, tales como los de la papa, el maíz con alto contenido de amilosa (amilomaíz) y el almidón de guisantes y bananos verdes (Jane y col., 2003; Jane 2007). Los gránulos de tipo B están formados por cadenas de amilopectina organizadas en forma rígida y sin puntos débiles o huecos (Jane y Shen, 1993; Jane y col., 2004; Jane, 2006; Jane, 2007). El patrón de difracción C presenta características comunes a los patrones A y B, lo que sugiere la coexistencia de ambas estructuras en un mismo gránulo, o bien, en gránulos independientes (Sarko y Wu, 1978; Tester y col., 2004).

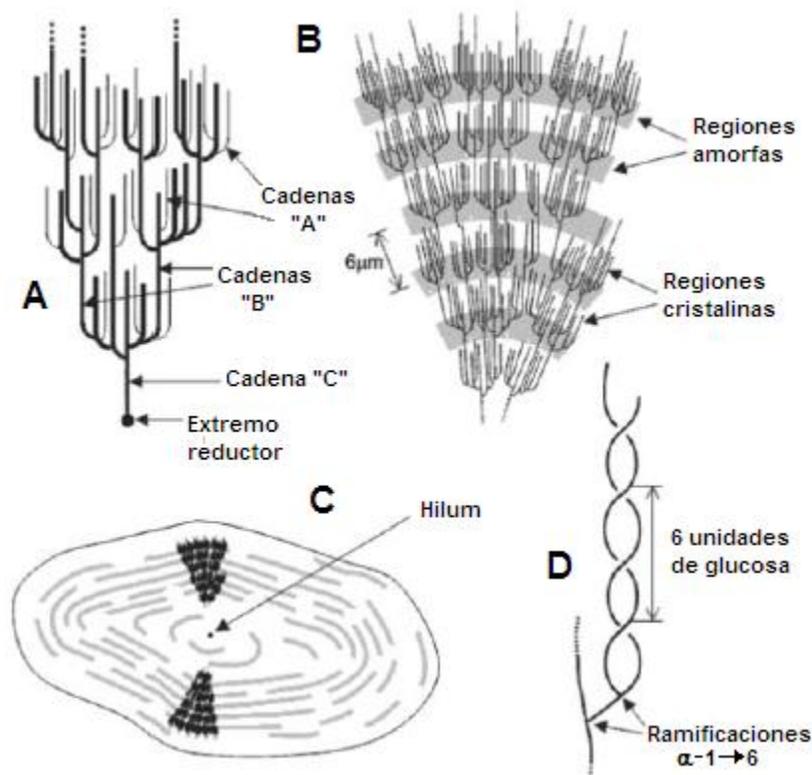


Figura 2. Características esenciales de la amilopectina y su arreglo en el gránulo de almidón.

(A) Tipos de cadenas presentes en la amilopectina. (B) Organización concéntrica de las regiones amorfas y cristalinas que son visibles en un microscopio óptico. (C) Orientación de las moléculas de amilopectina en una sección transversal de un gránulo de almidón idealizado. (D) Conformación en doble hélice de cadenas vecinas de amilopectina que originan las regiones cristalinas en el gránulo. Adaptado de Sajilata y col. (2006).

2. Biodisponibilidad del almidón

Carmona y Liuzzi (1998) definen la biodisponibilidad de un alimento, como aquella fracción de la cantidad total ingerida, que es absorbida a nivel intestinal y es retenida en el organismo a los fines del crecimiento, recambio tisular y la reproducción. La biodisponibilidad de un nutriente depende de la forma química como éste se presenta en un alimento, de su solubilidad, de la digestibilidad de dichas formas para liberar al nutriente de los complejos en que se encuentra, de los mecanismos de transporte transepitelial, del

transporte plasmático, de la captación tisular, de la incorporación en biomoléculas, de su almacenamiento y excreción. Algunos de estos factores son propios del nutriente y otros del individuo que los ingiere (condición fisiológica, estado nutricional, variantes genéticas, entre otras) (Carmona y Liuzzi, 1998).

Los gránulos de almidón están encerrados en paredes celulares rígidas en las plantas y son inaccesibles a las enzimas digestivas (Mahan y Escott-Stump, 2008). La forma y el estado físico del almidón, el tamaño, la morfología y cristalinidad del gránulo, las proporciones relativas de amilosa y amilopectina, la formación de complejos amilosa lípidos y antinutrientes como lectinas, taninos e inhibidores de la α -amilasa, se encuentran entre los factores intrínsecos (propiedades del alimento amiláceo) que afectan la biodisponibilidad del almidón (Holm y col., 1983; Thorne y col., 1983; Berry, 1986; Colonna y col., 1992; Englyst y col., 1992; Oates y col., 1997; Tester y col., 2006;).

Los factores intrínsecos pueden ser medidos de forma reproducible, pero no son necesariamente buenos predictores de la biodisponibilidad y de la tasa de hidrólisis del almidón entre diferentes individuos. Esto se debe a que la ingesta expone los alimentos a factores extrínsecos que pueden también retardar o acelerar la digestión: el grado de masticación, la concentración de la enzima α -amilasa en el intestino delgado y el tiempo de tránsito del alimento entre la cavidad bucal y el íleon terminal (Colonna y col., 1992).

Propiedades fisicoquímicas como la gelatinización y la retrogradación del gránulo de almidón modifican su biodisponibilidad, alterando principalmente la capacidad de las enzimas digestivas de ejercer su acción sobre el gránulo (Martín, 2010).

Cuando un almidón crudo es suspendido en agua y se calienta gradualmente (hasta aproximadamente 55 °C), los gránulos se hinchan y absorben la mitad o más de su peso en agua. Esta hinchazón se hace irreversible si se continúa el calentamiento hasta los 60 u 80 °C, aproximadamente, temperatura en la que los gránulos pierden la cristalinidad y la pared celular reblandece y se rompe. Dicho proceso, conocido como gelatinización, hace al almidón más digerible ya que favorece el ataque de las enzimas digestivas sobre el gránulo (French, 1973; Mahan y Escott-Stump, 2008).

El término retrogradación del almidón es utilizado para designar el retorno del estado gelatinizado o disuelto del almidón, a la forma agregada o insoluble (French, 1973). La retrogradación es un proceso que ocurre en gránulos de almidón gelatinizados cuando se disminuye la temperatura. Dada la inestabilidad del gránulo de almidón gelatinizado, las moléculas de amilosa y amilopectina se vuelven a asociar lentamente mediante puentes de hidrógeno, lo cual lleva a un aumento en la cristalinidad del gránulo y disminuye la biodisponibilidad (Colonna y col., 1992).

Las amilasas son las principales enzimas involucradas en la digestión del almidón. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ encontrados en las moléculas de amilosa y amilopectina; sin embargo no son capaces de hidrolizar los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ terminales, los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ ni los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ adyacentes a los puntos de ramificación de la molécula de amilopectina. En consecuencia, los principales productos de digestión del almidón por las amilasas son oligosacáridos, tales como, maltosa, maltotriosa y dextrinas límite, aunque también se producen pequeñas cantidades de glucosa libre (Colonna y col., 1992; Ganong, 2003).

3. Clasificación nutricional del almidón

El almidón fue clasificado nutricionalmente por Englyst y col. (1992) en tres tipos: almidón rápidamente digerible, almidón lentamente digerible y almidón resistente. A su vez, el almidón resistente fue diferenciado en tres tipos: almidón físicamente inaccesible, gránulos resistentes y almidón retrogradado. Actualmente se considera que además de estos almidones resistentes, existe un cuarto tipo de almidón resistente (**Tabla 1**), en el cual se incluyen almidones modificados químicamente (Sajilata y col., 2006) y almidones modificados mediante algunos tratamientos físicos drásticos: almidón con enlaces no amiláceos (Laurentin y Edwards, 2013). También es conocido que las interacciones amilosa lípidos pueden producir fracciones resistentes a la digestión (Holm y col., 1983), las cuales han sido reconocidas como un quinto tipo de almidón resistente en años recientes (Hasjim y col., 2013).

4. El almidón resistente

Una serie de hallazgos ocurridos en la década de los ochenta sugirieron la presencia, en múltiples fuentes amiláceas, de fracciones del almidón resistentes a la digestión en el intestino delgado del hombre (Anderson y col., 1981; Englyst y col., 1982; Stephen y col., 1983; Englyst y col., 1986). En 1992, la acción concertada de un grupo de investigadores europeos, definió al almidón resistente como la suma del almidón y los productos de su digestión que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp y Björck, 1992). Tres consideraciones importantes se adjuntan a esta definición fisiológica. En primer lugar, el almidón resistente se compone no solo de polímeros de alto peso molecular, sino que puede incluir dextrinas, pequeños oligosacáridos, e incluso glucosa, todos derivados del almidón digerido que escapa a la absorción. En segundo lugar, los almidones resistentes

alcanzan el intestino grueso humano, donde son metabolizados por la microbiota del colon para producir una gama de moléculas bioactivas con beneficios potenciales para la salud. Finalmente, la cantidad actual de almidón resistente en una comida (es decir, la cantidad que alcanza el colon) depende de la fisiología del individuo y puede ser afectada por la edad, por otros componentes en la matriz alimentaria y por enfermedades en el tracto gastrointestinal (Laurentin y Edwards, 2013).

La fermentación del almidón resistente por la microbiota del colon genera ácidos grasos de cadena corta (AGCC), a los cuales se han asociado propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud (Chen y col., 1984; Cherrington y col., 1991; Cheng y Lai., 2000; O'Keefe y col., 2009). Los principales AGCC producidos por esta microbiota son: acetato, propionato y butirato (Laurentin y Edwards, 2013).

Entre las propiedades fisiológicas atribuidas a los AGCC, Martín (2010), González-Quilen (2013) y Laurentin y Edwards (2013) destacan las siguientes:

- **Acetato:** Provee energía a músculos y otros tejidos periféricos, y puede ser sustrato para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga en el hígado.
- **Propionato:** Puede ser sustrato para la producción de glucosa, vía gluconeogénesis, en el hígado. Se ha asociado a la reducción del colesterol. Estimula la sensación de saciedad.
- **Butirato:** Sirve como combustible en los colonocitos, induce la proliferación de colonocitos sanos, induce apoptosis en colonocitos diferenciados hacia ciertas líneas cancerígenas y ha mostrado propiedades antiinflamatorias en cultivos celulares.

Los tipos de almidón resistente son (**Tabla 1**):

a. Almidón físicamente inaccesible

El almidón resistente tipo 1 (AR_1) es físicamente inaccesible y está protegido de la acción de la α -amilasa. Esta inaccesibilidad es debida a la presencia de las paredes celulares de las plantas, que encierran el almidón. Los granos y semillas de leguminosas parcialmente molidos y los alimentos procesados altamente compactados, como la pasta, contienen AR_1 . La disrupción de la estructura del alimento y, hasta cierto punto, la masticación afectan el AR_1 (Laurentin y Edwards, 2013).

b. Gránulos intrínsecamente resistentes

El almidón resistente tipo 2 (AR_2) está constituido por gránulos crudos con resistencia intrínseca a la actividad de las enzimas amilolíticas, debido a su alto contenido de amilosa (Jiang y Jane, 2013) o a la estructura cristalina del gránulo de almidón, especialmente estructuras tipo B (Leszczyński, 2004; Jiang y Jane, 2013). El AR_2 se encuentra en bananos verdes, papas crudas y los almidones de alto contenido de amilosa (Laurentin y Edwards, 2013).

c. Almidón retrogradado

El almidón resistente tipo 3 (AR_3) se forma durante el procesamiento habitual de la comida por cocción y posterior enfriamiento, es el más abundante de los almidones resistentes presentes en los alimentos y se puede encontrar en el pan, algunas marcas de cereales, papas cocidas y enfriadas y en las legumbres (Laurentin y Edwards, 2013).

d. Almidón con enlaces no amiláceos

El almidón resistente tipo 4 (AR_4) incluye almidones nativos que han sido sometidos a uno o más tratamientos químicos (como derivatización y entrecruzamiento) o

físicos drásticos (como extrusión y pirodextrinización) que promueven reordenamientos moleculares, la desorganización granular, la degradación del polímero o la adición de grupos químicos (Laurentin y Edwards, 2013). En el AR₄ la digestibilidad es reducida por la presencia de grupos funcionales adicionales que impiden el acceso de las enzimas con actividad amilolítica o por enlaces glucosídicos atípicos, tales como (1→2) y (1→3) en conformación β, que no son reconocidos por dichas enzimas (Maningat y Seib, 2013). Los almidones modificados son utilizados tradicionalmente en la industria alimenticia para mejorar el rendimiento del procesamiento, las características físicas, las propiedades sensoriales y la estabilidad de almacenamiento de alimentos empaquetados (Mason, 2009; Huber y BeMiller, 2010).

e. Complejos amilosa lípidos

El almidón resistente tipo 5 (AR₅) se produce cuando los ácidos grasos de cadena mediana y larga (de 12 a 18 carbonos) son retenidos dentro de la estructura helicoidal de la amilosa (Hasjim y col., 2013). Los complejos amilosa lípidos se forman de manera natural durante la biosíntesis del almidón, pero también pueden producirse durante la cocción y tienen una menor digestibilidad que el almidón cocido (Holm y col., 1983). El maíz con alto contenido de amilosa (amilomaíz) es una de las principales fuentes de AR₅ (Hasjim y col., 2013).

Es posible que las cadenas externas de la amilopectina tomen parte en la formación de complejos entre la amilopectina y los lípidos (Batres y White, 1986; Evans, 1986; Eliasson y Ljunger, 1988); sin embargo, no hay evidencia directa que indique que los lípidos puedan formar un verdadero complejo de inclusión con la amilopectina comparable a los complejos amilosa lípidos (Kugimiya y Donovan, 1981; Evans, 1986) a menos que se

someta a un tratamiento muy inusual (Slade y Levine, 1987). La estructura altamente ramificada de la molécula de amilopectina crea un impedimento estérico, que evita la formación de complejos amilopectina lípidos altamente ordenados (Hasjim y col., 2013).

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón

Tipo de almidón	Susceptibilidad a la digestión	Alimentos que lo contienen
Rápidamente digerible	Rápida y completamente digerido y absorbido en el intestino delgado.	Alimentos amiláceos sometidos a cocción.
Lentamente digerible	Completamente digerido en el intestino delgado, pero de manera significativamente más lenta.	Cereales y otros alimentos amiláceos crudos; pastas.
Resistente (AR):	No digerible	
AR ₁ : Almidón físicamente inaccesible		Granos y semillas parcialmente molidas; pasta.
AR ₂ : Gránulos resistentes		Alimentos amiláceos crudos y almidones ricos en amilosa.
AR ₃ : Almidón retrogradado		Alimentos amiláceos (papa, legumbres y arroz) enfriados previa cocción, pan envejecido.
AR ₄ : Almidón con enlaces no amiláceos		Almidones modificados mediante tratamientos químicos y algunos tratamientos físicos drásticos.
AR ₅ : Complejos amilosa lípidos		Almidones que contienen complejos amilosa lípidos resistentes a la digestión.

Adaptado de Englyst y col. (1992), Laurentin y Edwards (2013).

5. Caracterización de la digestibilidad del almidón

La mayoría de los estudios nutricionales sobre el almidón se enfocan en el estudio de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* y las correlaciones entre ambos parámetros. La caracterización de la digestibilidad *in vitro* se realiza mediante análisis químico enzimáticos, que simulan las condiciones *in vivo* y está basada en determinaciones del contenido de almidón disponible, de almidón resistente y de la tasa a la cual las enzimas digestivas ejercen su función sobre el gránulo de almidón (Englyst y col, 1992; Tovar y col., 2003; Tovar y col., 2005, citado por Martín, 2010); mientras que el estudio de la digestibilidad *in vivo* requiere del empleo de modelos animales, en los cuales se estudian parámetros conocidos de modo general como biomarcadores, que reflejan la biodisponibilidad y el aprovechamiento del alimento suministrado (Martín, 2010).

6. Empleo del bioensayo del gorgojo de arroz en estudios nutricionales

El gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) ha sido utilizado para evaluar la presencia de factores tóxicos en alimentos (Carmona y col., 1998) y el valor nutritivo de la dieta (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999; García, 2003; Galeno, 2006; Lovera, 2008; Martín, 2010; González-Quilen, 2013) combinando las ventajas de un ensayo *in vivo*, con aquellas de un ensayo *in vitro*, lo que permite el desarrollo de bioensayos rápidos, sencillos y económicos donde se realizan determinaciones simultáneas que pudieran conducir a resultados extrapolables a los humanos (Carmona y col., 2001).

García (2003) y Galeno (2006) analizaron la composición corporal (agua, grasa y nitrógeno), la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con diferentes dietas de almidones nativos y modificados, y comprobaron

que los dos últimos biomarcadores presentaron las correlaciones más robustas con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. En estos estudios, los almidones de baja digestibilidad, entre los cuales se incluye el del banano, indujeron la más alta actividad α -amilolítica y excreción de ácido úrico. Martín (2010) confirmó la utilidad de la actividad similar a α -amilasa y del contenido de grasa corporal como estimadores de la biodisponibilidad de los almidones nativos del banano, al correlacionarse ambos con el contenido de almidón resistente. La actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico fueron confirmadas por González-Quilen (2013) como buenos estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de banano, al registrarse respuestas biológicas que pudieron ser correlacionadas con el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón resistente, aunque hay que destacar que en este último caso no se analizaron los cambios en la composición corporal. Es por ello que resulta interesante estudiar la respuesta de estos biomarcadores frente a matrices alimentarias mucho más complejas, como las harinas obtenidas de bananos.

7. Aspectos generales y nutricionales del banano

El término banano es empleado para identificar a las especies o híbridos de plantas que pertenecen al género *Musa*, subfamilia Musoideae, familia Musaceae (Champion, 1968; López, 1989). Los bananos son plantas herbáceas de gran tamaño, que pueden llegar a medir hasta 15 m de altura. Están constituidas por un tallo corto subterráneo (rizoma), que recibe el nombre de “cormo”. Las hojas son grandes, ovales de hasta 3 m de longitud, de base obtusa, ápice agudo, margen entero y color verde oscuro o amarillento. Las extremidades de los pecíolos o vainas se solapan fuertemente de manera helicoidal conformando un pseudotallo cilíndrico. La inflorescencia que emerge del centro de la copa

foliar, puede alcanzar entre 50 y 150 cm, está cubierta de brácteas dispuestas a manera de espiral y cada una recubre un grupo de flores desprovistas de brácteas individuales y situadas en dos filas apretadas e imbricadas. Estos grupos de flores reciben el nombre de “manos”. Las manos comprenden flores femeninas (cuyos ovarios se transformarán en los frutos) y masculinas. Todo el conjunto de manos conforman lo que se conoce como “racimo”. El fruto es una baya (a la que se le denomina banana), su forma y tamaño varían dependiendo del genotipo y del cultivar (Champion, 1968; López, 1989).

Cheesman (1948) y Simmonds y Shepherd (1955) determinaron que las bananas comestibles se originaron de dos especies silvestres y seminíferas *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, las cuales son endémicas del sureste de Asia. Cheesman, reconoció tres grupos de cultivos morfológicamente distintos: el primer grupo muestra una predominancia de las características botánicas de *Musa acuminata*, mientras que el segundo exhibe las características morfológicas de *Musa balbisiana*, el tercer grupo posee características que combinan los caracteres morfológicos de las dos especies y son considerados como sus híbridos naturales (Valmayor y col., 2000).

Simmons y Shepherd (1955) idearon un sistema de clasificación de los cultivares con base a su ploidía y a su constitución genómica, en el cual cada cultivar recibe un código de entre dos y cuatro letras. La haploidía *acuminata* se designa con la letra A y la haploidía *balbisiana* con la letra B. Así, entre los cultivares con genomio *acuminata* se hallan diploides (AA), triploides (AAA) y tetraploides (AAAA); mientras que entre los cultivares híbridos de *acuminata* y *balbisiana* se hallan diploides (AB), triploides con dominancia *acuminata* (AAB), triploides con dominancia *balbisiana* (ABB) y tetraploides (AAAB, AABB y ABBB). La partenocarpia (desarrollo del fruto sin semillas viables como resultado

de la ausencia de fecundación) no evolucionó en *M. balbisiana*, por lo cual no existen cultivares comestibles de BB y en cuanto a los clones de genomio BBB existe cierta confusión, ya que en este grupo se han incluido erróneamente clones de genomio ABB como *Cardaba* y *Saba* y la pertenencia o no a este grupo del clon de origen tailandés *Kluai Lep Chang Kut* aún está por aclararse (Ploetz y col., 2007).

Los cambures, frutos dulces que son consumidos crudos como postre, se obtienen de plantas con genomio *acuminata*; mientras que los plátanos y los topochos, que suelen ingerirse fritos, horneados, hervidos o asados para que resulten agradables al paladar, constituyen los frutos de plantas híbridas, a menudo designadas con el nombre binomial de *Musa × paradisiaca* L. (Valmayor y col., 2000).

El almidón es el principal componente de los bananos verdes (Zhang y col., 2005). Estos contienen en su pulpa grandes concentraciones de carbohidratos no digeribles, almidón resistente y fibra alimentaria, lo cual hace de esta fruta un material adecuado para la producción de harina con gran aplicación en la reducción del índice glucémico del alimento y la diabetes, así como la prevención del cáncer de colon (Anyasi y col., 2013). La pulpa del fruto del banano verde contiene hasta 70 – 80% de almidón en peso seco, un porcentaje comparable con el del endospermo de los granos del maíz y el de la pulpa de la papa blanca (Zhang y col., 2005). Sin embargo, debido a la acción conjunta de múltiples enzimas, el contenido de almidón declina sostenidamente durante la maduración del fruto hasta alcanzar menos del 5% al final del período climatérico, con el consiguiente incremento de los contenidos de sacarosa y de azúcares reductores (Marriott y col., 1981; Zhang y col., 2005).

En investigaciones recientes llevadas a cabo por los laboratorios de Polisacáridos Vegetales y de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, ambos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010; González-Quilen, 2013), se ha estudiado la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de una amplia gama de almidones nativos y modificados, entre los cuales se incluyen los almidones aislados del banano; encontrándose que, para los clones analizados, su digestibilidad fue baja con respecto a almidones que generalmente se consideran de alta digestibilidad, como el almidón de maíz y el almidón de trigo (Englyst y col., 1992; Goñi y col., 1996; García, 2003). Los parámetros que se han venido estimando en los ensayos *in vitro* son: el contenido de almidón disponible, de almidón resistente total y la tasa de α -amilólisis. En los estudios *in vivo*, por su parte, se ha empleado el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae L.*), alimentado con dietas de almidones, como modelo animal, y se ha dado especial énfasis a la estimación de la composición corporal (agua corporal, grasa corporal, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular), de la actividad similar a α -amilasa y de la excreción de ácido úrico por parte del insecto como biomarcadores; correlacionándose dichos biomarcadores con los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* de los almidones.

Los estudios nutricionales sobre harinas de banano similares a los llevados a cabo en almidones son escasos, no solo en el país, sino a nivel mundial. Por tanto, en el presente trabajo se realizó el estudio de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de las harinas de ocho clones de banano, utilizando la harina de maíz como referencia. El análisis de digestibilidad *in vitro* se llevó a cabo determinando el contenido de almidón disponible, almidón resistente total y la tasa de α -amilólisis, de cada harina. El análisis de digestibilidad *in vivo*

se llevó a cabo mediante la estimación de los biomarcadores supervivencia, variación de peso, cambios en la composición corporal, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico del bioensayo del gorgojo de arroz. Además, se realizaron correlaciones entre los parámetros medidos a partir de ambas aproximaciones metodológicas con la finalidad de corroborar la validez de la utilización del bioensayo del gorgojo de arroz como método para la estimación de la biodisponibilidad de las harinas de banano, alimento donde el almidón interacciona con el resto de la matriz alimentaria.

II. ANTECEDENTES

En años recientes se han realizado diversos estudios nutricionales sobre las harinas de banano, con énfasis en propiedades como la composición química y el valor nutricional, la digestibilidad, la ganancia de peso, la fermentación en el colon y la respuesta glucémica de animales alimentados con dichas harinas. Además, se ha estudiado la aplicación de harinas de banano en la elaboración de productos alimenticios como panes y pastas con bajo índice glucémico.

En un estudio realizado por Juárez-García y col. (2006) se caracterizó la composición química de la harina de plátano verde (*Musa paradisiaca* L.), se formuló un pan experimental con dicha harina y se estudió la composición química, almidón disponible, almidón resistente y la tasa de digestión del almidón *in vitro*; utilizando un pan experimental a base de trigo como referencia. La composición química de la harina de banano mostró que el almidón total (73,4%) y la fibra alimentaria (14,5%) fueron los componentes más altos. El pan de harina de banano tuvo un mayor contenido de proteínas y de almidón total que el pan de trigo, pero la cantidad de lípidos también fue mayor. De igual forma, el pan de harina de banano mostró una cantidad significativamente superior de almidón resistente respecto al pan de trigo. Además, se predijo un índice glucémico de 65% para el pan de harina de banano (inferior al 82% de la referencia).

Vargas-Rodríguez y Boschini-Figueroa (2007) evaluaron la ganancia de peso en hembras jóvenes de ganado (novillas) en desarrollo y alimentadas con diferentes niveles de suplementación (0; 0,33 y 0,66% del peso vivo) con harina de banano en la dieta total. Todas las novillas recibieron una ración total compuesta por alimento concentrado en una cantidad proporcional al 1% del peso vivo, más forraje hasta complementar la dieta total.

La suplementación con diferentes niveles de harina de banano no mostró un efecto significativo sobre el peso promedio final de los animales; sin embargo, al cuantificar el efecto sobre la ganancia diaria de peso de las novillas, se logró apreciar una diferencia importante. Los investigadores encontraron que a un nivel de inclusión en la dieta de 0,33% del peso vivo se logran las mejores ganancias de peso por día.

Rodríguez-Ambriz y col., (2008) prepararon un polvo alimenticio rico en fibra alimentaria mediante la licuefacción de harina de banano verde de *Musa paradisiaca* L. y obtuvieron que los componentes químicos predominantes en la harina de banano fueron las fracciones de almidón total (76,8%), fibra alimentaria (10,4%) y almidón resistente (30,4%). Aunque el proceso de licuefacción ocasionó una disminución importante en los porcentajes de almidón total, almidón disponible y almidón resistente en el producto procesado con relación a la harina cruda, el contenido de fibra alimentaria y la fracción indigerible del polvo alimenticio fueron superiores a los obtenidos en la harina cruda. Además, el extracto polifenólico de dicho polvo mostró una elevada actividad antioxidante y su capacidad de retención de agua y aceite no varió con la temperatura, siendo esta última característica de especial importancia durante la preparación de alimentos en los cuales este polvo rico en fibra se utilice como aditivo. Con base en lo anterior, dichos investigadores sugirieron que dicho polvo podría ser utilizado como ingrediente en la elaboración de alimentos funcionales.

Ramli y col. (2009) evaluaron los efectos de la incorporación de harinas de pulpa y de cáscara de plátanos verdes y maduros en las propiedades fisicoquímicas y la digestibilidad *in vitro* de fideos alcalinos amarillos. En la mayoría de los casos, el índice de hidrólisis del almidón, el índice glucémico y las propiedades fisicoquímicas de los fideos

cocidos fueron afectados por la adición de las harinas de banano; destacando la disminución del índice glucémico de los fideos a los que se les añadieron harinas de banano, respecto a los fideos de gluten de harina de trigo utilizados como referencia. La harina de cáscara tuvo un mayor contenido de fibra alimentaria y menor contenido de almidón resistente que la harina de pulpa de banano.

Wenzel y col. (2010) estudiaron el perfil de la fermentación del colon *in vitro* y las respuestas glucémicas postprandiales de los carbohidratos no disponibles de dos tipos de harina de banano verde: *Musa acuminata* variedad Nanicão y *Musa paradisiaca in natura*. La fermentabilidad de las harinas se evaluó utilizando heces fecales de rata como inóculo y la respuesta glucémica después de la ingestión se evaluó en voluntarios sanos. Las harinas presentaron una alta concentración de carbohidratos no disponibles, que variaba en el contenido de almidón resistente, fibra alimentaria y la fracción no digerible. La fermentación *in vitro* de las harinas fue alta (entre 75 y 98%), al ser expresada por la cantidad total de ácidos grasos de cadena corta en relación al control (lactosa como fuente de carbono). Además, la ingesta de las harinas de banano produjo aumentos insignificantes en la respuesta glucémica postprandial de voluntarios sanos, en comparación al aumento producido después de la ingesta de pan. Sin embargo, los investigadores señalan la necesidad de estudios *in vivo*, con el fin de evaluar los posibles efectos benéficos de la fermentación en la salud intestinal.

La composición química y el valor nutricional de harinas de plátano verde (*Musa acuminata* variedad Nanicão) fueron evaluadas en un estudio realizado por Wenzel y col. (2011). Las harinas presentaron un alto tenor de fibra alimentaria total, compuesta principalmente de almidón resistente, resultado similar al obtenido por Juárez-García y col.

(2006). Por otra parte, el contenido de almidón disponible, azúcares solubles, minerales, fitoesteroles y polifenoles totales fue bajo, pero con actividad antioxidante moderada.

Guzmán (2011) estudió las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas, las propiedades funcionales, características morfométricas, composición proximal y la digestibilidad de harinas crudas y pregelatinizadas de plátano (*Musa* AAB) y topocho verde (*Musa* ABB), y la elaboración de pastas a partir de dichas harinas. Entre los resultados más relevantes, se halló que el mayor contenido de almidón lo presentó la harina cruda de plátano con un 81,3%; mientras que, el menor valor fue de 74,4%, para la harina pregelatinizada de topocho verde, con lo que se evidencia el efecto causado por el tratamiento térmico sobre estas. La digestibilidad *in vitro* del almidón de las harinas crudas de plátano y topocho fue baja; mientras que la de las mezclas de ambas harinas presentó un comportamiento medio respecto al conjunto total de las harinas, ya que para el caso de las harinas pregelatinizadas se obtuvieron los valores más altos de digestibilidad.

En otros estudios, se ha analizado el efecto de la harina de plátano sobre la calidad de un embutido tipo mortadela (Guerra y col., 2011), el desarrollo de un producto de panadería con alto valor nutricional a partir de la harina obtenida del banano verde con cáscara (Gil y col., 2011) y el efecto de la harina de banano como una bebida isotónica para el mantenimiento de la hidratación (Penggaliy y col., 2011), con diversos resultados.

Aunque la cantidad de estudios nutricionales sobre alimentos elaborados a partir de bananos verdes ha venido en aumento en los últimos años, los estudios referentes a la digestibilidad *in vivo* de dichos alimentos son escasos, particularmente en el caso de las harinas de banano. Dichas harinas poseen una matriz alimentaria en la cual el almidón (que

es el componente presente en mayor proporción) interacciona con otros componentes (Singh y col., 2010); motivo por el cual las respuestas biológicas observadas *in vivo* no necesariamente serían un resultado directo de las estimaciones hechas *in vitro*.

En base a estos antecedentes, en el presente estudio se analizó la digestibilidad de harinas de diferentes clones de banano, tanto *in vitro* como *in vivo*; usando el gorgojo de arroz como modelo animal.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* de las harinas de ocho clones de banano, con los indicadores de la disponibilidad *in vivo*, empleando el bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.).

Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el contenido de almidón disponible y almidón resistente de las harinas de diferentes clones de banano.
2. Evaluar la tasa de α -amilólisis *in vitro* de las harinas estudiadas.
3. Estimar el porcentaje de grasa corporal, la excreción de ácido úrico y la actividad similar a α -amilasa en el gorgojo de arroz, como principales biomarcadores de la digestibilidad *in vivo* de las harinas estudiadas.
4. Correlacionar las respuestas biológicas observadas *in vivo* con los indicadores de biodisponibilidad evaluados *in vitro*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras utilizadas

Las harinas estudiadas se obtuvieron a partir de los frutos de ocho clones de plantas musáceas (**Tabla 2**). Los frutos fueron cultivados en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua y cosechados con un grado de madurez de 1 (verde), según la escala de von Loesecke (1950). Las harinas fueron obtenidas y facilitadas por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Doctora Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Para su elaboración se siguió la metodología descrita por Pacheco (2001). Adicionalmente, dichas harinas se molieron a mano con un mortero y se pasaron por un tamiz de 0,250 mm de diámetro (60 mesh) previa utilización. Se incluyó como referencia en todos los análisis *in vivo*, una harina elaborada a partir de un *gritz* de maíz (granos de maíz cortados en forma gruesa) donado por Alfonso Rivas & Cía., Turmero. Para la elaboración de la harina de maíz, el *gritz* fue sometido a varios pasos de molienda (empleando al menos dos molinos eléctricos distintos y manualmente con un mortero). A fin de obtener una harina con un tamaño de partícula similar al de las harinas de banano, el *gritz* de maíz molido se cernió, pero no todo el material pasó por un tamiz de 0,250 mm. Se decidió utilizar el material que pasó por el tamiz como la harina de referencia.

Tabla 2. Clasificación, nombre común y forma de consumo de los clones de banano.

Especie	Genomio	Clon	Nombre común	Subgrupo	Forma de consumo
<i>Musa acuminata</i>	AA	072	Titiaro/Pisang Mas	Sucrier	Postre
	AAA	014	Pineo Gigante	Cavendish	Postre
	AAAA	118	Somaclón*	Somaclón*	Postre
<i>Musa × paradisiaca</i>	AAB	041	Plátano Hartón Común	Platain	Cocción
	ABB	090	Topocho Verde	Bluggoe	Cocción
	AAAB	108 [†]	No identificado	No identificado	Cocción
<i>Musa balbisiana</i>	BB	009	No identificado	No identificado	‡
	BBB	093	Lep Chang Kut	No identificado	Cocción

Los bananos fueron suministrados por el banco de germoplasma de musáceas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua, Venezuela. Forma de consumo según Valmayor y col. (2000), Ploetz y col. (2007) y Anyasi y col. (2013).

* Los somaclones son plantas producidas por técnicas de ingeniería genética.

[†] Sinónimo: CIEN-BTA-03.

[‡] Las plantas de genomio BB son cultivadas principalmente por sus hojas. La gran cantidad de semillas del fruto lo hace poco atractivo para el consumo animal (Valmayor y col., 2000; Ploetz y col., 2007).

2. Digestibilidad *in vitro* de las harinas de banano

La digestibilidad de las muestras de harina de banano fue caracterizada *in vitro* mediante la estimación de los parámetros: almidón disponible, almidón resistente y tasa de α -amilólisis. Esta última variable se estimó tanto con las harinas crudas como con las harinas gelatinizadas.

2.1. Estimación del contenido de almidón disponible

Para estimar el contenido de almidón que es potencialmente susceptible al ataque amilolítico, se empleó el método enzimático descrito por Holm y col. (1986). Se llevó a cabo la dispersión de una alícuota de 500 mg de peso seco de cada harina en un volumen de 20 mL de agua. Se ajustó el pH de la suspensión entre 6 – 7 unidades y se agregaron 0,1 mL de α -amilasa bacteriana termoestable Termamyl[®] 120L (NOVO Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) para luego incubar la suspensión en un baño de María a ebullición por 20 minutos, proceso que ocasiona la gelatinización del almidón e inicia su hidrólisis. Una vez atemperada, se trasvasó y enrasó la suspensión en un balón aforado de 100 mL. En un tubo de ensayo se vertieron 0,5 mL de la suspensión junto con 1 mL de solución 0,5 g/L de la amiloglucosidasa de *Rhizopus* sp. (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) y se incubó la mezcla en un baño de María a 40 °C por 60 minutos con agitación constante. Luego, se trasvasó y enrasó la solución en un balón aforado de 10 mL.

Se estimó la cantidad de glucosa liberada con ayuda de un estuche comercial (glucosa oxidasa cat. 89250, Industrias Invelab[®], Caracas) basado en el sistema glucosa oxidasa peroxidasa. Se adicionaron en un tubo de ensayo, 0,05 mL del hidrolizado junto con 1 mL del reactivo enzimático. Una vez iniciada la reacción, los tubos se incubaron en un baño de María a 37 °C durante 10 minutos. Culminado el período de incubación, se empleó un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 510 nm de las muestras. Para la cuantificación de la glucosa presente en cada tubo del ensayo colorimétrico a partir de los valores de absorbancia leídos, se utilizó la ecuación de una curva patrón elaborada con un estándar de glucosa a 1 g/L: $y = 0,0323x + 0,003$ ($R^2 = 1,000$; $n = 6$).

El método colorimétrico acopla las reacciones de dos enzimas: la glucosa oxidasa y la peroxidasa. La D-glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa produciendo D-gluconato y peróxido de hidrógeno. Este último oxida al cromógeno (4-aminoantipirina e hidroxibenzoato) en presencia de la peroxidasa, produciendo un compuesto rosado (quinoneimina) cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa en solución. La fórmula empleada para el cálculo del porcentaje de almidón disponible en base seca, se indica a continuación:

$$\text{Almidón disponible (\%)} = \frac{\text{cantidad de glucosa } \mu\text{g} \times 10^{(a)} \times 100^{(b)} \times 0,9^{(c)}}{0,05^{(d)} \times 0,5^{(e)} \times 1000^{(f)} \times \text{peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

- (a) Volumen final luego de la digestión con amiloglucosidasa, en mililitros.
- (b) Volumen final luego de la digestión con Termamyl[®], en mililitros.
- (c) Corrección de glucosa a glucano.
- (d) Alícuota tomada para la cuantificación de glucosa, en mililitros.
- (e) Alícuota tomada para la digestión con amiloglucosidasa, en mililitros.
- (f) Conversión de microgramo a miligramo.

2.2. Estimación del contenido de almidón resistente total

El método enzimático descrito por Goñi y col. (1996) permite cuantificar el tenor de almidón resistente total de los alimentos, esto es, la suma de la fracción físicamente inaccesible (almidón resistente tipo 1), más las fracciones de gránulos nativos no digeribles (almidón resistente tipo 2) y aquellas debidas a retrogradación (almidón resistente tipo 3). El almidón con enlaces no amiláceos (almidón resistente tipo 4) y los complejos amilosa lípidos (almidón resistente tipo 5) no son cuantificables con este método. No obstante, las muestras ensayadas carecen de almidón resistente tipo 4 debido a que no fueron modificadas. La producción de la harina de banano involucra el troceo y la molienda del material vegetal (Pacheco, 2001), lo cual promueve la ruptura de las paredes celulares y

la eliminación de la matriz extracelular. Por tal motivo la fracción de almidón resistente del tipo 1 no es cuantificable en las harinas. Adicionalmente, se ensayó con las muestras crudas y en estado nativo, por lo cual tampoco se esperaría hallar en ellas cantidades significativas de almidón resistente del tipo 3.

La primera etapa del método busca simular las condiciones estomacales. Una alícuota de 100 mg en peso seco de cada harina se dispersó en 10 mL de buffer KCl-HCl, pH 1,5. Se agregaron 0,2 mL de solución de pepsina (P-7000, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) 100 g/L en buffer HCl-KCl y se incubó la muestra en un baño de María a 40 °C por 60 minutos en agitación constante.

En la segunda etapa se promueve la hidrólisis del almidón susceptible al ataque amilolítico, proceso que ocurre naturalmente en el intestino delgado. Para ello, se adicionaron a la suspensión 9 mL de buffer Tris-maleato 0,1 mol/L, pH 6,9, junto con 1 mL de solución de α -amilasa pancreática porcina (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) 40 g/L en buffer Tris-maleato. La mezcla se incubó con agitación constante en un baño de María a 37 °C durante 16 horas.

La tercera etapa permite separar el almidón resistente y la fibra alimentaria (componentes insolubles) de la fracción hidrolizada (componente soluble). Se centrifugó la suspensión a $3.000 \times g$ por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 mL de agua destilada. Luego, se aplicó una segunda centrifugación y se descartó nuevamente el sobrenadante.

En la cuarta etapa se busca separar el almidón resistente de la fibra alimentaria y promover la hidrólisis del primero. Se agregaron 3 mL de agua destilada y 3 mL de

solución 4 mol/L de KOH recién preparada. Luego de agitar la suspensión magnéticamente durante 30 minutos, se adicionaron 5,5 mL de solución de HCl 2 mol/L, 3 mL de buffer acetato de sodio 0,4 mol/L, pH 4,75 y 1 mL de solución de amiloglucosidasa de *Rhizopus* (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) a 4,8 g/L en el buffer acetato. Se incubó la mezcla a 40 °C con agitación constante durante 60 minutos. Una vez atemperada, la mezcla se centrifugó un par de veces a $3.000 \times g$ durante 15 min cada una. Los sobrenadantes resultantes se trasvasaron a un balón aforado de volumen apropiado (usualmente 100 mL) dependiendo de la cantidad de glucosa liberada. La determinación de la glucosa se realizó tal como se ha indicado en el apartado anterior de la presente sección [curva de calibración (glucosa 1 g/L): $y = 0,0325x + 0,003$ ($R^2 = 0,999$; $n = 7$)]. La fórmula empleada para el cálculo del porcentaje de almidón resistente total se indica a continuación:

$$\text{Almidón resistente total (\%)} = \frac{\text{cantidad de glucosa } (\mu\text{g}) \times Vf^{(a)} \times 0,9^{(b)}}{0,05^{(c)} \times 1000^{(d)} \times \text{peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

^(a) Vf: Volumen final de la solución que contiene la glucosa liberada a partir del almidón resistente, en mililitros (usualmente 100 mL).

^(b) Corrección de glucosa a glucano.

^(c) Alícuota tomada para la cuantificación de la glucosa, en mililitros.

^(d) Conversión de microgramo a miligramo.

2.3. Estimación de la tasa de α -amilólisis

Se aplicó el método enzimático descrito por Holm y col. (1985) que permite estimar la velocidad a la cual es degradado el almidón a carbohidratos simples, los cuales son cuantificados como equivalentes de maltosa. Para cada muestra, la cinética de hidrólisis se estimó tanto en la harina cruda como en la gelatinizada. Se pesaron tres alícuotas de cada muestra, correspondientes a 500 mg de almidón disponible que luego fueron dispersadas en 50 mL de buffer fosfato Na,K 44 mmol/L, pH 6,9.

La harina a gelatinizar se introdujo en un baño de María a ebullición durante 20 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se incubó la suspensión en un baño de María a 37 °C. En el caso de la harina cruda, se obvió la incubación en el baño de María a ebullición. La reacción se inició añadiendo 1 mL de la solución de α -amilasa pancreática porcina (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) 4 g/L en el buffer fosfato, pH 6,9. Se tomaron alícuotas de 0,2 mL de cada hidrolizado a los 0, 5, 15, 30 y 60 minutos y se finalizó la reacción transfiriéndolas a una mezcla de 0,8 mL de agua y 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico. Este reactivo contiene 10 g/L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) disuelto en tartrato de Na,K a 300 g/L en NaOH 16 g/L.

La cuantificación de los azúcares reductores liberados por acción de la α -amilasa pancreática se realizó según el método químico descrito por Hostettler y col. (1951). Las muestras fueron introducidas en un baño a ebullición durante 10 minutos. Finalizada la incubación, se dejaron atemperar en un baño de María a temperatura ambiente por 2 minutos; luego se les añadieron 15 mL de agua destilada, se mezclaron tres veces por inversión y se midió la absorbancia a 530 nm. Para calcular el contenido de azúcares reductores, se utilizó la fórmula de una curva patrón elaborada con un estándar de maltosa 10 g/L: $y = 0,4015x - 0,010$ ($R^2 = 0,999$; $n = 5$).

El porcentaje de α -amilólisis se calculó para cada tiempo corrigiendo los valores obtenidos por el poder reductor inicial ($t = 0$ min) y se expresó en equivalentes de maltosa según la siguiente ecuación:

$$\alpha - \text{amilólisis (\%)} = \frac{\text{maltosa liberada (mg)} \times 50^{(a)} \times 0,95^{(b)}}{0,2^{(c)} \times \text{contenido de almidón disponible (mg; p.s)}} \times 100$$

^(a) Volumen de solución donde ocurre la hidrólisis, en mililitros.

^(b) Corrección de maltosa a glucano.

^(c) Alícuota tomada para la cuantificación de los azúcares reductores, en mililitros.

3. Digestibilidad *in vivo* de las harinas de banano

La caracterización *in vivo* de la digestibilidad de las muestras de harinas de banano, se llevó a cabo mediante la utilización del gorgojo de arroz (*S. oryzae*) como modelo animal. Se estimaron los biomarcadores: supervivencia, variación del peso, actividad similar a α -amilasa, agua corporal, grasa corporal, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular, otros componentes del cuerpo y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las dietas de harinas de banano crudas.

3.1. Preparación de las dietas de harinas

Las harinas se suministraron a los insectos bajo la forma de semillas artificiales. Para ello, se pesaron aproximadamente 14 g de harina y se añadieron inicialmente 21 mL agua; mezclándose la suspensión con una espátula. Luego, se fue añadiendo una cantidad de agua variable hasta obtener una suspensión con una consistencia semisólida. Esto es, lo suficientemente diluida como para no encontrar harina seca adherida al fondo del recipiente, pero lo suficientemente densa como para formar un flujo continuo de suspensión, al tomar un poco con la espátula y verterla en el recipiente desde 1 – 2 cm de altura. Posteriormente, se colocaron gotas de la suspensión sobre un papel encerado (dos

gotas por semilla artificial), utilizando una jeringa de 10 mL, sin aguja. Por último, se secaron las semillas artificiales en estufa a 37 °C por 24 h. A partir de los 14 g de harina, se preparan aproximadamente 12 g de semillas artificiales, los cuales son suficientes para realizar el bioensayo por sextuplicado (2 g por réplica). En el caso de la harina de maíz se tomaron inicialmente 17 g de harina y se mezclaron en 22 mL de agua destilada.

3.2. Mantenimiento del cultivo de gorgojos y selección de individuos para el bioensayo

Se colocaron grupos de 300 – 350 gorgojos de arroz en frascos de vidrio recubiertos con una malla doble y conteniendo arvejas verdes peladas y partidas (compradas en un mercado local) ocupando cerca de la mitad de su capacidad, aproximadamente 250 g. Los frascos se almacenaron en oscuridad. Una vez transcurridos 15 días, los insectos padres fueron retirados de los cultivos y se esperó de 3 a 4 semanas adicionales para la emergencia de la progenie. Así, es posible obtener poblaciones relativamente homogéneas de insectos con una edad y una masa corporal semejantes. Durante la emergencia, se seleccionaron de los cultivos aquellos insectos con un peso promedio de $1,6 \pm 0,1$ mg (día -1). El bioensayo se inició al día siguiente de la selección (día 0).

3.3. Bioensayo con el gorgojo de arroz

El bioensayo se realizó mediante el método descrito por González-Quilen (2013). En viales de vidrio se depositaron 2 g de las semillas artificiales de la harina correspondiente junto con una población de 30 insectos, para un total de seis réplicas por dieta. Adicionalmente, se incluyó un control de calidad [condición de ayuno y condición

alimentada (dieta de arvejas verdes peladas y partidas)] y una harina de referencia [semillas artificiales de harina de maíz elaborada a partir del *gritz* donado por Alfonso Rivas & Cía., (Turmero)].

Se cuantificó interdiariamente el número de insectos sobrevivientes y su peso total, iniciando el mismo día en que se prepararon los viales (día 0) y finalizando al octavo día del bioensayo. Al finalizar el bioensayo, tanto los insectos sobrevivientes como los viales conteniendo las excretas y los restos de la dieta, se almacenaron por separado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4. Determinación de la supervivencia

A partir de los datos interdiarios de supervivencia, se calculó la supervivencia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\# \text{ de individuos vivos al día "n"}}{\# \text{ de individuos vivos al inicio}} \times 100$$

3.5. Determinación de la variación de peso

Se determinó el peso promedio por individuo de los insectos pesados interdiariamente y se calculó la variación de peso mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Variación de peso (\%)} = \frac{\text{peso promedio al día "n"}^{(a)} - \text{peso promedio inicial}^{(b)}}{\text{peso promedio inicial}} \times 100$$

^(a) *Peso promedio al día "n"*: peso total del grupo de insectos sobrevivientes al día "n" entre el número de sobrevivientes, en miligramos

^(b) *Peso promedio inicial*: peso total del grupo de insectos al día 0 entre el número de insectos seleccionados (30 insectos), en miligramos.

3.6. Estimación de la actividad similar a α -amilasa

La actividad similar a α -amilasa de los grupos de insectos alimentados con las harinas de banano, se estimó mediante el método descrito por González-Quilen (2013). Los grupos de insectos provenientes de cada vial, que sobrevivieron al día 8, fueron homogeneizados en un volumen apropiado de buffer acetato de sodio (50 mmol/L, pH 5 a 4 °C, 15 insectos por mililitro) empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem con 10 golpes a 750 r.p.m. (usualmente un minuto). Luego, los extractos se centrifugaron en tubos Eppendorf a $16.000 \times g$ por 5 min.

Una alícuota de 40 μ L de cada sobrenadante, fue llevada a un volumen final de 0,5 mL con el buffer acetato. Luego, se añadieron 0,5 mL de una solución al 5% de almidón soluble comercial (Fisher Scientific Inc., Nueva Jersey, EE. UU.) gelatinizado en el buffer acetato. La reacción enzimática se desarrolló a 45 °C por 3 minutos, tiempo tras el cual se detuvo añadiendo 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico.

La estimación de los azúcares reductores liberados por las enzimas del insecto se realizó según el método químico propuesto por Hostettler y col. (1951). Para calcular el contenido de azúcares reductores, se utilizó la fórmula de una curva patrón elaborada con un estándar de maltosa 2 g/L: $y = 0,4361x - 0,009$ ($R^2 = 1,000$; $n = 4$). La actividad similar a α -amilasa (ASA) se expresó como los micromoles de equivalentes de maltosa liberados por segundo y por litro del extracto acuoso ($\mu\text{mol/s} \times \text{L}$):

$$ASA (\mu\text{mol}/\text{sxL}) = \frac{\text{maltosa liberada (mg)} \times 10^6 \text{ }^{(a)} \times 10^6 \text{ }^{(b)}}{1000 \text{ }^{(c)} \times 342 \text{ }^{(d)} \times 180 \text{ }^{(e)} \times 40 \text{ }^{(f)}}$$

^(a) Conversión de mol a micromol.

^(b) Conversión de microlitro a litro.

^(c) Conversión de miligramo a gramo.

^(d) Masa molecular de la maltosa, en gramos por mol.

^(e) Tiempo de reacción, en segundos.

^(f) Alícuota del sobrenadante tomada para llevar a cabo la reacción enzimática, en microlitros.

3.7. Determinación de la composición corporal

3.7.1 Contenido de agua corporal

La estimación del contenido de agua se realizó según el método establecido por la AOAC International (1984). Los insectos congelados, se secaron en estufa a 100 °C por 45 min y se pesaron. El proceso se repitió tantas veces como fue necesario, pero por tiempos de secado de 15 min, hasta obtener un peso constante.

El agua corporal se estimó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Agua corporal (\%)} = \frac{Pi \text{ día } 8 \text{ }^{(a)} - Pid \text{ }^{(b)}}{Pi \text{ día } 8 \text{ }^{(a)}} \times 100$$

^(a) Pi día 8: peso de los insectos al día 8, en miligramos.

^(b) Pid: peso de los insectos deshidratados, en miligramos.

3.7.2. Contenido de grasa corporal

La estimación del contenido de grasa se realizó mediante el método descrito por la AOAC International (1984). Los insectos deshidratados, se colocaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 2 mL de éter de petróleo (Riedel-deHaën[®], Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania) y se homogeneizaron, en frío, con 10 golpes a 1.000 rpm; trasvasándose la suspensión a un tubo de ensayo de dimensiones 75 x 10 mm.

Luego se lavó el émbolo y el recipiente del homogeneizador con 1 mL de éter de petróleo, cada uno, y se añadieron a la suspensión anterior. Una vez que sedimentaron todas las partículas sólidas (usualmente 1 min), se trasvasó la solución con la grasa disuelta hacia vidrios de reloj tarados; empleando para ello una pipeta Pasteur. Para este paso, se tomó todo el sobrenadante que se encontraba entre 1 – 2 mm por encima del sedimento. Este proceso de lavado se realizó varias veces sucesivas (entre 3 y 4 veces), agregando 2 mL de éter de petróleo al tubo de ensayo y trasvasando cada sobrenadante al vidrio de reloj, hasta que el éter en los tubos se observó traslúcido. La cuantificación de la grasa presente en cada vidrio de reloj se hizo por diferencia de peso, luego de dejar evaporar el solvente. La grasa corporal se estimó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Grasa corporal (\%)} = \frac{\text{Cantidad de grasa (mg)}}{\text{Pi día 8}^{(a)}} \times 100$$

^(a) Pi día 8: peso de los insectos al día 8, en miligramos.

3.7.3. Contenido de nitrógeno proteico y de nitrógeno cuticular

El nitrógeno proteico es aquel que se encuentra en las proteínas corporales del insecto, mientras que el nitrógeno cuticular está asociado a la molécula de quitina que conforma el exoesqueleto. Ambos componentes deben ser separados para poder llevar a cabo el análisis, por lo que se realizó una extracción en solución alcalina de las proteínas corporales. Para ello, se incubó el material deshidratado y desgrasado (obtenido en la sección anterior) con 2 mL de NaOH 0,5 mol/L por 24 h, con agitación constante. Luego se centrifugó la suspensión a 16.000 g por 5 min para separar la proteína (material soluble) de la cutícula (material insoluble). Se agregó 1 mL de NaOH 0,5 mol/L al sedimento y se

repitió el proceso de extracción por 24 h adicionales; combinándose ambos sobrenadantes al final de las extracciones.

Ambas fracciones (soluble e insoluble) se digirieron químicamente para la posterior cuantificación de nitrógeno. Para ello, las fracciones fueron colocadas en tubos de digestión (1 mL de la fracción soluble y la fracción insoluble completa envuelta en papel de filtro Carl Schleicher & Schull N° 595 de 25 mm de diámetro) y se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (Fluka[®], Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania) junto con una pequeña cantidad (58 – 61 mg) de catalizador de cobre (sulfato de cobre:sulfato de potasio, 1:9) (Riedel-deHaën[®], Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania), en cada uno de ellos. La mineralización de la materia orgánica se realizó en un digestor Kjeldhal a 350 °C hasta que se logró la transparencia total de la muestra (usualmente 4 horas). Luego de la digestión y de que se enfriaran los tubos, se agregaron 4 y 5 mL de agua, respectivamente, a las fracciones soluble e insoluble; midiéndose el volumen final de cada fracción.

La cuantificación del nitrógeno en cada muestra se realizó mediante el método descrito por Cherry (1973) y modificado por Carmona y Gómez-Sotillo (1997). Se tomaron 50 µL del extracto proteico o del extracto cuticular, luego de la digestión, y se llevaron a un volumen final de 3 mL con agua destilada. Luego se agregaron 400 µL de KOH 4 mol/L y se incubaron las muestras con 0,1 mL del reactivo de Nessler (Ricca Chemical Company, Arlington, TX, EE. UU.), por 10 min. Por último, se midió la absorbancia a 490 nm para obtener la cantidad de nitrógeno a partir de una curva de calibración; utilizando una solución patrón de sulfato de amonio de concentración 47 µg/mL (10 µg de nitrógeno/mL): $y = 0,0642x - 0,001$ ($R^2 = 0,998$; $n = 7$).

Los contenidos de nitrógeno proteico (NP) y de nitrógeno cuticular (NC) se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$NP (\%) = \frac{\text{cantidad de nitrógeno } (\mu g) \times Vf^{(a)} \times 3^{(b)}}{0,05^{(c)} \times 1000^{(d)} \times 1^{(e)} \times Pi \text{ día } 8^{(f)}} \times 100$$

$$NC (\%) = \frac{\text{cantidad de nitrógeno } (\mu g) \times Vf^{(a)}}{0,05^{(c)} \times 1000^{(d)} \times Pi \text{ día } 8^{(f)}} \times 100$$

- (a) Vf: Volumen final de la solución con la muestra digerida, en mililitros.
- (b) Volumen de la solución alcalina agregada al material deshidratado y desgrasado, en mililitros.
- (c) Alícuota tomada para la cuantificación del nitrógeno, en mililitros.
- (d) Factor de conversión de microgramo a miligramo.
- (e) Volumen de la fracción soluble utilizada en la digestión química, en mililitros.
- (f) Pi día 8: peso de los insectos al día 8, en miligramos.

3.7.4. Contenido de los otros componentes del cuerpo

El contenido del resto de los componentes del cuerpo de los insectos se estimó como el parámetro “otros”. Este biomarcador contiene a los carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno), a las cenizas (minerales) y a los esqueletos carbonados de las proteínas y del exoesqueleto del gorgojo de arroz. Este parámetro se calculó de la siguiente manera:

$$Otros (\%) = 100 - (\text{agua corporal} + \text{grasa corporal} + NP + NC)$$

NP: Nitrógeno proteico.

NC: Nitrógeno cuticular.

3.8. Estimación de la excreción de ácido úrico

La excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz fue estimada mediante el método propuesto por González-Quilen y Laurentin (2012). El ácido úrico se extrajo a partir de las excretas adheridas a la superficie interna del vial de vidrio y de los restos de la dieta al final del bioensayo (día 8). Se requirió primeramente, la transferencia exhaustiva de los restos de la dieta fuera del vial y su posterior homogeneización. Las semillas artificiales de harina se trituraron manualmente con un mortero; mientras que las arvejas verdes de la condición alimentada, se molieron en un molinillo eléctrico previo a la trituración manual con el mortero. Una vez homogeneizado el material, se pesó y se devolvió cuidadosamente al vial, una alícuota de 500 mg. La extracción del ácido úrico se realizó vertiendo 2 mL de agua destilada en ebullición sobre los restos de la dieta, procurando arrastrar las excretas adheridas al vial de vidrio. Luego de mezclar el contenido del vial empleando un vórtex a velocidad máxima durante un minuto, se transfirió la suspensión a un par de tubos Eppendorf (1 mL de suspensión por cada tubo). Los tubos Eppendorf se centrifugaron a $16.000 \times g$ durante 5 min. Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación se juntaron en un tercer tubo Eppendorf. Para la extracción de los viales de la condición de ayuno, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero obviando el paso de la homogeneización.

La estimación del contenido de ácido úrico se realizó con ayuda de un estuche comercial (ácido úrico enzimático-colorimétrico cat. 89015, Industrias Invelab[®], Caracas). Se adicionaron en un tubo de ensayo, 25 μ L del sobrenadante junto con 1 mL del reactivo enzimático. Una vez iniciada la reacción, los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min. Luego, se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 520 nm de las muestras. Para determinar la cantidad de ácido úrico presente en cada tubo

del ensayo colorimétrico a partir de las absorbancias medidas, se utilizó la ecuación de una curva patrón elaborada con el estándar de ácido úrico 0,05 g/L del estuche comercial: $y = 0,1572x - 0,001$ ($R^2 = 1,000$; $n = 12$).

El método colorimétrico acopla las reacciones de dos enzimas: la uricasa y la peroxidasa. El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa produciendo alantoína, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno. Este último oxida al cromógeno (4-aminoantipirina y dihidroxibisulfonato) en presencia de la peroxidasa, produciendo un complejo rosado cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra.

La excreción de ácido úrico (EAU) se reportó como los miligramos de ácido úrico excretado durante los 8 días del bioensayo, por el peso, en kilogramos, de los insectos sobrevivientes al día 8; según la siguiente ecuación:

$$EAU (mg/kg) = \frac{\text{Cantidad de ácido úrico } (\mu g) \times 2^{(a)} \times 1000^{(b)}}{0,025^{(c)} \times \text{Pi día } 8^{(d)}}$$

^(a) Volumen de agua donde ocurre la extracción, en mililitros.

^(b) Conversión de microgramo por miligramo a miligramo por kilogramo.

^(c) Alícuota tomada para la cuantificación del ácido úrico, en mililitros.

^(d) Pi día 8: peso de los insectos al día 8, en miligramos.

3.9. Análisis estadístico

Las regresiones lineales se calcularon empleando el programa Microsoft Office Excel[®] 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE. UU.). El análisis de varianza de una vía y correlaciones simples, se realizaron con Minitab[®] 16 de Minitab Inc. (State College, Pensilvania, EE. UU.); utilizando $p < 0,05$ como nivel de significancia.

V. RESULTADOS

En el presente trabajo, se caracterizó la digestibilidad de las harinas de los frutos de los ocho clones (tres con genomio *acuminata*, tres híbridos y dos con genomio *balbisiense*) de plantas del género *Musa*. Para ello, se llevaron a cabo los estudios *in vitro* e *in vivo* mencionados en la sección anterior.

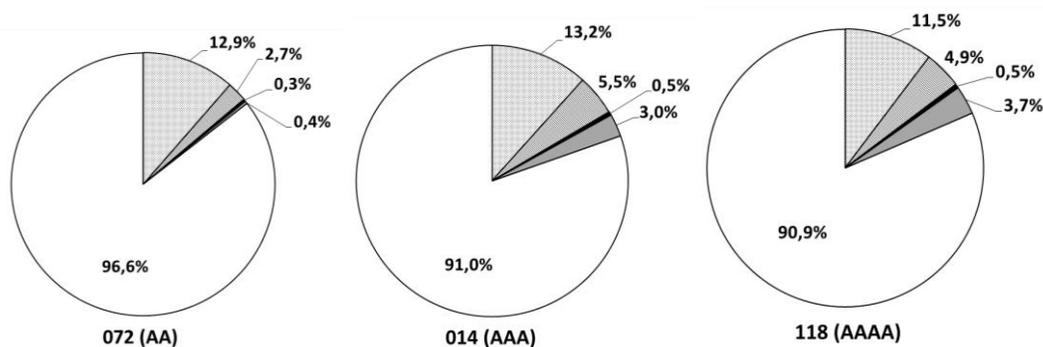
La composición proximal de las ocho harinas que comprenden el presente estudio se presenta en la **Tabla 3** y en la **Figura 3**. El porcentaje de humedad de las harinas estuvo entre 10,7 – 13,2%, el de proteína cruda entre 2,4 – 5,5%, el de grasa cruda entre 0,3 – 1,4%, el de cenizas estuvo entre 0,4 – 3,7% y el porcentaje de carbohidratos estuvo entre 90,9 – 96,6%, siendo este último nutriente notablemente superior al resto.

Tabla 3. Composición proximal de las harinas de banano.

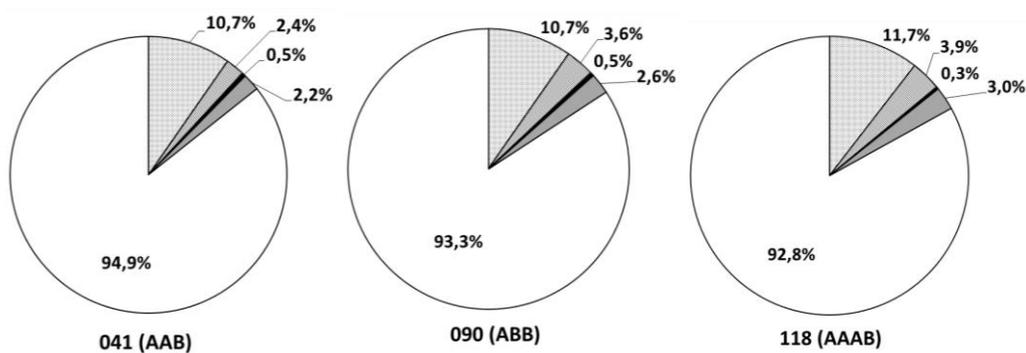
Genomio	Clon	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)
AA	072	12,85 ± 0,03 ^a	2,74 ± 0,04 ^g	0,33 ± 0,00 ^e	0,37 ± 0,00 ^g	96,56 ± 0,04 ^a
AAA	014	13,18 ± 0,31 ^a	5,50 ± 0,06 ^a	0,48 ± 0,00 ^{b,c}	3,04 ± 0,01 ^c	90,98 ± 0,06 ^g
AAAA	118	11,52 ± 0,03 ^d	4,92 ± 0,02 ^b	0,49 ± 0,01 ^{b,c}	3,72 ± 0,04 ^a	90,87 ± 0,03 ^h
AAB	041	10,70 ± 0,33 ^e	2,44 ± 0,04 ^h	0,51 ± 0,02 ^b	2,20 ± 0,07 ^f	94,85 ± 0,12 ^b
ABB	090	10,72 ± 0,16 ^e	3,64 ± 0,01 ^d	0,47 ± 0,01 ^c	2,62 ± 0,06 ^d	93,27 ± 0,06 ^d
AAAB	108	11,72 ± 0,04 ^{c,d}	3,93 ± 0,03 ^c	0,31 ± 0,02 ^e	3,00 ± 0,02 ^c	92,75 ± 0,05 ^e
BB	009	12,40 ± 0,06 ^b	3,15 ± 0,02 ^e	1,42 ± 0,02 ^a	3,17 ± 0,03 ^b	92,26 ± 0,01 ^f
BBB	093	11,88 ± 0,04 ^c	3,03 ± 0,06 ^f	0,39 ± 0,03 ^d	2,54 ± 0,01 ^e	94,04 ± 0,08 ^c

Los porcentajes son el promedio ± la desviación estándar (n = 3). Los valores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente (p > 0,05; ANOVA, prueba de Fisher). Los porcentajes de humedad y proteína cruda de la harina de maíz utilizada como referencia del bioensayo fueron 9,88 ± 0,53%; n = 3 y 5,96 ± 0,03%; n = 3, respectivamente. Los valores presentados fueron suministrados por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Doctora Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Las estimaciones se realizaron mediante los métodos descritos por la AACC (2003) para cada componente.

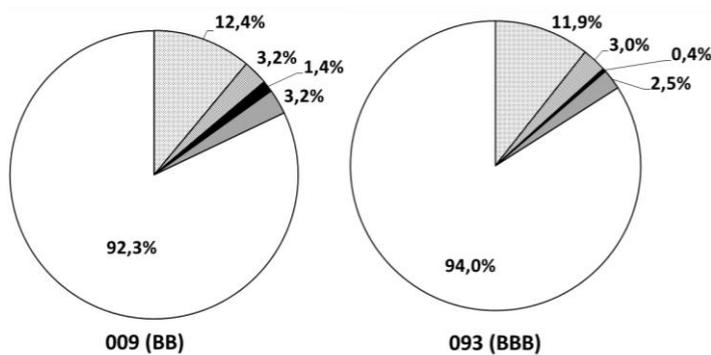
Harinas de clones con genomio *acuminata*



Harinas de clones híbridos



Harinas de clones con genomio *balbisiana*



■ Humedad ■ Proteína cruda ■ Grasa cruda ■ Cenizas □ Carbohidratos

Figura 3. Composición proximal de las harinas de banana.

Los datos representados en estas gráficas fueron tomados de la Tabla 3.

1. Digestibilidad *in vitro* de las harinas

1.1. Almidón disponible

En la **Tabla 4** se muestra el contenido de almidón disponible de las harinas estudiadas. En la mayoría de las harinas el porcentaje de almidón disponible fue superior a 70%, siendo la excepción las harinas de los clones 072 (AA) y 009 (BB), que exhibieron los menores porcentajes (65% y 41%, respectivamente).

Tabla 4. Contenido de almidón disponible en las harinas de banano.

Genomio	Clon	Almidón disponible (%)
AA	072	65,5 ± 4,4 ^c
AAA	014	75,8 ± 1,5 ^{a,b}
AAAA	118	72,8 ± 0,2 ^{a,b}
AAB	041	78,5 ± 0,4 ^a
ABB	090	71,9 ± 4,3 ^b
AAAB	108	70,5 ± 5,6 ^{b,c}
BB	009	41,0 ± 1,0 ^d
BBB	093	75,9 ± 1,9 ^{a,b}

Los valores son el promedio ± la desviación estándar sobre la base seca (g/100 g; n = 3). Los valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). El tenor de almidón disponible de la harina de maíz utilizada como referencia del bioensayo fue 83,0 ± 1,95%; n = 3. Como control de calidad para el ensayo de almidón disponible se utilizó el almidón de papa comercial *Potatis mjöl* (*Lyckeby Stärkelsen*, Suecia; 95,3 ± 2,4%; n = 8).

1.2. Almidón resistente total

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón resistente total en las harinas de los clones de banano estudiadas. En casi todos los casos el contenido de almidón resistente fue superior a 40%, siendo la excepción las harinas de los clones 118 (AAAA) y 090 (ABB), que exhibieron los menores porcentajes (37% y 32% respectivamente).

Tabla 5. Contenido de almidón resistente total en las harinas de banano.

Genomio	Clon	Almidón resistente total (%)
AA	072	43,9 ± 2,8 ^a
AAA	014	41,0 ± 1,8 ^a
AAAA	118	37,1 ± 1,2 ^b
AAB	041	40,5 ± 1,7 ^{a,b}
ABB	090	31,8 ± 1,3 ^c
AAAB	108	41,2 ± 3,1 ^a
BB	009	42,2 ± 3,3 ^a
BBB	093	40,1 ± 1,2 ^a

Los valores son el promedio ± la desviación estándar sobre la base seca (g/100 g; n = 3). Los valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). El tenor de almidón resistente de la harina de maíz utilizada como referencia del bioensayo fue $0,87 \pm 0,04\%$; n = 3. Como control de calidad para el ensayo de almidón resistente total se utilizó el almidón del plátano hartón común ($43,0 \pm 2,4\%$; n = 13; AAB). El tenor de almidón resistente total para el Corn flakes[®] fue de $3,80 \pm 0,04\%$; n = 5)

1.3. Tasa de α -amilólisis *in vitro*

Las curvas de α -amilólisis *in vitro* estimadas para las harinas crudas y gelatinizadas de los bananos se muestran en la **Figura 4**. Los porcentajes de hidrólisis fueron expresados sobre la base de almidón disponible a fin de garantizar que la diferencia en la tasa de digestión, obedezca a las propiedades intrínsecas de las harinas ensayadas y no a la diferencia en la concentración de los α -glucanos potencialmente digeribles. Para la evaluación de la cinética de hidrólisis se consideraron dos parámetros (**Tabla 6**): la velocidad de hidrólisis inicial, que constituye la proporción de almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos de la reacción, y la magnitud de hidrólisis final, que representa la proporción total de almidón digerido al cabo de los 60 minutos de duración del ensayo. En casi todos los casos la velocidad inicial (0,8 – 5,3%) y la magnitud final de hidrólisis (2 – 10%) de las harinas crudas fueron muy inferiores a las obtenidas en las harinas gelatinizadas (61 – 88% y 79 – 104%, respectivamente) (**Tabla 6**); destacándose la harina gelatinizada del clon 072 (AA), donde se estimó que la totalidad del almidón disponible fue

hidrolizado, la harina del clon 009 (BB), donde la velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis en estado gelatinizado (5% y 8%, respectivamente) fueron cercanas a la obtenidas en la harina cruda (1 y 4%, respectivamente) y la harina 093 (BBB), donde la magnitud final de hidrólisis en estado gelatinizado exhibió un valor cercano a la velocidad inicial en ese mismo estado. En la **Figura 4D**, que corresponde a las mismas muestras de la **Figura 4C** (harinas con genomio *balbisiana*), no se realizó la corrección de los valores por el porcentaje de almidón hidrolizado antes de agregar la enzima ($t = 0$), con la finalidad de mostrar el alto poder reductor presente en dichas harinas antes de iniciar el ensayo enzimático.

Tabla 6. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis *in vitro* de las harinas de banano.

Genomio	Clon	Cruda		Gelatinizada	
		Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)
AA	072	3,12	5,61	79,48	103,51
AAA	014	5,34	9,96	80,13	93,43
AAAA	118	1,30	4,70	79,00	88,22
AAB	041	1,15	2,28	60,55	84,57
ABB	090	2,19	3,57	88,05	96,57
AAAB	108	3,76	6,35	62,89	94,22
BB	009	1,84	4,41	4,64	8,44
BBB	093	0,84	1,96	74,10	79,17

Los valores son el promedio del almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible de dos determinaciones próximas. La velocidad inicial es la proporción del almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos, mientras que la magnitud final es la proporción total del almidón hidrolizado al cabo de los 60 minutos que dura el ensayo. La velocidad inicial y la magnitud final de hidrólisis obtenidas en la harina de maíz ($n = 3$) empleada como referencia en el bioensayo fueron $6,92 \pm 0,08\%$ y $16,47 \pm 1,18\%$ en estado crudo; mientras que en la harina gelatinizada, dichos valores fueron $76,54 \pm 0,93\%$ y $85,08 \pm 0,53\%$, respectivamente. Como control de calidad para el ensayo de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado (Maizina Americana[®], Alfonso Rivas & Cía., Turmero; $n = 9$); los valores obtenidos fueron $76,11 \pm 5,60\%$ y $87,66 \pm 2,95\%$ para la velocidad inicial y la magnitud final, respectivamente.

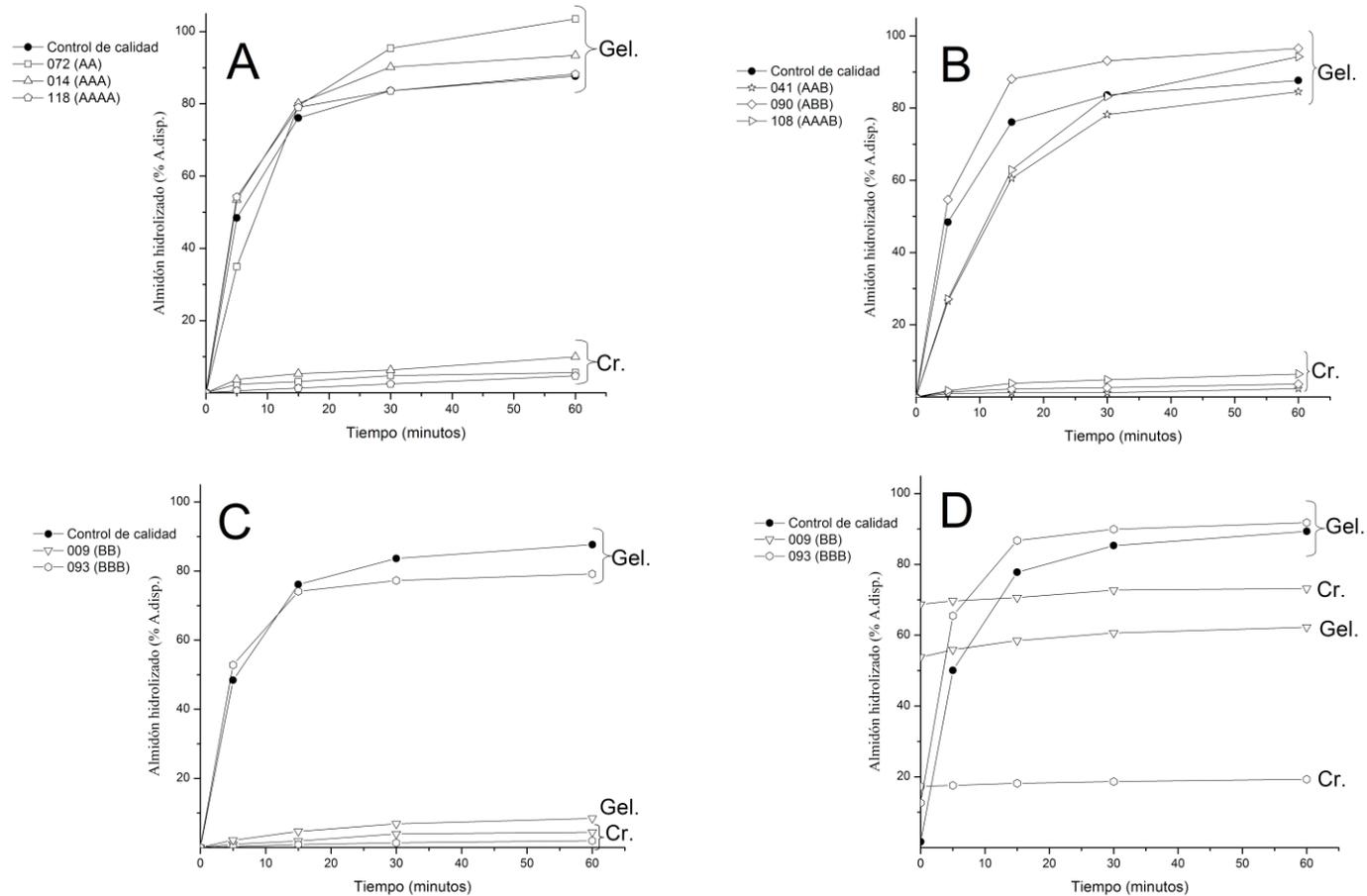


Figura 4. Cinética de hidrólisis *in vitro* de las harinas de banana.

(A) Harinas de clones con genomio *acuminata*. (B) Harinas de clones híbridos. (C) Harinas de clones con genomio *balbisiana*. (D) Harinas de clones con genomio *balbisiana* sin corregir por el almidón hidrolizado a t = 0 min. Cada punto representa el porcentaje del almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible y constituye el promedio de dos determinaciones próximas. Cr: harina cruda, Gel: harina gelatinizada. Como control de calidad para los ensayos de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado (Maizina Americana[®], Alfonso Rivas & Cía., Turmero; n = 9).

2. Digestibilidad *in vivo* de las harinas

El gorgojo de arroz (*S. oryzae*) fue empleado como modelo animal en los estudios *in vivo*. Se evaluó la supervivencia, la variación del peso, los cambios en la composición corporal, la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico de los insectos, como posibles biomarcadores de la digestibilidad de las dietas suministradas. El uso de estos biomarcadores requiere su comparación con una dieta de referencia. En trabajos realizados en almidones aislados se ha utilizado el almidón de maíz, un almidón de alta digestibilidad, como referencia. Por esta razón y dado que el presente estudio se realizó en harinas (las cuales, a diferencia de los almidones aislados, poseen una matriz alimentaria en la cual el almidón interacciona con los otros componentes), se decidió utilizar la harina de maíz como dieta de referencia.

La obtención de esta harina a partir del *gritz* de maíz tuvo sus dificultades, pues a pesar de diversos intentos, no se logró moler todo el material y se decidió utilizar solo la fracción que pasó el tamiz de 0,250 mm (60 mesh). Por lo cual se procedió a realizar la caracterización granulométrica de la harina en cuestión, es decir, determinar el tamaño aproximado de las partículas que conforman dicha harina. Esta caracterización se realizó conjuntamente con la de una harina de maíz precocida comercial de alto consumo en la población venezolana. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 5**, donde el eje X, que representa el tamaño del tamiz, se grafica mediante una escala cualitativa categórica, no numérica. Se puede apreciar una relación inversa entre el diámetro del tamiz y el porcentaje de harina retenida en la harina de maíz utilizada como referencia, siendo retenida la mayor fracción de dicha harina en el contenedor [lo cual indica que el diámetro

de las partículas es inferior a 180 μ m (80 mesh)], mientras que la harina de maíz precocida presentó partículas de mayor tamaño; obteniéndose los mayores porcentajes de retención en los tamices de 0,300 mm (50 mesh) y 0,425 mm (40 mesh).

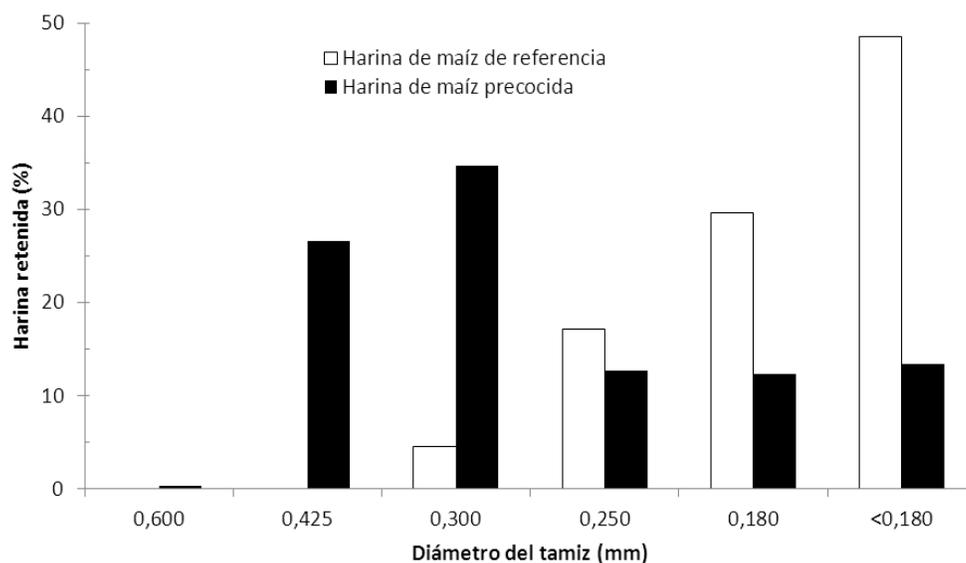


Figura 5. Granulometría de la harina de maíz de referencia.

El diámetro del tamiz es una escala cualitativa categórica, no numérica. Cada barra representa el porcentaje de harina retenida en el respectivo tamiz. La harina de maíz precocida es una harina comercial de alto consumo en Venezuela. La granulometría se obtuvo agitando mecánicamente cada harina por 5 min de acuerdo al método descrito por Bedolla y Rooney (1984).

2.1. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano

En la **Figura 6** se muestra la supervivencia de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo (condición de ayuno y condición alimentada) y la harina de referencia (harina de maíz), a lo largo de ocho días. La supervivencia en el control alimentado y la referencia se mantuvo muy cercana a 100% durante todo el bioensayo; encontrándose porcentajes al día ocho de 98% en control alimentado y 99% en la referencia, mientras que el porcentaje de supervivencia de la condición de ayuno comenzó a disminuir drásticamente a partir del día cuatro, hasta llegar a 4% en el día ocho del bioensayo.

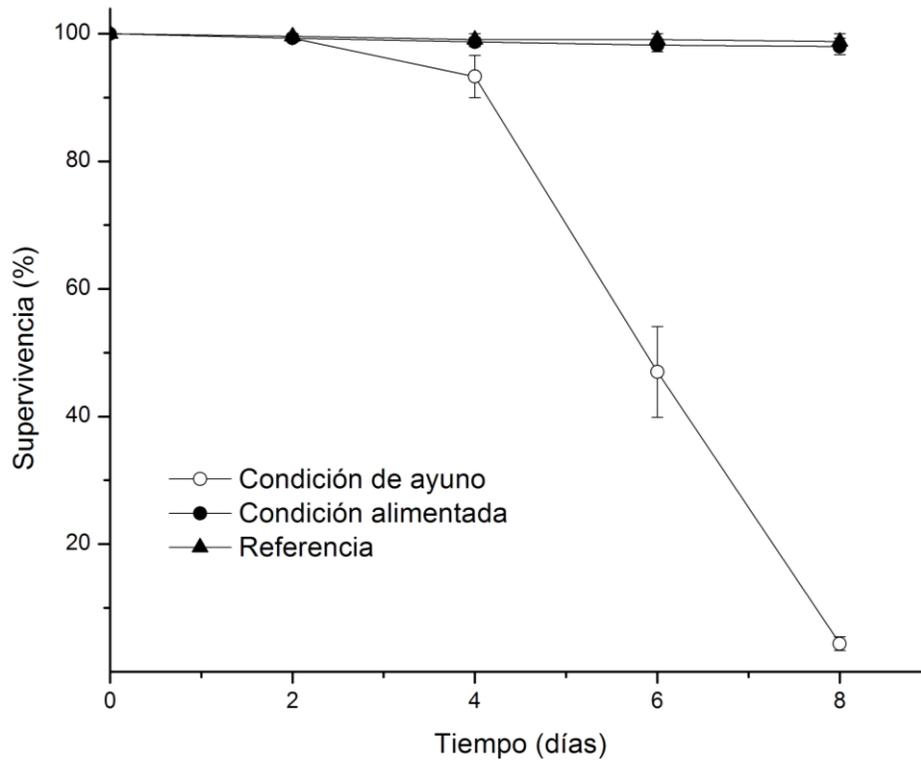


Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en la harina de referencia.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). La condición alimentada fue la dieta de arvejas verdes. La referencia fue la harina de maíz.

En la **Figura 7** se muestra la supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano. Las harinas con genomio *acuminata* y las harinas con genomio *balbisiana* exhibieron una supervivencia de comportamiento similar a la harina de referencia, mientras que las harinas de los clones híbridos 090 (ABB) y 108 (AAAB) exhibieron los porcentajes de supervivencia más bajos (88% y 92% respectivamente); siendo dichos valores estadísticamente inferiores a lo hallado en la referencia.

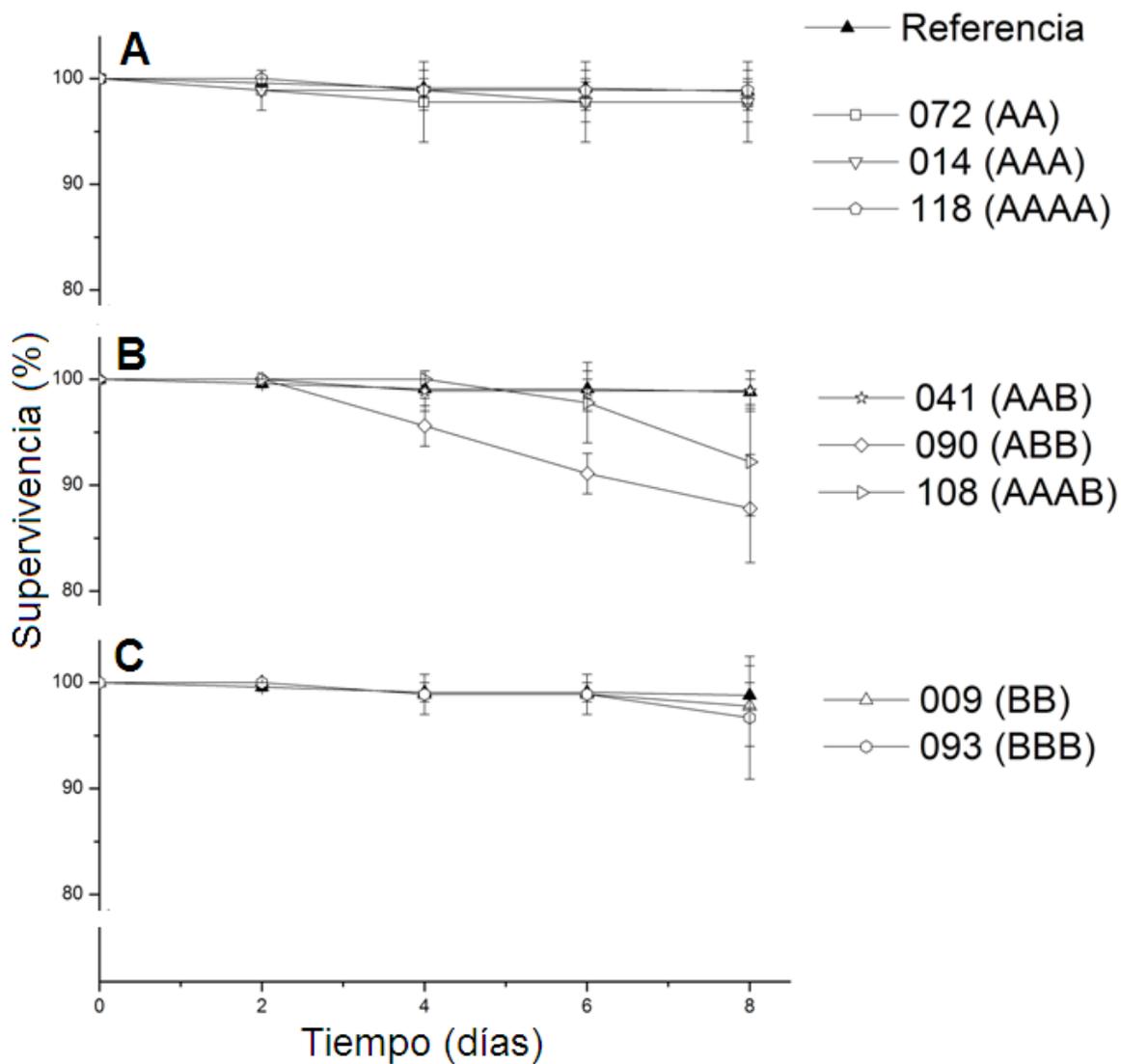


Figura 7. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de harina de banano.

(A) Harinas de clones con genomio *acuminata*. (B) Harinas de clones híbridos. (C) Harinas de clones con genomio *balbisiana*. La referencia fue la harina de maíz. Las barras indican la desviación estándar de la media (n = 3).

2.2. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano

La **Figura 8** muestra la variación de peso de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo y la harina de referencia, a lo largo de ocho días. Las dietas de la condición alimentada (arvejas verdes partidas) y la harina de referencia (harina de maíz) generaron incrementos de peso muy similares durante los primeros cuatro días del bioensayo, mientras que en los días restantes el incremento de peso fue mayor en la dieta de la condición alimentada (11% en el día ocho) que en la dieta de referencia (9,2% en el día ocho) donde el peso incrementó poco (apenas 0,4%) a partir del cuarto día del bioensayo. En la condición de ayuno se registró una disminución continua del peso de los insectos hasta 42% del peso inicial al final del bioensayo.

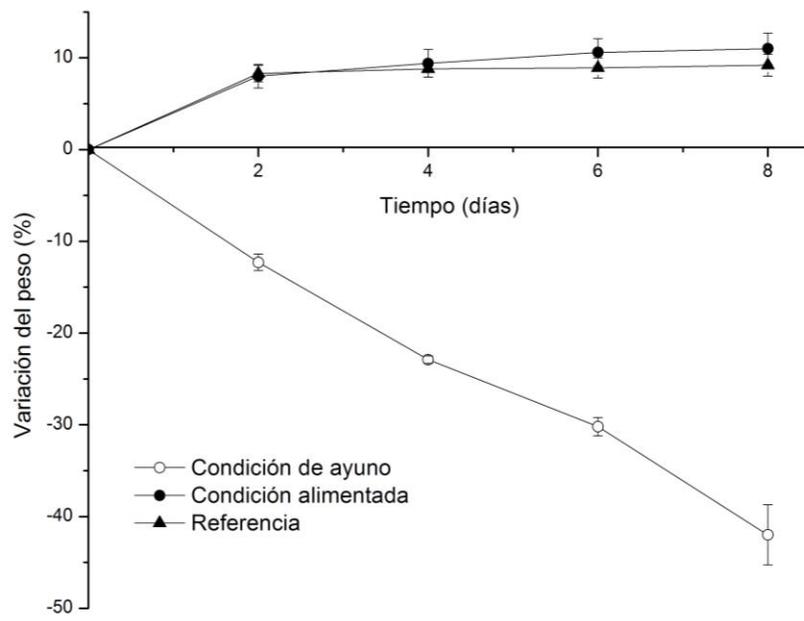


Figura 8. Variación del peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). La condición alimentada fue la dieta de arvejas verdes. La referencia fue la harina de maíz.

La variación de peso de los insectos mantenidos en las dietas de harinas de banano a lo largo de ocho días se muestra en la **Figura 9**. En casi todos los casos se registró un incremento que estuvo entre 7 – 10%, siendo la excepción la dieta 009 (BB), donde se registró un incremento de 4% que fue significativamente menor al estimado en la dieta de referencia.

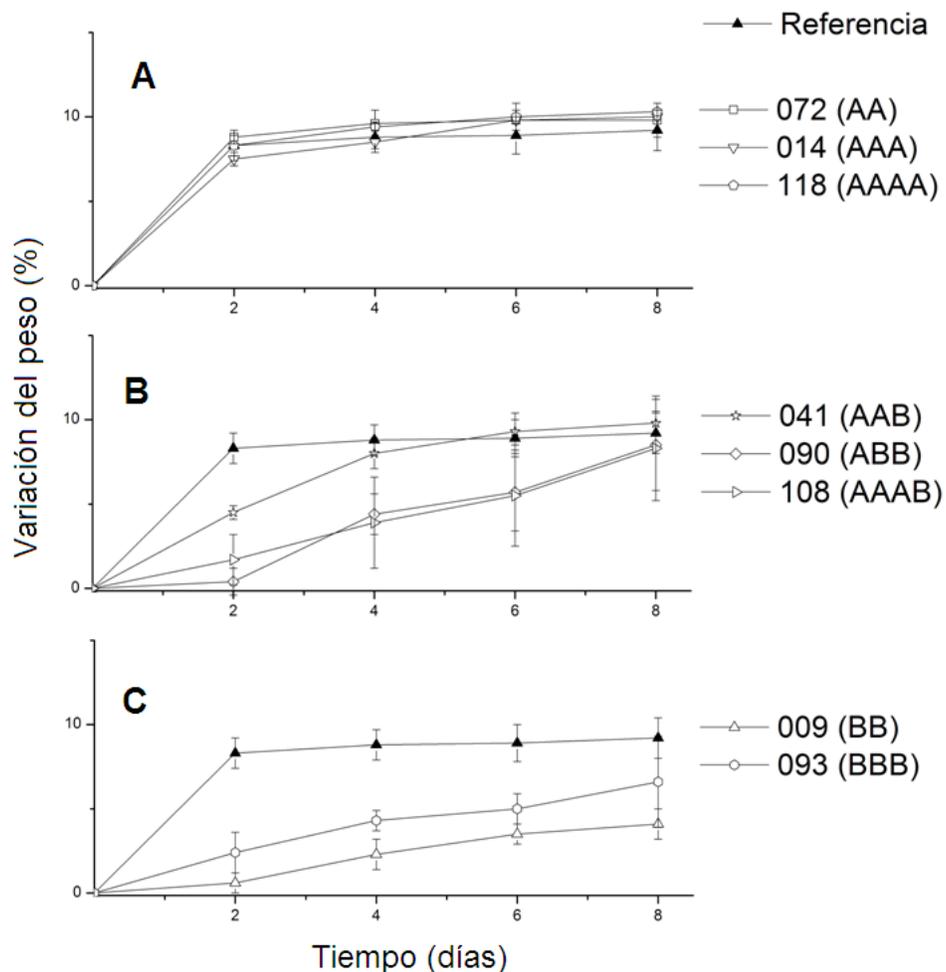


Figura 9. Variación del peso del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.

(A) Harinas de clones con genomio *acuminata*. (B) Harinas de clones híbridos. (C) Harinas de clones con genomio *balbisiiana*. Las barras indican la desviación estándar de la media (n = 3). La referencia fue la harina maíz.

2.3. Cambios en la composición corporal

En las **Tablas 7 y 8** y la **Figura 10** se muestra la composición corporal de los insectos alimentados con las dietas controles del bioensayo, la harina de referencia y las harinas de banano. El peso promedio al día 8 fue significativamente menor (cambio porcentual: -42% ; $p < 0,05$) en la condición de ayuno con respecto a la condición alimentada. Entre los insectos sometidos a la dieta de referencia y los de la condición alimentada solo hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes agua y grasa corporal; siendo este último biomarcador el único en el cual la harina de referencia (11%) generó un porcentaje mayor al de la condición alimentada (6,6%). Los porcentajes de nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular fueron ligeramente superiores a 1,8% en ambas dietas (**Tabla 7**).

2.3.1. Agua corporal

El porcentaje de agua corporal al final del bioensayo en los insectos sometidos a las dietas de harinas de banano estuvo entre 47% – 51%. La dieta de referencia exhibió un porcentaje de agua corporal de 49,4%, que fue inferior al hallado en las harinas 014 (AAA) y 041 (AAB) y superior al porcentaje estimado en la harina 009 (BB) (**Tabla 8**).

2.3.2. Grasa corporal

El porcentaje de grasa corporal en los insectos sometidos a las dietas de harinas de banano estuvo entre 9 – 13%. Los insectos alimentados con las harinas 072 (AA), 090 (ABB) y 108 (AAAB) exhibieron un porcentaje de grasa corporal superior al estimado en la dieta de referencia (11%). Solo dos harinas [014 (AAA) y 041 (AAB)] generaron una menor acreción de grasa en el insecto que la harina de referencia (9,6% y 9,3% respectivamente) (**Tabla 8**).

2.3.3. Nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular

El contenido de nitrógeno proteico estuvo alrededor de 1% en la mayoría de las dietas de harinas de banano; destacando la harina 093 (BBB) por ser la que generó la mayor acreción de este parámetro (2,4%) en los insectos. El porcentaje de nitrógeno proteico en los insectos sometidos a cinco de las ocho dietas de harina de banano [072 (AA), 014 (AAA), 041 (AAB), 090 (ABB) y 108 (AAAB)] fue inferior al estimado en los insectos alimentados con la dieta de referencia; destacando la harina 041 (AAB), por ser la única cuyo porcentaje de nitrógeno proteico estuvo por debajo de 1% (**Tabla 8**).

El porcentaje de nitrógeno cuticular estuvo alrededor de 2% (1,9 – 2,2%) en todos los casos, incluyendo la dieta de referencia (**Tabla 8**). No hubo diferencias estadísticamente significativas de este parámetro entre los insectos alimentados con la harina de referencia y los insectos alimentados con las harinas de banano.

2.3.4. Contenido de otros componentes

El parámetro otros estuvo entre 33% – 36%, y solo los insectos alimentados con la harina 108 (AAAB) presentaron un porcentaje de este parámetro significativamente menor que el estimado en la dieta de referencia (**Tabla 8**).

Tabla 7. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en la harina de referencia.

Dieta	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Agua corporal (%)	Grasa corporal (%)	Nitrógeno proteico (%)	Nitrógeno cuticular (%)	Otros (%)
Ayuno	1,63 ± 0,01 ^a	0,94 ± 0,05 ^b	*	*	*	*	*
Alimentado	1,47 ± 0,03 ^b	1,63 ± 0,04 ^a	52,7 ± 1,4 ^a	6,60 ± 0,4 ^b	2,05 ± 0,04 ^a	2,16 ± 0,08 ^a	36,3 ± 0,8 ^a
Referencia	1,57 ± 0,05 ^a	1,71 ± 0,05 ^a	49,4 ± 0,7 ^b	11,0 ± 0,5 ^a	1,85 ± 0,62 ^a	2,07 ± 0,04 ^a	35,6 ± 0,8 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar (n = 3). Valores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). La condición alimentada fue la dieta de arvejas verdes. La referencia utilizada fue la harina de maíz.

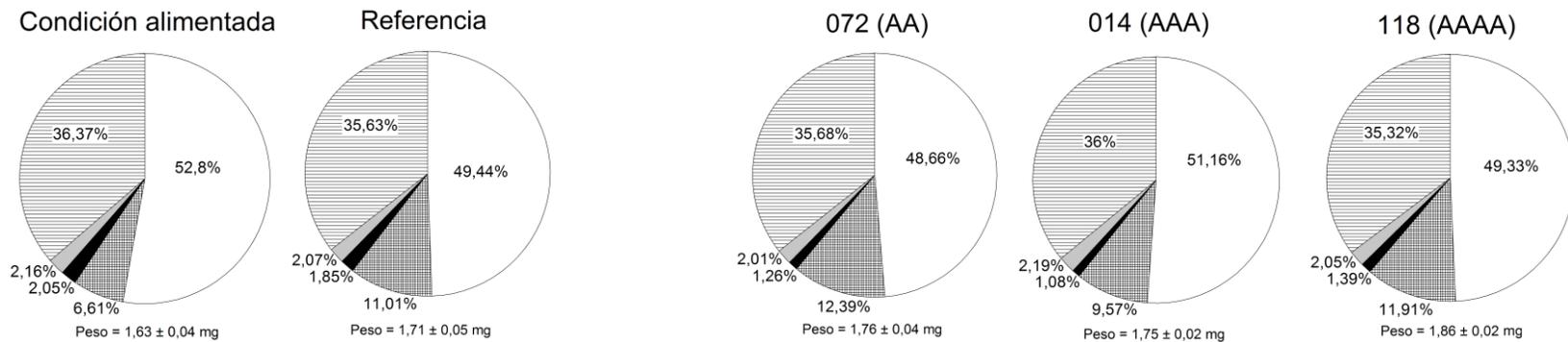
* La composición corporal de la condición de ayuno no se pudo determinar debido a la alta mortalidad registrada en dicha dieta (**Figura 6**).

Tabla 8. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de harina de banano.

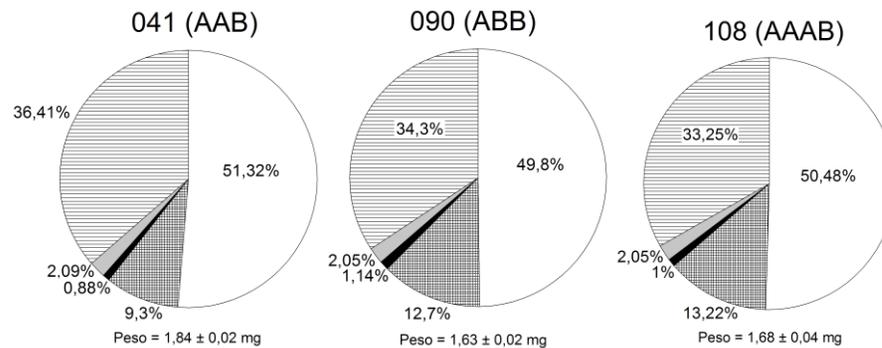
Genomio	Dieta	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Agua corporal (%)	Grasa corporal (%)	Nitrógeno proteico (%)	Nitrógeno cuticular (%)	Otros (%)
–	Referencia	1,57 ± 0,05 ^{d,e}	1,71 ± 0,05 ^{b,c}	49,4 ± 0,7 ^{b,c}	11,0 ± 0,5 ^b	1,85 ± 0,62 ^b	2,07 ± 0,04 ^{a,b}	35,6 ± 0,8 ^{a,b,c}
AA	072	1,60 ± 0,02 ^{c,d}	1,76 ± 0,04 ^b	49,1 ± 0,6 ^{b,c}	12,5 ± 1,0 ^a	1,27 ± 0,32 ^{c,d}	2,03 ± 0,06 ^{a,b}	36,0 ± 0,8 ^{b,c}
AAA	014	1,59 ± 0,01 ^{d,e}	1,75 ± 0,02 ^b	51,3 ± 1,4 ^a	9,6 ± 0,0 ^c	1,08 ± 0,08 ^{c,d,e}	2,20 ± 0,13 ^{a,b}	36,1 ± 1,4 ^{a,b}
AAAA	118	1,68 ± 0,02 ^a	1,86 ± 0,02 ^a	49,3 ± 0,7 ^{b,c}	11,9 ± 0,8 ^{a,b}	1,39 ± 0,14 ^{b,c}	2,05 ± 0,08 ^{a,b}	35,3 ± 0,7 ^{a,b,c}
AAB	041	1,68 ± 0,01 ^{a,b}	1,84 ± 0,02 ^a	51,3 ± 0,8 ^a	9,3 ± 0,6 ^c	0,88 ± 0,09 ^e	2,09 ± 0,02 ^{a,b}	36,4 ± 0,4 ^{a,b}
ABB	090	1,51 ± 0,01 ^f	1,63 ± 0,02 ^e	49,8 ± 1,1 ^{b,c}	12,7 ± 0,6 ^a	1,14 ± 0,08 ^{c,d,e}	2,05 ± 0,35 ^{a,b}	34,3 ± 0,7 ^{c,d}
AAAB	108	1,56 ± 0,01 ^e	1,68 ± 0,04 ^{c,d}	50,4 ± 0,3 ^{a,b}	13,2 ± 1,0 ^a	1,00 ± 0,15 ^{d,e}	2,05 ± 0,08 ^a	33,2 ± 0,7 ^d
BB	009	1,57 ± 0,01 ^{d,e}	1,64 ± 0,02 ^{d,e}	47,2 ± 0,5 ^d	12,1 ± 1,0 ^{a,b}	1,80 ± 0,04 ^{a,b}	2,20 ± 0,13 ^a	36,6 ± 0,4 ^a
BBB	093	1,64 ± 0,03 ^{b,c}	1,74 ± 0,01 ^b	48,5 ± 0,8 ^{c,d}	11,2 ± 0,7 ^b	2,41 ± 0,16 ^a	1,93 ± 0,05 ^b	36,0 ± 1,0 ^{a,b}

Los valores son el promedio ± desviación estándar (n = 3). La referencia utilizada fue la harina de maíz. Valores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente (p > 0,05; ANOVA, prueba de Fisher).

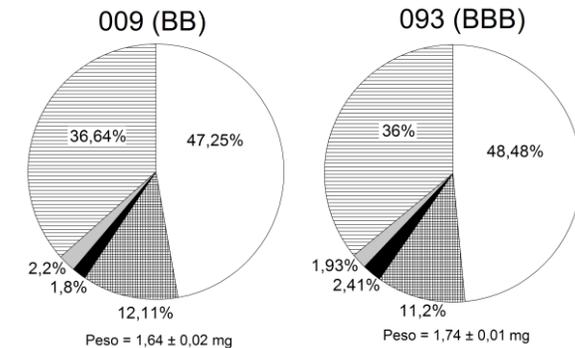
Harinas de clones con genomio *acuminata*



Harinas de clones híbridos



Harinas de clones con genomio *balbisiana*



Agua corporal (%)
 Grasa corporal (%)
 Nitrógeno proteico (%)
 Nitrógeno cuticular (%)
 Otros (%)

Figura 10. Composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo, de referencia y de harinas de banano.

Los datos representados en estas gráficas fueron tomados de las **Tablas 7 y 8**. La composición corporal de la condición de ayuno no se pudo determinar debido a la alta mortalidad registrada en dicha dieta (**Figura 6**).

Peso = peso promedio por individuo al final del bioensayo (día 8).

2.4. Actividad similar a α -amilasa

La **Tabla 9** muestra el efecto de las diferentes dietas de harinas de banano sobre la actividad similar a α -amilasa en el gorgojo de arroz. La actividad de la mayoría de las harinas de banano estuvo entre 536 – 578 $\mu\text{mol/s}\times\text{L}$, lo cual equivale a poco más de la mitad del valor de la actividad promovida por la dieta de referencia (943 $\mu\text{mol/s}\times\text{L}$). La harina del clon 009 (BB) promovió una actividad similar a α -amilasa igual a la de la dieta de referencia, siendo ésta la de mayor valor entre todas las harinas de banano, mientras que la actividad más baja (444 $\mu\text{mol/s}\times\text{L}$) se registró en los insectos alimentados con la harina 072 (AA).

Tabla 9. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.

Genomio	Dieta	Actividad similar a α -amilasa ($\mu\text{mol/s}\times\text{L}$)	Cociente de actividad similar a α -amilasa
–	Referencia	943 \pm 74 ^a	1,00
AA	072	444 \pm 43 ^d	0,47
AAA	014	560 \pm 23 ^c	0,59
AAAA	118	536 \pm 38 ^c	0,57
AAB	041	557 \pm 26 ^c	0,59
ABB	090	638 \pm 32 ^b	0,68
AAAB	108	563 \pm 44 ^{b,c}	0,60
BB	009	944 \pm 49 ^a	1,00
BBB	093	578 \pm 48 ^{b,c}	0,61

La actividad similar a α -amilasa está expresada en micromoles de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). La referencia fue la harina de maíz. El cociente constituye la actividad enzimática correspondiente a la dieta entre la actividad enzimática correspondiente a la referencia. La actividad enzimática en la condición alimentada fue de $1198 \pm 34 \mu\text{mol/s}\times\text{L}$ ($n = 3$). La actividad similar a α -amilasa de la condición de ayuno no se pudo determinar debido a la alta mortalidad registrada en dicha dieta (**Figura 6**).

2.5. Excreción de ácido úrico

En la **Tabla 10** se muestra la excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con las dietas de harina de los diferentes clones de banano. Los mayores niveles de excreción se encontraron en los insectos alimentados con las harinas 118 (AAAA) y 108 (AAAB), cuyos valores fueron superiores al de la dieta de referencia. Los menores niveles de excreción se registraron en los insectos alimentados con las dietas de harinas de genomio *balbisiana* [009 (BB) y 093 (BBB)], que al igual que las harinas 074 (AA) y 014 (AAA) exhibieron valores estadísticamente menores que el estimado en la referencia.

Tabla 10. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano.

Genomio	Dieta	Excreción de ácido úrico (mg/kg)	Cociente de excreción de ácido úrico
–	Referencia	1906 ± 85 ^{b,c}	1,00
AA	072	1281 ± 112 ^d	0,67
AAA	014	1021 ± 11 ^{d,e}	0,54
AAAA	118	3320 ± 160 ^a	1,74
AAB	041	1758 ± 361 ^c	0,92
ABB	090	2221 ± 380 ^b	1,17
AAAB	108	2929 ± 390 ^a	1,54
BB	009	645 ± 63 ^c	0,34
BBB	093	770 ± 18 ^c	0,40

La excreción de ácido úrico está expresada en miligramos de ácido úrico excretado durante los 8 días del bioensayo, por el peso en kilogramos de los insectos sobrevivientes al día 8. Los valores son el promedio ± la desviación estándar (n = 3). Valores con letras iguales no difieren significativamente (p > 0,05; ANOVA, prueba de Fisher). La referencia es la harina de maíz (n = 3). El cociente constituye la excreción correspondiente a la dieta entre la excreción correspondiente a la referencia. El nivel de excreción de ácido úrico en la condición alimentada fue 6407 ± 207 mg/kg (n = 3). La excreción de ácido úrico de la condición de ayuno no se pudo determinar debido a la alta mortalidad registrada dicha dieta (**Figura 6**).

VI. DISCUSIÓN

La composición proximal estimada en las harinas de banano utilizadas en el presente estudio (**Tabla 3**) mostró que las mismas son, en términos generales, muy similares entre sí. Los resultados obtenidos son, además, similares a los reportados en otros estudios donde se han empleado harinas de este tipo. Da Mota y col. (2000), Juárez-García y col. (2006), Rodríguez-Ambríz y col. (2008), Ovando-Martínez y col. (2009), Guzmán (2011), Delgado (2014) y Flores-Silva y col. (2014) estimaron valores de 3,9 – 12,9% de humedad, 2,5 – 5,6% de proteína cruda, 0,2 – 2,7% de grasa cruda, 2,3 – 4,7% de cenizas y 83,6 – 95,6% de carbohidratos en harinas de banano de distintas variedades. Hay que destacar que Juárez-García y col. (2006) estudiaron harinas de cáscara y pulpa de banano; hallando un contenido de lípidos inusualmente alto (2,7%) en este tipo de harinas, lo cual atribuyeron a componentes de la cáscara, como carotenoides. En el resto de estudios mencionados arriba el contenido de lípidos fue inferior a 1,4%. El amplio rango de valores de humedad reportado por distintos investigadores puede atribuirse a las diferencias en las condiciones de secado utilizadas (Tribess y col., 2009; Delgado 2014).

1. Digestibilidad *in vitro* de las harinas

Todos los parámetros de digestibilidad *in vitro* analizados (almidón potencialmente disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis *in vitro*) concordaron con la baja digestibilidad generalmente atribuida a las harinas crudas de bananos verdes.

El amplio rango de porcentajes de almidón disponible (41 – 79%) hallado entre las distintas harinas de banano evaluadas (**Tabla 4**) coincidió con el amplio rango de valores

de este parámetro que ha sido reportado en diversas investigaciones hechas en harinas de banano de distintas variedades. Juárez-García y col. (2006) y Rodríguez-Ambríz y col. (2008) estimaron porcentajes de almidón disponible de 56% y 72%, respectivamente, en harinas de banano verde de *Musa paradisiaca* L. y *Musa* AAB empleando método de Holm y col. (1986) que se utilizó en el presente estudio. Ovando-Martínez y col. (2009), Soto (2010), Wenzel y col. (2011) y Flores-Silva y col. (2014) estimaron porcentajes de almidón disponible entre 28% y 49% en harinas de banano verde de *Musa paradisiaca* L., *Musa cavendishii* y *Musa acuminata* variedad Nanicão; calculado mediante la diferencia entre el porcentaje de almidón total y el de almidón resistente total.

Las diferencias metodológicas en la determinación de este parámetro tienen una influencia importante en la gran variabilidad existente en los valores reportados por distintos investigadores, ya que los porcentajes de almidón disponible obtenidos restando la fracción de almidón resistente de la fracción de almidón total pareciera que generalmente son mucho más bajos que los porcentajes obtenidos mediante estimación directa de la fracción de almidón disponible. Además de las diferencias metodológicas, otros factores como las diferencias genéticas de los cultivares, la proporción amilosa/amilopectina y el contenido de grasa podrían contribuir a la variabilidad observada entre las harinas de distintos estudios y entre las harinas de un mismo estudio. En este sentido, se obtuvo una fuerte correlación negativa [coeficiente de Pearson (r) = -0,853; p = 0,000] entre el contenido de almidón disponible y el contenido de grasa de las harinas evaluadas en este estudio, pudiéndose observar que la harina con mayor contenido de grasa [009 (BB); **Tabla 3**] fue la que presentó el menor contenido de almidón disponible (**Tabla 4**) y que en las harinas en las que no hubo diferencias significativas en el contenido de grasa

presentaron porcentajes de almidón disponible similares entre sí. Un mayor contenido de grasa aumenta la probabilidad de formación de complejos amilosa lípidos, que son resistentes a la hidrólisis enzimática (Holm y col., 1983; Jane y Robyt, 1984; Seneviratne y Biliaderis, 1991; Kitahara y col., 1996). Aunque la correlación obtenida tiene sentido, hay que acotar que la misma fue determinada por el comportamiento de la harina 009 (BB), que presentó un bajo porcentaje de almidón disponible y un alto porcentaje de grasa cruda, respecto al resto de las harinas de banano (**Anexo A**).

El tenor de almidón resistente estimado en las harinas del presente estudio (**Tabla 5**) se encontró dentro del rango de valores que han sido reportados. Juárez-García y col. (2006), Ovando-Martínez y col. (2009) y Flores-Silva y col. (2014) reportaron porcentajes de almidón resistente entre 18% – 43% en harinas de banano verde de la variedad *Musa paradisiaca* L., Ramli y col. (2009), Tribess y col. (2009), Soto (2010), Wenzel y col. (2011), Herrera (2012) y Bezerra y col. (2013) reportaron valores entre 21% – 59% en harinas de banano verde de *Musa acuminata* AAA, subgrupo Cavendish y Rodríguez-Ambriz y col. (2008) y Sarawong (2014) estimaron un tenor de almidón resistente entre 30% – 47% en harinas de banano verde *Musa* AAB y otras variedades no especificadas. La variabilidad entre los porcentajes de almidón resistente reportados en diferentes estudios pudiera estar dada por una combinación de factores como las distintas metodologías empleadas para la determinación de este parámetro y diferencias en las condiciones de producción y almacenamiento de las harinas. En este sentido, Tribess y col. (2009) hallaron que el contenido de almidón resistente de distintas muestras de una misma harina de banano es afectado por las condiciones de secado de la harina. Todos los estudios

concuerdan con la idea de que las harinas de banano poseen una alta cantidad de almidón resistente a la digestión por parte de las enzimas hidrolíticas del intestino delgado.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996), las harinas analizadas (**Tabla 5**) poseen porcentajes *muy altos* (superiores a 15%) de almidón resistente. Se corrobora con estos resultados, el alto tenor de almidón no susceptible al ataque amilolítico presente en los frutos de las musáceas, esencialmente de almidón resistente del tipo 2. Muchos autores atribuyen la resistencia intrínseca del almidón del banano a estructuras cristalinas de tipo B y C las cuales se han asociado con una baja digestibilidad (Oates, 1997) y que generalmente se atribuyen al almidón nativo de estos frutos (Jane y col., 1997; Jane y col., 2003; Jane, 2007).

La tasa de α -amilólisis *in vitro* aporta información sobre la cantidad de almidón que es hidrolizado en el tiempo. Este parámetro puede depender de la morfología, estructura cristalina, relación amilosa/amilopectina, grado de gelatinización, entre otros, del gránulo del almidón (Holm y col., 1985; Gallant y col., 1992; Björck y col., 1994). En la caracterización nutricional de los alimentos amiláceos es particularmente importante evaluar este parámetro, porque las respuestas glucémica e insulinémica derivadas de la ingesta, son un reflejo de la velocidad de digestión del almidón (Björck, 1994).

La gelatinización aumentó notablemente la susceptibilidad de las harinas de banano a la hidrólisis en todos los casos (**Figura 4**) salvo en la harina 009 (BB), donde la cinética de hidrólisis en ambos estados (crudo y gelatinizado) fue muy similar (**Figura 4C**). La baja tasa de hidrólisis enzimática de las harinas crudas podría estar dada por el alto contenido de almidón resistente del tipo 2, que generalmente presentan este tipo de fuentes botánicas

(Jane y col., 1997). Este factor podría influir en el grado de acceso que tienen las enzimas al gránulo, limitando el grado de hidrólisis que pueda ocurrir (Gallant y col., 1992). En las harinas gelatinizadas la tasa de hidrólisis aumenta de gran manera debido a que el proceso de gelatinización produce un hinchamiento del gránulo de almidón y la desorganización de las moléculas de amilosa y amilopectina contenidas en él; perdiéndose la cristalinidad y el almidón resistente del tipo 2. Este hecho conlleva a que las enzimas puedan acceder a una mayor cantidad de sustrato y se dé un mayor grado de hidrólisis del almidón (Colonna y col., 1992).

Los bajos valores de magnitud final de la hidrólisis hallados en las harinas crudas (**Tabla 6**) concuerdan con lo reportado por Guzmán (2011) en harinas de plátano verde (*Musa* AAB) y topocho verde (*Musa* ABB). Las magnitudes finales estimadas (**Tabla 6**) coinciden además con los altos porcentajes de almidón resistente (**Tabla 5**) estimados para cada harina, con la excepción de las harinas de genomio *balbisiana*.

El comportamiento inusual de la α -amilólisis de la harina gelatinizada 009 (BB) (**Figura 4C**) fue ocasionado por el alto poder reductor inicial presente en dicha muestra (53,8%, $n = 2$) antes de ser sometida a la acción de la α -amilasa (**Figura 4D**); siendo dicho porcentaje alrededor de 20 veces más alto que el hallado en las harinas de genomio *acuminata* y en las harinas híbridas (2 – 4%) y alrededor de 4 veces superior al estimado en la harina 093 (BBB), que también presentó un poder reductor inicial inusualmente alto (12,7%, $n = 2$) (**Figura 4D**). El alto poder reductor estimado en la harina 009 (BB) podría ser consecuencia de las limitaciones del método de Hostettler y col. (1951) para determinar azúcares reductores y de la forma en la que se produjo esta harina en particular. Los frutos de Musaceas de genomio BB son pequeños en comparación a los frutos del cambur

manzano (*Musa* AAB) (que es un grupo ampliamente conocido y consumido en Venezuela) y además sus semillas (que son de color marrón oscuro y del tamaño de un guisante) son tan numerosas que ocupan un volumen mayor que la pulpa, lo cual le otorgó un tono notablemente más oscuro a la harina 009 (BB) en comparación a las harinas de genotipo *acuminata* y con las harinas híbridas. En este sentido, la presencia en las semillas de algún compuesto químico (no necesariamente un azúcar reductor) con capacidad de reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico podría ser el responsable del alto poder reductor estimado en dicha harina. Aunque no se posee información sobre la cantidad o el tamaño de las semillas del clon 093 (BBB), la gran similitud en el color, olor y textura de la harina de dicho clon con la harina del clon 009 (BB) lleva a pensar en la posibilidad de que el alto poder reductor inicial hallado en la harina 093 (BBB) obedezca a las mismas razones a las cuales se atribuyó este comportamiento inusual en la harina 009 (BB).

2. Digestibilidad *in vivo* de las harinas

2.1. Control de calidad del bioensayo del gorgojo de arroz

La condición de ayuno (cese total de la ingesta) y la condición alimentada (dieta de arvejas verdes partidas en la cual se mantienen los cultivos madre de los insectos) constituyen el control de calidad del bioensayo. La baja supervivencia (**Figura 6**) y la reducción del peso del animal (**Figura 8**) halladas en la condición de ayuno pueden atribuirse al consumo de las reservas corporales, con la subsecuente pérdida de agua, de grasa y de proteína (López, 1999) y a la utilización como nutrientes de proteínas que desarrollan funciones vitales para el organismo, como lo es el sistema enzimático de la cadena respiratoria (Kleiber, 1975); esto genera un deterioro progresivo de la salud de los individuos, luego de lo cual sobreviene la muerte. La reducción de 42% del peso inicial en

los insectos sometidos al ayuno (**Figura 8**) es superior a la disminución de 20 – 30% reportada en trabajos previos (Galeno, 2006; Lovera, 2008; Martín, 2010 y González-Quilen, 2013) y podría explicar el muy bajo porcentaje de supervivencia estimado en dicha condición (**Figura 6**) respecto a lo reportado por los investigadores mencionados (70 – 80% de supervivencia al día ocho del bioensayo).

La supervivencia obtenida en la condición alimentada (98%) (**Figura 6**) fue muy similar a la reportada por García (2003), Galeno (2006), Lovera (2008), Martín (2010) y González-Quilen (2013), quienes obtuvieron valores muy cercanos al 100%. El incremento en el peso de los insectos sometidos a esta misma condición (**Figura 8**) fue superior a los incrementos de 2 – 10% reportados por Galeno (2006), Lovera (2008), Martín (2010) y González-Quilen (2013); pudiendo atribuirse esta variabilidad en los valores reportados, a diferencias en la composición de las arvejas utilizadas para cada estudio. En este sentido, hay que destacar que mientras más antiguas son las referencias consultadas, más bajos son los incrementos en el peso de los insectos de la condición alimentada. Este hecho apoya la hipótesis de las diferencias en la composición entre las arvejas empleadas en distintos estudios.

La mayor ganancia de peso en la condición alimentada y la mayor pérdida de peso en la condición de ayuno, respecto a lo reportado por Galeno (2006), Lovera (2008), Martín (2010) y González-Quilen (2013) evidencian una actividad metabólica más intensa por parte de los insectos utilizados en el presente estudio. Carvalho (1996) señala que cuando la temperatura es favorable los insectos pequeños intercambian calor con mayor facilidad con el ambiente, tienen una actividad circulatoria y respiratoria más eficiente, una actividad metabólica más intensa y una mayor capacidad de aprovechar los recursos alimenticios.

Con base en lo anterior, es posible que la mayor intensidad en la actividad metabólica de los insectos utilizados en el presente estudio respecto a los empleados por los investigadores mencionados sea consecuencia de una temperatura más favorable para su desarrollo.

La composición corporal estimada en los insectos mantenidos en la condición alimentada (**Tabla 7**) fue notablemente diferente a lo reportada por Lovera (2008), en insectos sometidos a esa misma condición. Dicha investigadora estimó porcentajes de 46,1% de agua corporal, 19,9% de grasa corporal, 1,54% de nitrógeno proteico, 3,15% de nitrógeno cuticular y 29,3% de otros componentes del cuerpo del insecto. Martín (2010) estimó una composición corporal en los insectos de la condición alimentada, que en términos generales, coincide con lo reportado en el presente estudio, siendo la excepción el porcentaje de grasa corporal (11,1%), cuyo valor fue casi el doble de lo reportado acá (6,6%) (**Tabla 7**).

La digestibilidad *in vivo* estimada en la dieta de referencia fue estadísticamente igual a la digestibilidad estimada en la condición alimentada en casi todos los casos; hallándose diferencias significativas únicamente en el contenido de agua corporal y el contenido de grasa corporal (**Tabla 7**). A pesar de las discrepancias mencionadas anteriormente entre el control de calidad del presente estudio y el control de calidad de estudios previos, los resultados obtenidos parecen indicar que el ensayo se llevó a cabo de una manera adecuada. Las diferencias encontradas en el bioensayo del gorgojo de arroz se pueden deber a una variedad de factores como edad, sexo, condiciones fisiológicas, grado de actividad de los individuos, factores ambientales y climáticos como la humedad, la

estación del año elegida para el montaje, entre otros, que pueden provocar variaciones en los resultados cuando se comparan con otros trabajos (Millán y Carmona, 2005).

2.2. Biomarcadores en las harinas de banano

2.2.1. Supervivencia y variación de peso en el gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano

La supervivencia del gorgojo de arroz durante el bioensayo ha demostrado ser un indicador de la toxicidad de las dietas. En caso de observarse una supervivencia menor, en cualquiera de las dietas, con respecto a la condición de ayuno, se considera que dicha dieta contiene factores tóxicos para los insectos (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998; López, 1999; Gamero y col., 2010). En este sentido, la supervivencia registrada en los insectos alimentados con las harinas de banano (**Figura 7**) indica que las mismas no fueron tóxicas. Este biomarcador no se relacionó con ninguno de los parámetros de digestibilidad *in vitro*, por lo cual no se perfila como un buen estimador de la biodisponibilidad de las harinas de banano. El menor porcentaje de supervivencia estimado en las harinas 090 (ABB) y 108 (AAAB) podría atribuirse a factores como la edad, el sexo, las condiciones fisiológicas y el grado de actividad de los individuos (Millán y Carmona, 2005).

El incremento en el peso de los insectos alimentados con las dietas de harinas de banano (**Figura 9**) presentó una correlación moderada ($r = 0,664$; $p = 0,000$) con el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón disponible. Dicha correlación fue determinada por el comportamiento de la harina 009 (BB) (**Anexo B**), que generó el menor incremento de peso en los insectos (**Figura 9**) y presentó el menor tenor de almidón disponible (**Tabla 4**). Laurentin y col. (2012) hallaron una ganancia de peso de 2% en la dieta de

harina hartón común y una pérdida de peso de 0,8% en la dieta de harina de hartón enano (ambos clones híbridos AAB) y no pudieron relacionar esta respuesta biológica con la digestibilidad de las harinas. La palatabilidad de la dieta, es decir, el conjunto de características organolépticas que hacen al alimento agradable, es una propiedad independiente del contenido energético y nutritivo, y podría explicar las fluctuaciones evidenciadas en el peso de estas poblaciones de insectos al inducir una mayor o menor ingesta del alimento (González-Quilen, 2013).

Los biomarcadores supervivencia y variación de peso son poco sensibles a pequeños cambios de la dieta (Laurentin y col., 2010) y han mostrado su utilidad en la estimación de la toxicidad de diferentes dietas (Carmona y col., 1998) y de semillas de leguminosas (Gamero y col., 2010).

2.2.2. Cambios en la composición corporal

Estudios previos indican que el parámetro de la composición corporal con mayor sensibilidad ante diferencias en la digestibilidad de la dieta del gorgojo de arroz es el contenido de grasa corporal (Galeno, 2006; Martín, 2010). En este sentido, mientras mayor sea la digestibilidad de una dieta amilácea, mayor será el número de unidades de glucosa que potencialmente podrían ser absorbidas y, en caso de que exista un exceso calórico, ser almacenadas en forma de grasa (Martín, 2010). En el caso de las harinas hay que aclarar que aunque la relación anterior es válida, podría no ser tan directa debido a la compleja matriz alimentaria que estas poseen. En el presente estudio, tres harinas [108 (AAAB), 090 (ABB) y 072 (AA),] fueron evaluadas como de mayor digestibilidad, tres con igual digestibilidad [009 (BB), 118 (AAAA) y 093 (BBB)] y solo dos [014 (AAA) y 041 (AAB)]

como de menor digestibilidad que la referencia, mediante el biomarcador grasa corporal (**Tabla 8**).

A pesar de que el biomarcador grasa corporal estimó biodisponibilidades distintas entre las harinas, al igual que lo hicieron los biomarcadores agua corporal y nitrógeno proteico (**Tabla 8**), ninguna de las respuestas observadas en estos biomarcadores se correlacionó con la baja digestibilidad de las harinas estimada *in vitro*; mientras que, el biomarcador nitrógeno cuticular no parece tener la sensibilidad suficiente para discriminar entre las harinas con distinta digestibilidad. En base a lo anterior, se puede decir que los biomarcadores agua corporal, grasa corporal, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular no se perfilaron como buenos estimadores de la biodisponibilidad de las harinas de banano. Sin embargo, el biomarcador grasa corporal ha sido un buen predictor de la biodisponibilidad de otros alimentos a base de banano verde, como almidones aislados (Galeno, 2006; Martín 2010), al igual que el biomarcador nitrógeno proteico (Galeno, 2006) al encontrarse respuestas en ambos biomarcadores que pudieron correlacionarse con el tenor de almidón resistente de los almidones de banano (Galeno, 2006; Martín, 2010). No obstante, hay que señalar que en el presente estudio no se consideró la cuantificación de la ingesta diaria del insecto, como lo hicieron García (2003) y Galeno (2006), quienes corrigieron estos biomarcadores por la ingesta y realizaron análisis de correlación múltiple. Es probable que el ajuste de los valores de estos tres biomarcadores por los niveles de ingesta del insecto, mejore el desempeño de los mismos (Martín, 2010).

Dada la ausencia de relación entre la digestibilidad *in vitro* de las harinas de banano y los cambios en la composición corporal del gorgojo de arroz, conviene evaluar la posible influencia de determinados componentes de la matriz alimentaria de las harinas, como la

humedad y los carbohidratos, en dichos cambios. El contenido de agua corporal de los insectos podría ser afectado por el contenido de humedad de las harinas en el sentido de que a mayor porcentaje de humedad, mayor es el aporte de agua al insecto. La alta proporción de carbohidratos estimada, con relación al resto de componentes de las harinas (**Figura 3**), es un factor que podría afectar la acreción de grasa de los insectos. La conversión de carbohidratos en grasa permite que los animales construyan reservas de ésta, incluso cuando su alimento contiene muy poca grasa. La ingesta de grandes cantidades de carbohidratos es manejada en primera instancia convirtiendo la glucosa absorbida en glucógeno. Para inducir una tasa sustancial de conversión de carbohidratos a grasa la reserva de glucógeno corporal debe aumentar considerablemente, lo cual requiere un consumo excesivo de carbohidratos (Flatt, 1995). En base a lo anterior, cabría esperar una mayor acreción en el contenido de grasa corporal en las harinas con mayor contenido de carbohidratos. Pese a lo expuesto, los contenidos de humedad y carbohidratos de las harinas no se relacionaron con los cambios en la composición corporal del insecto.

El contenido de nitrógeno proteico en el insecto depende, principalmente, de la biodisponibilidad del alimento y del contenido y la calidad de las proteínas que éste presente (Martín, 2010). Carmona y col. (1998) y López (1999) encontraron que una dieta de alta biodisponibilidad como el almidón de maíz, ocasionaba un balance de nitrógeno negativo que era de menor magnitud al observado en la condición de ayuno y atribuyeron dicho comportamiento a la utilización como combustible de los carbohidratos de la dieta en lugar de las proteínas corporales. Todas las harinas evaluadas en el presente estudio presentaron tenores proteicos distintos entre sí (**Tabla 3**) y superiores a los requerimientos del insecto (0,5 – 0,7%; sugerido López, 1999). A lo anterior hay que agregar, que no se

posee información sobre la calidad proteica de las harinas evaluadas ni de cuáles son los aminoácidos esenciales para el gorgojo de arroz. Tampoco fue posible realizar una comparación de este biomarcador, similar a la reportada por Carmona y col. (1998) y López (1999), debido a la alta mortalidad de los insectos en la condición de ayuno (**Figura 6**). Dicha comparación podría permitir evaluar en cierta medida la influencia de la digestibilidad en este biomarcador aun cuando no se determine el nivel de ingesta.

El biomarcador “otros” incluye componentes tan diversos, como glucosa, trehalosa, glucógeno, minerales y los esqueletos carbonados de los aminoácidos y del exoesqueleto de los insectos. La interpretación de los cambios en este componente no es sencilla pues su composición es variable y su proporción se obtiene por diferencia, una vez que se ha restado el contenido de agua, grasa y nitrógeno (proteico y cuticular). Por esta razón, no se realizó un análisis a fondo de este biomarcador.

2.2.3. Actividad similar a α -amilasa

La actividad similar a α -amilasa (**Tabla 9**) parece ser un buen estimador de la biodisponibilidad de las harinas de banano, ya que fue el único biomarcador que se correlacionó con uno de los parámetros de digestibilidad *in vitro*, como fue el almidón disponible. En este sentido, se obtuvo una fuerte correlación negativa ($r = -0,796$; $p = 0,000$) entre ambas variables. Sin embargo, hay que acotar que dicha correlación fue determinada por el comportamiento de la harina 009 (BB), que presentó la mayor actividad similar a α -amilasa y el menor porcentaje de almidón disponible entre todas las harinas de banano (**Anexo C**).

El almidón constituye el principal nutriente en la dieta de los coleópteros (Hemlata y col. 2012), por lo cual las α -amilasas desempeñan un papel fundamental en la vida de estos insectos. El gorgojo de arroz tiene dos isoenzimas con actividad α -amilolítica (Baker, 1987) y es posible que ambas actividades estén implicadas en la digestión del almidón, principal componente de la dieta de estos insectos. Cuando el insecto consume una dieta de menor digestibilidad, se produce una respuesta que conlleva a un aumento en la cantidad de las isoenzimas; aumentando la actividad amilolítica medible en el extracto acuoso (Laurentin y col., 2012). Esta relación inversa entre la digestibilidad de la dieta y la actividad α -amilolítica del insecto podría deberse a la existencia de mecanismos de regulación transcripcional. En *Drosophyla melanogaster* (Díptera: Drosophilidae), por ejemplo, se ha demostrado que las dietas ricas en glucosa reducen la actividad de las α -amilasas al reprimir la transcripción de los genes codificantes de estas enzimas (Hickey y Benkel, 1982; Benkel y Hickey, 1986; Magoulas y col., 1993), y más recientemente, se ha comprobado que en *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae), la expresión del gen de la α -amilasa está regulada por la biodisponibilidad de los azúcares reductores, la sacarosa y del almidón alimentario (Hemlata y col. 2012); más específicamente, la expresión del gen que codifica la α -amilasa en este insecto es reprimida por altos contenidos de sacarosa en su planta hospedera (Kotkar y col., 2012).

La menor actividad similar a α -amilasa (y por ende mayor biodisponibilidad) estimada en casi todas las harinas de banano con respecto a la harina de referencia (**Tabla 9**) pareciera contradecir lo expuesto en el párrafo anterior, ya que la harina de maíz (referencia) ha demostrado una alta digestibilidad *in vitro* en estudios previos (Agama-Acevedo y col., 2004; Bello-Pérez y col., 2014), que coincide con lo reportado acá

(ver pie de **Tablas 3, 4 y 5**), por lo cual se esperaría que la misma promoviera una menor actividad similar a α -amilasa que las harinas de banano, cuya digestibilidad *in vitro* se estimó como baja. La interacción entre los componentes de la matriz alimentaria de la harina de maíz pudo haber sido una de las causas del resultado obtenido. Este resultado aparentemente contradictorio pudiera ser resuelto empleando como referencia almidón de maíz en lugar de la harina de maíz, ya que el almidón aislado carece de la matriz alimentaria presente en la harina y su biodisponibilidad ha sido probada con anterioridad por Martín (2010); Laurentin y col. (2012) y González-Quilen (2013). Laurentin y col. (2012) hallaron una correlación negativa entre el tenor de almidón disponible y la actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con harinas de clones híbridos AAB, que coincide con lo hallado en el presente estudio, empleando como referencia la harina de maíz.

2.2.4. Excreción de ácido úrico

El ácido úrico es la principal forma de excreción de nitrógeno de los gorgojos (Baker, 1976) y su excreción está estrechamente relacionada con la digestibilidad de la dieta y el catabolismo de las proteínas. Una dieta que resulte más difícil de digerir aportará menos energía al insecto y este debe recurrir a la degradación de las proteínas corporales para suplir ese déficit energético; aumentado así la excreción del ácido úrico (Laurentin y col., 2012). La ingesta de una dieta altamente digerible y por ende de alta disponibilidad de carbono y energía, prevendrá la degradación de la proteína corporal (fenómeno conocido como efecto protector de los carbohidratos de la dieta) y propiciará una baja excreción de ácido úrico (Martín, 2010). El contenido proteico de la dieta podría afectar la excreción de ácido úrico de dos maneras. En caso que esté presente en una proporción menor a la

requerida por el insecto, se degradarán las proteínas corporales; encontrándose un mayor nivel del biomarcador y pudiéndose evaluar el efecto protector de los carbohidratos de la dieta. En caso que la dieta tenga un tenor de proteína mayor al del requerimiento del insecto, se encontrarán altos niveles de excreción de ácido úrico, producto de la eliminación del exceso de nitrógeno, y el efecto de la digestibilidad sobre este biomarcador quedaría enmascarado. Por lo tanto, la excreción de ácido úrico posee un comportamiento bifásico con respecto al tenor de la proteína de la dieta; encontrándose un mínimo de excreción cuando la dieta proporciona un nivel de nitrógeno y aminoácidos igual al requerimiento del organismo (Martín, 2010).

En base a las afirmaciones anteriores, se esperaría que la dieta con la mayor digestibilidad *in vitro*, como es el caso de la dieta de referencia, generara la menor excreción de ácido úrico. Sin embargo, este biomarcador discriminó las harinas de banano en tres grupos con base a su digestibilidad: harinas con una mayor digestibilidad que la referencia [009 (BB), 093 (BBB), 014 (AAA) y 072 (AA)], harinas con una digestibilidad igual a la referencia [041 (AAB) y 090 (ABB)] y harinas con una menor digestibilidad que la referencia [108 (AAAB) y 118 (AAAA)] (**Tabla 10**).

Las diferencias halladas en este biomarcador no se correlacionaron con los parámetros de digestibilidad *in vitro* de las harinas. Este resultado posiblemente sea consecuencia de la combinación de diferentes niveles de ingesta de las harinas (parámetro no evaluado) y el contenido de la proteína cruda de las mismas (**Tabla 3**), que fue muy superior al requerimiento proteico de 0,5 – 0,7%, sugerido por López (1999) para *S. oryzae*. La comparación de la excreción de ácido úrico entre los insectos alimentados con las harinas de banano y los insectos alimentados con la dieta de referencia no ayudó a

esclarecer el efecto de la digestibilidad sobre este biomarcador, ya que dicha dieta también excede ampliamente el requerimiento proteico sugerido para el insecto.

A pesar de que en el presente estudio el biomarcador excreción de ácido úrico no correlacionó con ninguno de los parámetros de digestibilidad *in vitro*, dicho biomarcador ha sido señalado por otros investigadores como un buen estimador de la biodisponibilidad de alimentos farináceos, incluidos almidones y harinas de banano (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010; Laurentin y col., 2012; González-Quilen, 2013). De todas las investigaciones mencionadas, solo Laurentin y col. (2012) trabajaron con harinas de banano; hallando una relación inversa entre el contenido de almidón disponible y la excreción de ácido úrico en gorgojos de arroz alimentados con harinas de clones híbridos AAB; utilizando como referencia una dieta aprotéica de almidón de maíz.

Es necesaria más investigación para aclarar si el biomarcador excreción de ácido úrico puede ser un buen estimador de la biodisponibilidad de las harinas de banano. En este sentido, la escogencia de una dieta de alta digestibilidad y un contenido proteico cercano a los requerimientos sugeridos por López (1999) para el gorgojo de arroz podría ser de mayor utilidad que la harina de maíz empleada acá a la hora de evaluar este biomarcador.

3. Consideraciones finales y perspectivas futuras

Todos los parámetros de digestibilidad *in vitro* analizados concordaron con la baja digestibilidad generalmente atribuida a las harinas crudas de bananos verdes, ya que se encontraron fracciones de almidón resistente a la digestión enzimática mayores a 31% en todas ellas y se hallaron porcentajes de hidrólisis menores al 10% al incubar dichas harinas en estado nativo por una hora con α -amilasa pancreática porcina. La gelatinización tuvo un

gran impacto en la susceptibilidad de las harinas de banano a la digestión enzimática, hallándose en la mayoría de los casos, cinéticas de hidrólisis similares o superiores a la exhibida por un alimento de alta biodisponibilidad, como lo es el almidón del maíz. Entre los resultados obtenidos en la cinética de hidrólisis *in vitro* destacan las harinas del genotipo *balbisiana* [009 (BB) y 093 (BBB)], por presentar un alto poder reductor incluso antes de ser sometidas a la hidrólisis exhaustiva con la α -amilasa. Este resultado tan particular podría haber sido causado por algún agente reductor asociado a las semillas de estos frutos, las cuales presentan una abundancia y tamaño especialmente notables en los bananos diploides de este genotipo, en comparación con el resto, como ha sido reportado por Ploetz y col. (2007). Sería interesante enfocarse en este aspecto en futuras investigaciones a fin de validar o descartar la hipótesis anterior.

Los biomarcadores grasa corporal, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz permitieron discriminar entre las harinas de banano con distinta digestibilidad, pero la información suministrada por dichos biomarcadores no presentó concordancia entre sí, ya que dada la baja digestibilidad de las harinas de banano estimada *in vitro* se esperaba que la biodisponibilidad de las mismas fuera inferior a la de la dieta de referencia, cuya digestibilidad *in vitro* se estimó como alta. De estos tres biomarcadores sólo la actividad similar a α -amilasa correlacionó con uno de los parámetros de digestibilidad *in vitro* de las harinas, como lo fue el contenido de almidón disponible.

Dado que la harina de maíz utilizada como referencia del bioensayo no resultó ser la más apropiada para efectuar las comparaciones entre los principales biomarcadores aquí estudiados, sería conveniente realizar este bioensayo empleando referencias donde se obtengan resultados cuyo análisis sea más sencillo. El almidón de maíz o una dieta artificial

que carezca de una matriz alimentaria compleja, posea un carbohidrato de alta digestibilidad y un contenido proteico cercano a los requerimientos sugeridos por López (1999) para el gorgojo del arroz podrían ser una opción. En este sentido, si se compara la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico de los insectos alimentados con las harinas de banano evaluadas en el presente estudio (**Tablas 9 y 10**) con los resultados obtenidos por González-Quilen (2013) para el almidón de maíz con estos mismos biomarcadores [$130 \pm 27 \mu\text{mol/s.L}$ ($n = 6$) y $457 \pm 71 \text{ mg/kg}$ ($n = 9$), respectivamente] se puede apreciar que las harinas de banano promovieron una actividad similar a α -amilasa entre tres y siete veces más alta y una excreción de ácido úrico entre dos y siete veces más alta que la del almidón de maíz; siendo dicho resultado congruente con la baja digestibilidad *in vitro* de las harinas de banano y la alta digestibilidad del almidón de maíz estimada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Igualmente sería interesante realizar el bioensayo del gorgojo de arroz y corregir los distintos biomarcadores por el nivel de ingesta, a fin de obtener mejores resultados en la caracterización de la digestibilidad *in vivo*.

En cuanto a la influencia del genomio en la digestibilidad de las harinas, la harina 009 (BB) pareciera tener una menor digestibilidad que las harinas de otros genomios. Dicha harina presentó el menor tenor de almidón disponible, un contenido muy alto de almidón resistente y exhibió la mayor actividad similar a α -amilasa. En el resto de las harinas, la relación de la composición genética con la digestibilidad fue poco clara. Se requiere la caracterización nutricional de un mayor número de clones a fin aclarar la existencia de una posible relación entre ambos parámetros. En la literatura, no se reportan investigaciones orientadas hacia el estudio de las posibles relaciones existentes entre las características

genéticas del banano y las propiedades nutricionales del almidón. Sin embargo, ya se ha evidenciado en algunas investigaciones previas (Marín, 2009; Dufour y col., 2009), que las propiedades químicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón aislado de esta fuente amilácea varían con los grupos de consumo: postre o cocción. Los bananos que son previamente sometidos a cocción para luego ser ingeridos, corresponden por lo general a los cultivares de plantas híbridas (*M. paradisiaca*), mientras que la mayor parte de los bananos de postre constituyen cultivares de *M. acuminata* (Ploetz y col., 2007). Cabe destacar que la necesidad o no de someter el banano a la cocción no parece relacionarse con una mayor o menor susceptibilidad del almidón a la digestión enzimática, sino a la proporción de almidón presente en el fruto. En el plátano *verdadero* crudo (Musa AAB, subgrupo *platain*) el contenido de almidón es muy similar al del banano de postre verde (Englyst y Cumming, 1986). Sin embargo, la lenta degradación de los α -glucanos del plátano y de otros bananos de cocción a lo largo del período climatérico (Marriott y col., 1981), garantiza que el fruto alcance la mesa del consumidor con un alto contenido de almidón y que la pulpa sea difícilmente comestible sin previa cocción o fritura.

La información encontrada acerca de la digestibilidad *in vitro* de las harinas de banano de las variedades evaluadas, podría ser utilizada por la industria de alimentos como complemento de estudios de caracterización de estas harinas.

Entre otras posibilidades, se podrían manufacturar alimentos que contengan harinas nativas de banano de las variedades estudiadas, dirigidos a consumidores con necesidades nutricionales especiales, como podrían ser personas diabéticas, obesas o con enfermedades cardiovasculares. Esta idea está fundamentada en los efectos fisiológicos conocidos del almidón resistente y de almidones con una tasa de hidrólisis baja.

VII. CONCLUSIONES

1. Todas las harinas de banano evaluadas presentaron contenidos de almidón disponible mayores a 65%, a excepción de la harina del clon 009 (BB) cuyo contenido fue de 41%.
2. Las harinas de los clones de banano exhibieron un *muy alto* tenor de almidón resistente a la hidrólisis enzimática, encontrándose en el rango de 32 – 44%.
3. Las tasas de α -amilólisis *in vitro* de las harinas crudas de los ocho clones de banano fueron muy bajas; encontrándose magnitudes finales de hidrólisis menores a 10% en todas ellas.
4. En todas las harinas de banano, salvo en la 009 (BB), las tasa de α -amilólisis *in vitro* en estado gelatinizado, no fue muy diferente de la presentada por un alimento de alta digestibilidad, como lo es el almidón de maíz. Este hecho sugirió la eliminación de gran parte del almidón resistente presente en las harinas crudas.
5. La harina del clon 009 (BB) presentó un poder reductor inicial inusualmente alto, que generó una tasa de α -amilólisis *in vitro* en la harina gelatinizada de comportamiento similar al de las harinas crudas.
6. Los biomarcadores supervivencia, variación de peso, agua corporal, grasa corporal, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y excreción de ácido úrico, no resultaron ser buenos estimadores de la biodisponibilidad de las harinas de banano. En estos

biomarcadores no se encontraron diferencias que pudieran ser correlacionadas con la digestibilidad *in vitro* de estas harinas.

7. El biomarcador actividad similar a α -amilasa resultó ser un moderado estimador de la biodisponibilidad de las harinas de banano; observándose respuestas que estuvieron correlacionadas con la digestibilidad *in vitro* que presentaron, específicamente con el contenido de almidón disponible.
8. La harina cruda del clon 009 (BB) resultó ser la de menor digestibilidad según los parámetros de digestibilidad *in vitro* y el biomarcador actividad similar a α -amilasa.
9. El contenido de grasa cruda de las harinas de banano fue el parámetro de la composición proximal que más influencia tuvo sobre el tenor de almidón disponible, según se observó en los análisis de correlación simple.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2003. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. Novena edición. St. Paul, MN, EE. UU.
- Agama-Acevedo, E., Rendón-Villalobos, R., Tovar, J., Paredes-López, O., Islas-Hernández, J. J., Bello-Pérez, L. A. 2004. *In vitro* starch digestibility changes during storage of maize flour tortillas. *Food/Nahrung*. **48**(1): 38-42.
- Anderson, I.H., Levine, A.S., Levitt, M.D. 1981. Incomplete absorption of the carbohydrate in all-purpose wheat flour. *The New England Journal of Medicine*. **304**(15): 891-892.
- Anyasi, T.A., Jideani, A.I.O., Mchau, G.R.A. 2013. Functional properties and postharvest utilization of commercial and noncommercial banana cultivars. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **12**(5): 509–522.
- AOAC International. 1984. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists. Décimocuarta edición. Washington D.C., EE. UU.
- Asp, N.G., Björck, I. 1992. Resistant starch. *Trends in Food Science & Technology*. **3**: 111-114.
- Baker J.E. 1976. Nitrogenous excretory products of adults of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **53**: 107–109.
- Baker J.E. 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), by high-performance liquid chromatography and their interaction with partially-purified amylase inhibitors from wheat. *Insect Biochemistry*. **17**: 37–44.
- Batres, L.R., White, P.J. 1986. Interaction of amylopectin with monoglycerides in model systems in relation to breadmaking conditions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **63**: 1537–1540.
- Bedolla, S., Rooney, L.W. 1984. Characteristics of U.S. and Mexican instant maize flours for tortilla and snack preparation. *Cereal Foods World*. **29**: 732-735.
- Bello-Pérez, L.A., Flores-Silva, P.C., Utrilla-Coello, R.G., Agama-Acevedo, E., Hamaker, B. 2014. *In vitro* starch digestibility of gluten-free spaghetti based on maize, chickpea and unripe plantain flours. *Cereal Chemistry*. (en prensa).
- Benkel, B.F., Hickey, D.A. 1986. Glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **114**(1): 137-144.
- Berry, C.S. 1986. Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*. **4**: 301-314.
- Bezerra, C.V., Amante, E.R., de Oliveira, D.C., Rodrigues, A.M.C., da Silva, L.H.M. 2013. Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed — Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch. *Industrial Crops and Products*. **41**: 241–249.

- Bird, A.R., Brown, I.L., Topping, D.L. 2000. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. **1**: 25-37.
- Björck, I., Granfeldt, Y., Liljerberg, H., Tovar, J., Asp, N.G. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*. **59**(3): 699-705.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **23**: 85-112.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A. 1997. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales Venezolanos de Nutrición*. **10**(1): 20-26.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. 1998. Toxicología nutricional: un enfoque "artropocéntrico". *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **1**: 37-40.
- Carmona, A., Liuzzi, J.P. 1998. Biodisponibilidad de nutrientes: fácil de definir, difícil de evaluar. *Anales Venezolanos de Nutrición*. **11**: 66-78.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. 2001. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **3**: 53-56.
- Carvalho, J.P. 1996 *Introdução à entomologia agrícola*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.
- Champion, J. 1968. **El Plátano**. Blume. Barcelona, España.
- Chen, W.J., Anderson, J.W., Jennings, D. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **175**(2): 215-218.
- Cheng, H.H., Lai, M.H. 2000. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *The Journal of Nutrition*. **130**(8): 1991-1995.
- Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson, G.R., Chopa, I. 1991. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**(2): 161-165.
- Cheesman, J. 1948. Classification of the bananas. III. Critical Notes on Species. (c) *Musa paradisiaca* Linn. and *Musa sapientum* Linn. *Kew Bulletin*. **2**: 145-154.
- Cherry, J. 1973. **Molecular biology of plants. A text manual**. Columbia University. Columbia, EE.UU.
- Colonna, P., Leloup, V., Buléon A. 1992. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 17-32.
- Da Mota, R. V., Lajolo, F. M., Ciacco, C., Cordenunsi, B. R. 2000. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. *Starch/Stärke*. **52**: 63-68.
- Delgado, M. 2014. **Evaluación de clones de musáceas en la obtención de harina, extracción de almidón y su aplicación en recubrimientos de frutas**. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

- Dufour, D., Gibert, O., Giraldo, A., Sánchez, T., Reynes, M., Pain, J.-P., González, A., Fernández, A., Díaz, A. 2009. Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of cultivated Colombian musaceae (*Musa* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 7870-7876.
- Eliasson, A. C., & Ljunger, G. (1988). Interactions between amylopectin and lipid additives during retrogradation in a model system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **44**(4): 353-361.
- Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, Duffus CM, Lynn A, Morrison IM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller SA. 1998. Starch production and industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **77**:289–311.
- Englyst, H.N., Wiggins, H.S., Cumming, J.H. 1982. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. **107**: 307-318.
- Englyst, H.N., Cumming, J.H. 1986. Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **44**: 42-50.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 33-50.
- Evans, I.D. 1986. An investigation of starch/surfactant interactions using viscosimetry and differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke*. **38**: 227–235.
- Faisant, N., Buléon, A., Colonna, P., Molis, C., Lartigue, S., Galmiche, J.P., Champ, M. 1995. Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy human: structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition*. **73**: 111-123.
- Flatt, J.P. 1995. Use and storage of carbohydrate and fat. *American Journal of Clinical Nutrition*. **61**: 952 – 959.
- Flores-Silva, P., Berrios, J., Pan, J., Osorio-Díaz, P., Bello-Pérez, L. 2014. Gluten-free spaghetti made with chickpea, unripe plantain and maize flours: functional and chemical properties and starch digestibility. *International Journal of Food Science and Technology*. **49**: 1985–1991.
- French, D. 1973. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science*. **37**: 1048-1061.
- Galeno, F. 2006. **Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano**. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
- Gallant, D.J., Bouchet, A., Buleón, A., Pérez, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 3-16.

- Gamero, M., Laurentin, A., Bernal, C., Galindo, I., Díez, N. 2010. Toxicidad *in vivo* y proteómica comparativa para el estudio de la expresión de proteínas con actividad insecticida presentes en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. *RET Revista de Estudios Transdisciplinarios*. **2**: 101-109.
- García, O. 2003. **Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados, utilizando el bioensayo con el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae***. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela
- Ganong, W.F. 2003. **Review of Medical Physiology**. Lange Medical Books/Mc Graw-Hill. Vigésimoprimera edición. New York, EE.UU.
- Gil, M., Vélez, L., Millán, L., Acosta, M.A., Díez, A., Cardona, N., Rocha, L., Villa, G. 2011. Desarrollo de un producto de panadería con alto valor nutricional a partir de la harina obtenida del banano verde con cáscara: una nueva opción para el aprovechamiento de residuos de la industria de exportación. *Producción + Limpia*. **6** (1): 96-107.
- González-Quilen, C. 2013. **Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) de almidones de banano**. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- González-Quilen, C., Laurentin, A. 2012. Método de extracción del ácido úrico excretado por el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) alimentado con diferentes dietas. *Acta Científica Venezolana*. **63**(1), pág. 192 (Resumen). LXII Convención Anual de AsoVAC. Caracas, 18–23 de noviembre.
- Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E., Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*. **56**: 445-449.
- Guerra, M.A., Pérez, D., Hernández, U., De Hombre, R., Frómeta, Z., Pérez, G., Rodríguez, F. 2011. Efecto de la harina de plátano sobre la calidad de un embutido tipo mortadela. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **21**(3): 22-26.
- Guzmán, R. 2011. **Estudio integral de dos variedades de musas (*Musa spp*) I. Elaboración de productos a base de harinas. II. Producción de maltodextrinas y uso de microencapsulación de antioxidantes**. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Hasjim, J; Ai, Y; Jane, J. 2013. **Novel applications of amylose-lipid complex as resistant starch type 5**. Págs. 79-94 en: Shi, Y; Manigant, C. (eds.), **Resistant starch: applications and health benefits**. Wiley-Blackwell. Chichester, West Sussex, UK.
- Hemlata, M.K., Bhide, A.J., Gupta, V.S., Giri, A.P. 2012. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene*. **501**: 1-7.
- Herrera, M. 2012. **Evaluación fisicoquímica y propiedades funcionales de la harina y almidón nativo de cambur variedad *Musa* AAA subgrupo Cavendish “William’s”, para su uso en alimentos**. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

- Hickey, D.A., Benkel, B. 1982. Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: Effects of dietary carbohydrate. *Biochemical Genetics*. **20**: 1117–1129.
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.G., Sjöberg, L.B., Lundquist, I. 1985. Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *Journal of Cereal Science*. **3**: 193–206.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N.G. 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch/Stärke*. **38**: 224–226.
- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A.C., Asp, N.G., Larsson, K., Lundquist, I. 1983. Digestibility of amylose-lipid complexes *in-vitro* and *in-vivo*. *Starch/Stärke*. **35**(9): 294–297.
- Hostettler, F., Borel, E., Deuel, H. 1951. Über die reduktion der 3,5 dinitrosalicylsäure durch Zucher. *Helvetica Chimica Acta*. **34**: 2132–2139.
- Huber, K.C., BeMiller, J.N. 2010. **Modified starch chemistry and properties**. Págs. 145–203 en: Bertolini, A.C. (ed.), **Starches: Characterization, Properties and Applications**, CRC Press. Boca Raton, FL.
- Jane, J. 2006. Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience*. **53**(3): 205–213.
- Jane, J. 2007. Structure of starch granules. *The Japanese Society of Applied Glycoscience*. **54**: 31–36.
- Jane, J., Ao, Z., Duvick, S.A., Wiklund, M., Yoo, S.-H., Wong, K.-S., Gardner, C. 2003. Structures of amylopectin and starch granules: How are they synthesized? *Journal of Applied Glycoscience*. **50**(2), 167–172.
- Jane, J., Atichokudomchai, N., Suh, D. 2004. **Internal structures of starch granules revealed by confocal laser-light scanning microscopy**. Págs. 147–156 en: Tomasik, P., Yuryev, V.P., Bertoft, E. (eds.), **Starch: Progress in structural studies, modifications and applications**. Polish Society of Food Technologists. Cracovia, Polonia.
- Jane, J., Robyt, J.F. 1984. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*. **132**(1): 105–118.
- Jane, J., Shen, J.J. 1993. Internal structure of the potato starch granule revealed by chemical gelatinization. *Carbohydrate Research*. **247**: 279–290.
- Jane, J., Wong, K.-S., McPherson, A.E. 1997. Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*. **300**(3): 219–227.
- Jiang, H; Jane, J. 2013. **Type 2 resistant starch in high-amylose maize starch and its development**. Págs. 23–42 en: Shi, Y; Manigant, C. (eds.), **Resistant starch: applications and health benefits**. Wiley-Blackwell. Chichester, West Sussex, UK.
- Juárez-García, E., Agama-Acevedo, E., Sayago-Ayerdi, S.G., Rodríguez-Ambríz, S.L. 2006. Composition, digestibility and application in breadmaking of banana flour. *Plant Foods for Human Nutrition*. **61**: 131–137.

- Kitahara, K., Sukanuma, T., Nagahama, T. 1996. Susceptibility of amylose-lipid complexes to hydrolysis by glucoamylase from *Rhizopus niveus*. *Cereal Chemistry*. **73**(4): 428–432.
- Kleiber, M. 1975. Metabolic turnover rate: A physiological meaning of the metabolic rate per unit body weight. *Journal of Theoretical Biology*. **53**: 199–204.
- Kotkar, H.M., Bhide, A.J., Gupta, V.S., Giri, A.P. 2012. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene*. **501**(1): 1-7.
- Kugimiya, M., Donovan, J. W. 1981. Calorimetric determination of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex. *Journal of Food Science*. **46**: 765–770.
- Laurentin, A., Edwards, C.A. 2013. **Fiber: resistant starch and oligosaccharides**. Págs. 246–253 en: Caballero, B., Allen, L., Prentice, A (eds.), **Encyclopedia of Human Nutrition**. Tercera edición. Academic Press. Waltham, MA. EE. UU.
- Laurentin, A., González-Quilen, C., Martín, V., Marín, J.G. 2012. Biomarcadores de la digestibilidad de almidones y harinas utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz. Primer Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación en el marco de la LOCTI y el PEII. Caracas, septiembre de 2012. Libro de Resúmenes, Tomo I, p. 432 (resumen).
- Leszczyński, W. 2004. Resistant starch – Classification, structure, production. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. **13**(54): 37-50.
- López, M. 1989. **El plátano**. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- López, Y. 1999. **Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae***. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Lovera, M. 2008. **Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.)**. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Mahan, L.K., Escott-Stump, S. 2008. **Nutrición y dietoterapia de Krause**. McGraw-Hill Interamericana. Decimosegunda edición. Barcelona, España.
- Magoulas, C., Bally-Cuif, L., Loverre-Chyurlia, A., Benkel, B., Hickey, D.A. 1993. A short 5'-flanking region mediates glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **134**: 507-515.
- Maningat, C., Seib, P. 2013. **RS4-type resistant starch: chemistry, functionality and health benefits**. Págs. 43-77 en: Shi, Y; Manigant, C. (eds). **Resistant Starch: Applications and Health Benefits**. Wiley-Blackwell. Chichester, West Sussex, UK.
- Marín, J. 2009. **Estudio del almidón presente en frutos de variedades de musáceas cultivadas en Venezuela**. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

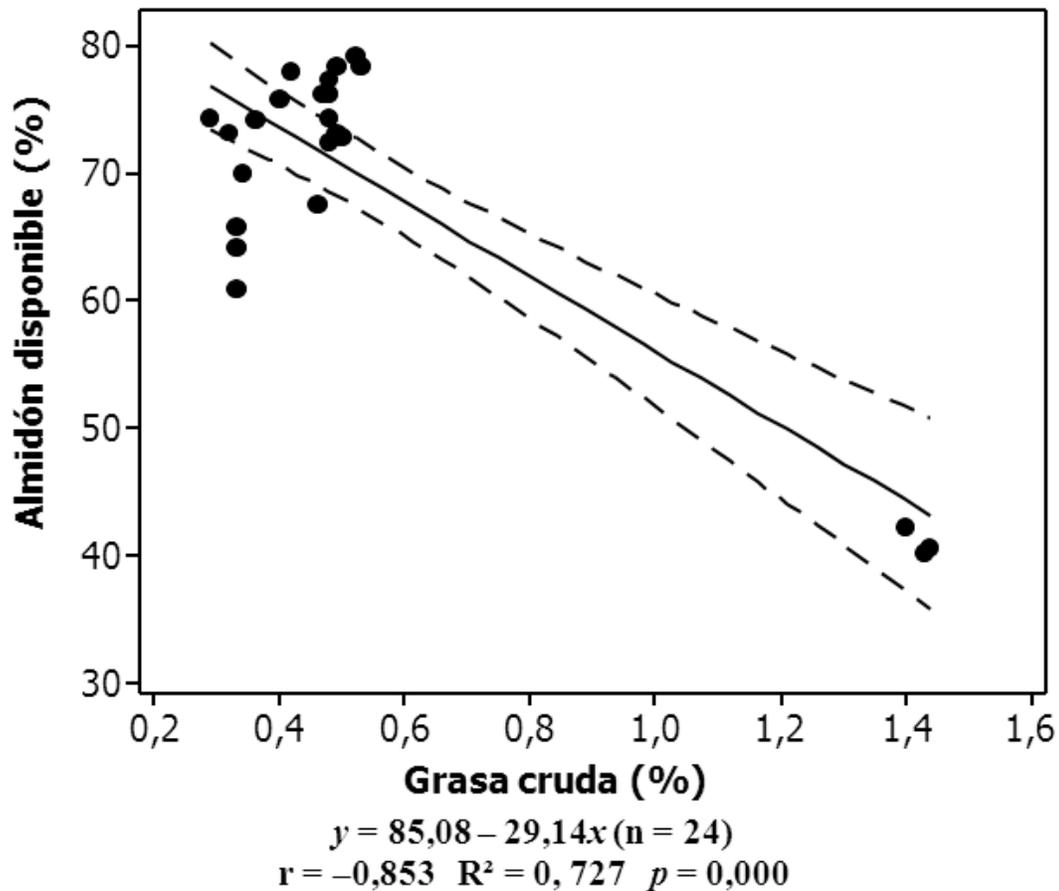
- Marriott, J., Robison, M., Karikari, S.K. 1981. Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **32**: 1021-1026.
- Martín, V. 2010. **Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones de plátano, variedades hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012.** Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Mason, W.R. 2009. **Starch use in foods.** Págs. 747–795 en: BeMiller, J., Whistler, R. (eds), **Starch: Chemistry and technology.** Tercera edición. Academic Press. New York, EE. UU.
- Millán G, Carmona, A. 2005. Estudios nutricionales con *Tribolium castaneum*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **4**: 53-56.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2004. **Lehninger Principles of Biochemistry.** W.H. Freeman. Cuarta Edición. Nueva York, EE. UU.
- O'Keefe, S.J.D., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., Mawhinney, T. 2009. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *The Journal of Nutrition*. **139**(11): 2044-2048.
- Oates, C.G. 1997. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*. **8**: 375-382.
- Ovando-Martínez, M., Sayago-Ayerdi, S., Agama-Acevedo, E., Goñi, I., Bello-Pérez, L.A. 2009. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. *Food Chemistry*. **113**: 121–126.
- Pacheco, E. 2001. Evaluación nutricional de sopas deshidratadas a base de harina de plátano verde. Digestibilidad *in vitro* del almidón. *Tecnología de Alimentos. Acta Científica Venezolana*. **52**:278-282.
- Penggalih, M.H.S.T., Gardjito, M., Sofro, Z.M. The effect of banana flour as an isotonic drink to maintain hydration status. *International Food Research Journal*. **18**(4): 1559-1561.
- Ploetz, R.C., Kepler, A.K., Daniells, J., Nelson, S.C. 2007. **Banana and plantain—an overview with emphasis on Pacific island cultivar.** Págs. 1-27 en: Elevitch, C.R. (ed.), **Species profiles for Pacific island agroforestry.** Permanent Agriculture Resources. Holualoa, HI. EE. UU.
- Ramli, S., Alkarkhi, A.F.M., Yong, Y.S., Min-Tze, L., Easa, A.M. 2009. Effect of banana pulp and peel flour on physicochemical properties and *in vitro* starch digestibility of yellow alkaline noodles. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **60**(4): 326-340.
- Ratnayake, W.S; Jackson, D.S. 2008. Thermal behavior of resistant starches RS2, RS3, and RS4. *Journal of Food Science*. **73**: C356–C366.
- Rodríguez-Ambriz, J; Hernández, E; Agama, E; Tovar, J; Bello, L. 2008. Characterization of a fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripe banana flour. *Food Chemistry*. **107**: 1515–1521.

- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 2006. Resistant starch – a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **5**: 1-17.
- Sarawong, C., Schoenlechner, R., Sekiguchi, K., Berghofer, E., Ng, P. 2014. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*. **143**:33–9.
- Sarko, A., Wu, H.C. 1978. The crystal structures of A-, B- and C-polymorphs of amylose and starch. *Starch/Stärke*. **30**(3): 73-78.
- Seneviratne, H.D., Biliaderis, C.G. 1991. Action of α -amylases on amylose-lipid complex superstructures. *Journal of Cereal Science*. **13**(2): 129–143.
- Simmonds, N.W., Shepherd, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated banana. *Botanical Journal of Linnean Society*. **55**:302-312.
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L. 2010. Starch digestibility in food matrix: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **21**: 168-180.
- Slade, L., Levine, H. 1987. **Recent advances in starch retrogradation**. Págs 387-430 en: Stivala, S. S., Crescenzi, V., Dea, I. C. M. (eds.), **Industrial Polysaccharides**. Gordon and Breach Science Publishers. New York, EE. UU.
- Soto, V. 2010. Cuantificación de almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa cavendishii*) y banana verde (*Musa paradisíaca*). *Revista Boliviana de Química*. **27**(2): 94–99.
- Stephen, A.M., Haddad, A.C., Phillips, S.F. 1983. Passage of carbohydrate into the colon: direct measurements in humans. *Gastroenterology*. **85**(3): 589-595.
- Takeda, C; Takeda, Y; Hizukuri, S. 1989. Structure of amylo maize amylase. *Cereal Chemistry*. **66**:22-5.
- Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X. 2004. Starch — composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. **39**: 151-165.
- Tester, R.F., Qi, X., Karkalas, J. 2006. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*. **130**: 39-54.
- Thorne, M.J., Thompson, L.U., Jenkins, D.J.A. 1983. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **38**: 481-488.
- Topping, D.L., Clifton, P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*. **81** (3): 1031-1064.
- Tribess, T., Hernández-Uribe, J., Méndez-Montealvo, M., Menezes, E., Bello-Pérez, L., Tadini, C. 2009. Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. *Food Science and Technology*. **42**: 1022–1025
- Vargas-Rodríguez, C.F; Boschini-Figueroa, C. 2007. Suplementación con harina de banano sobre la ganancia de peso en novillas Jersey. *Agronomía Mesoamericana*. **18**(1): 19-25.

- Valmayor, R.V., Jamaluddin, S.H., Silayoi, B., Kusumi, S., Danh, L.D., Pascua, O.C., Espino R.R.C. 2000. **Banana cultivar names and synonyms in southeast Asia**. International network for the improvement of banana and plantain. Montpellier, Francia.
- Von Loesecke, H.W. 1950. **Bananas**. Segunda edición. Interscience Publishers. Nueva York, EE. UU.
- Wenzel, E., Dan, M., Cardenette, G., Goñi, I., Bello-Pérez, L., Lajolo, F. 2010. *In vitro* colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour. *Plant Foods for Human Nutrition*. **65**:379–385.
- Wenzel, E., Tadini, C., Tribess, T., Zuleta, A., Binaghi, J., Pak, N., Vera, G., Dan, M., Bertolini, A., Cordenunsi, B., Lajolo, F. 2011. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata* var. Nanicão). *Plant Foods for Human Nutrition*. **66**:231–237.
- Zhang, P., Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Hamaker, B.R. 2005. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility — a review. *Carbohydrate Polymers*. **59**: 443-458.
- Zobel, H.F. 1988. Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke*. **40**(2): 44-50.

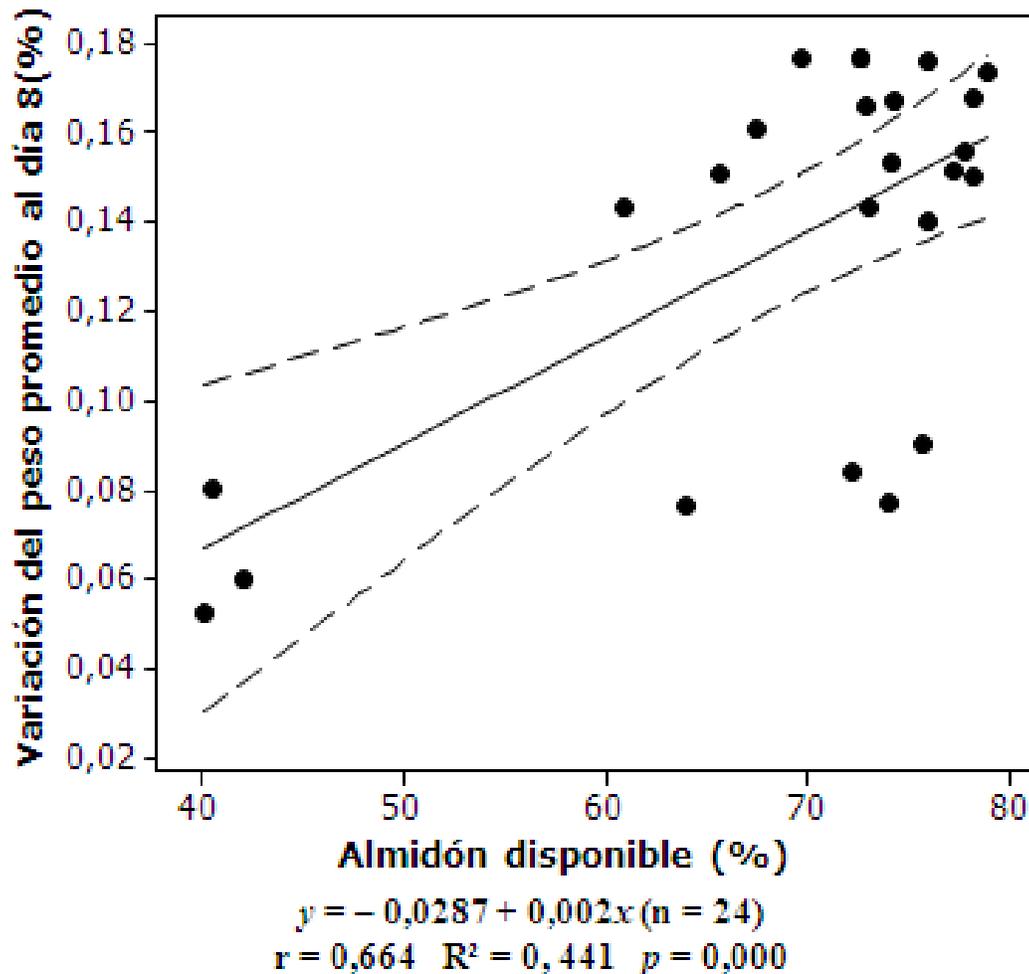
IX. ANEXOS

Anexo A. Gráfico de ajuste lineal entre el tenor de almidón disponible y el contenido de grasa cruda de las harinas.



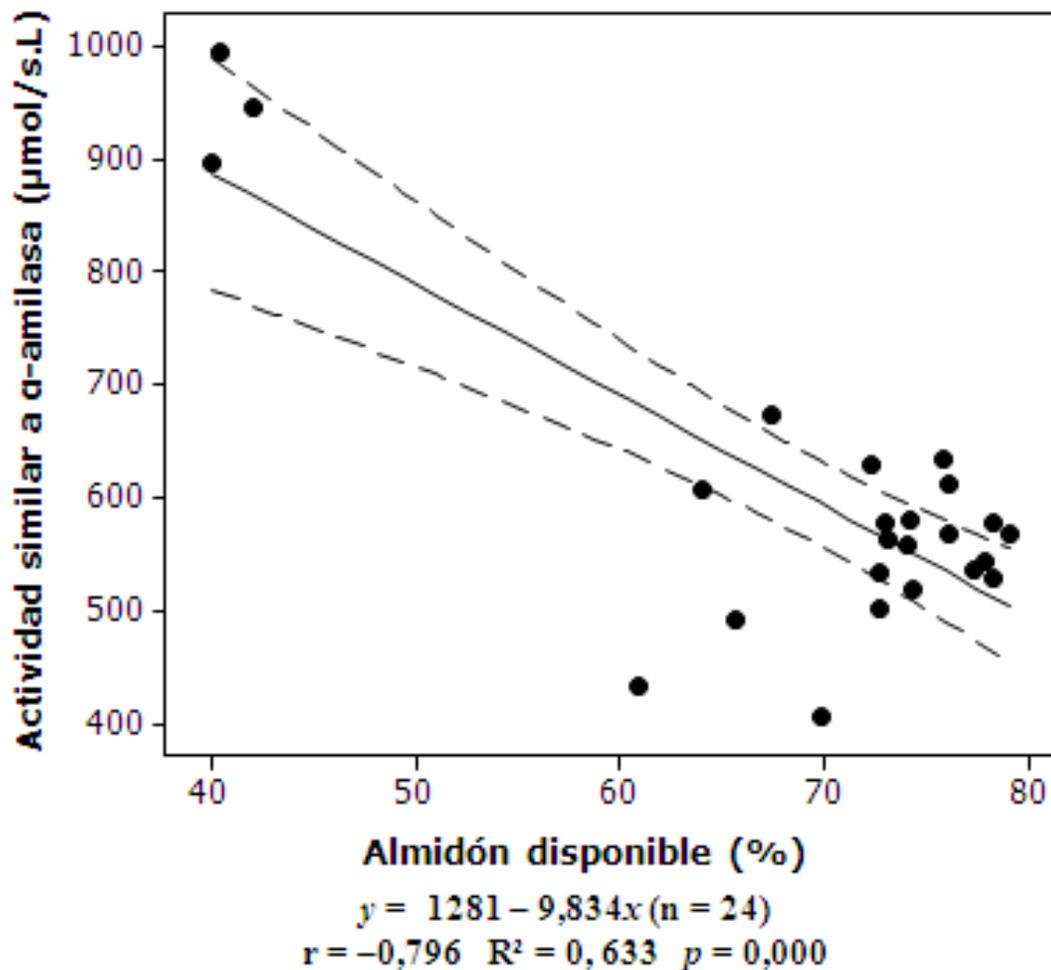
Las curvas punteadas indican el intervalo de confianza al 95%. Como se puede apreciar, el ajuste lineal fue determinado por el comportamiento de la harina 009 (BB), que presentó un bajo porcentaje de almidón disponible y un alto porcentaje de grasa cruda, respecto al resto de las harinas de banano.

Anexo B. Gráfico de ajuste lineal entre la variación del peso promedio del gorgojo de arroz alimentado con las harinas de banano y el tenor de almidón disponible de las harinas.



Las curvas punteadas indican el intervalo de confianza al 95%. La variación del peso promedio al día 8 representa la variación del peso del insecto al final del bioensayo (Figura 9). Como se puede apreciar, el ajuste lineal fue determinado por el comportamiento de la harina 009 (BB), que generó el menor incremento de peso en los insectos y presentó el menor tenor de almidón disponible entre todas las harinas de banano.

Anexo C. Gráfico de ajuste lineal entre el biomarcador actividad similar a α -amilasa y el tenor de almidón disponible de las harinas de banano.



Las curvas punteadas indican el intervalo de confianza al 95%. Como se puede apreciar, el ajuste lineal fue determinado por el comportamiento de la harina 009 (BB), que presentó la mayor actividad similar a α -amilasa y el menor porcentaje de almidón disponible entre todas las harinas de banano