

Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Instituto de Biología Experimental



Evaluación fisicoquímica y nutricional de películas comestibles a base de almidón

Trabajo de Ascenso presentado por la licenciada **Mighay C. Lovera F.** ante la ilustre Universidad Central de Venezuela como requisito parcial para optar al ascenso a la categoría de Profesor Asistente.

Caracas, Enero de 2014



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias



IBE Instituto de Biología Experimental

**ACTA DE LA DEFENSA DEL TRABAJO DE ASCENSO A LA CATEGORÍA DE ASISTENTE DE LA
PROFESORA MIGHAY CARLET LOVERA FUCHS**

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela para evaluar el Trabajo de Ascenso y la Clase Magistral de conformidad con el Artículo 63 del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la UCV, presentados por la Profesora **Mighay Carlet Lovera Fuchs** a los fines de su ascenso en el escalafón universitario a la categoría de ASISTENTE, dejan constancia de lo siguiente:

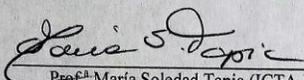
1.- Leído, como fue, el Trabajo de Ascenso titulado: **"Evaluación fisicoquímica y nutricional de películas comestibles a base de almidón"** por cada uno de los miembros del Jurado, se fijó el día 30 de mayo de 2014, a las 9:05 horas, para que la autora lo exponga en forma pública, lo que hizo en la Sala Werner G. Jaffé del Instituto de Biología Experimental (IBE) mediante una exposición de su contenido, luego de lo cual respondió a las preguntas que le fueron formuladas, todo de conformidad al Artículo 64 del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la Universidad Central de Venezuela.

2.- A la 10:50 horas del día 30 de mayo de 2014, se dio inicio a la prueba de la Clase Magistral. Efectuado el sorteo del tema en presencia de la interesada, resultó ser el N° Tres (3) titulado: **"Enzimas"**, del programa especialmente elaborado para este fin por el Consejo de Facultad y aprobado por el Consejo Universitario; luego se concedieron dos (2) horas a la profesora para preparar su exposición, permitiéndosele utilizar los materiales bibliográficos que consideró oportunos. Acto seguido, la profesora procedió a exponer el tema elegido a la suerte en presencia del Jurado en pleno y del público presente. A los cincuenta y ocho (58) minutos finalizó la exposición, solicitando el Jurado las aclaraciones que consideró necesarias y discutió su contenido con la profesora, dando así cumplimiento a lo establecido en el Artículo 64 del Reglamento antes citado.

3.- Una vez finalizada las pruebas del Trabajo de Ascenso y de la Clase Magistral, el Jurado en pleno procedió a deliberar, habiéndose acordado por UNANIMIDAD emitir el veredicto global de SUFICIENTE, de conformidad al Artículo 69 *ejusdem*, por considerar que tanto la Clase Magistral como el Trabajo de Ascenso reúnen los requisitos establecidos en los Artículos 64, 65 y 66 del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la UCV, esto es, dominio del tema y competencia pedagógica, así como el hecho de que el Trabajo significa un aporte personal de la autora que por el enfoque, desarrollo y por la metodología empleada constituyen una contribución valiosa en la materia.

5.- Conforme a lo pautado en el Artículo 99 del Reglamento, por UNANIMIDAD, resolvió otorgar al Trabajo de Ascenso Mención Honorífica por considerar que es el primer aporte del uso de un bioensayo para obtener información nutricional en la caracterización de biomateriales para la formulación de películas comestibles con potencial uso en la industria alimentaria.

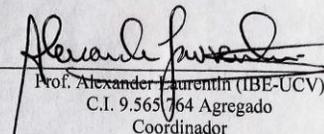
En fe de lo cual se levanta la presente Acta en Caracas a los treinta días del mes de mayo de dos mil catorce, dejándose también constancia de que conforme a lo dispuesto en el Reglamento, actuó como Coordinador del Jurado el profesor Alexander Laurentin. Igualmente, se deja constancia que la profesora Mercedes Schnell, quien fue designada como miembro suplente por el organismo correspondiente, actuó por la profesora Marisela Granito.



Prof.^a María Soledad Tapia (ICTA-UCV)
C.I. 3.914.268 Titular
Por el Consejo de Facultad



Prof.^a Mercedes Schnell (Medicina-UCV)
C.I. 243387 Titular
Por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico



Prof. Alexander Laurentin (IBE-UCV)
C.I. 9.565.764 Agregado
Coordinador



Calle Suapure, Colinas de Bello Monte
Telfs. 58 (0212) 751-0111, 751-0944, 751-0377, Tel-Fax : 7535897-7518353 – Caracas 1041, Venezuela
e-mail: diribe@ciens.ucv.ve

Resumen

Las películas comestibles son una capa delgada de un material polimérico que puede ser ingerido directamente como una lámina o formando parte de un alimento. Funcionan como una barrera física que extiende la vida útil del alimento y como vehículo para la incorporación de ingredientes funcionales. El almidón puede ser empleado para la producción de películas comestibles y sus características como polímero, les confiere propiedades mecánicas y nutricionales particulares; que varían dependiendo de la fuente botánica del almidón. En este estudio, se realizó una evaluación fisicoquímica y nutricional de películas comestibles a base de almidón de maíz, maíz *waxy* (*Zea mays* L.), mapuey (*Dioscorea trifida* L.), yuca (*Manihot sculenta* Crantz), apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), ocumo chino (*Colocasia esculenta* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). Para ello, (i) se aislaron y caracterizaron nutricionalmente los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles, mediante el estudio de la digestibilidad *in vitro* (almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis) e *in vivo* (supervivencia, variación de peso, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico en el gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L.); (ii) se formularon las películas comestibles y se caracterizaron desde el punto de vista fisicoquímico, mecánico, morfológico y propiedades de barrera; y (iii) se caracterizaron nutricionalmente (digestibilidad *in vitro* e *in vivo*) a las películas comestibles formuladas. Películas comestibles a base de almidón de maíz, maíz *waxy*, mapuey, apio y papa al 5% (p/v) y de ocumo chino y yuca al 6% (p/v) fueron formuladas satisfactoriamente con la incorporación de 2% (v/v) de glicerol; resultando en películas fácilmente manejables y flexibles. Las películas de almidón de yuca y de maíz *waxy* presentaron las mejores propiedades de barrera al vapor de agua; sin embargo, a diferencia de las películas de almidón de papa, mapuey y maíz regular, fueron altamente solubles y tolerantes al agua. Desde el punto de vista de la digestibilidad del almidón, las películas comestibles presentaron contenidos de almidón disponible entre 58-70%, contenidos de almidón resistente total altos (papa y mapuey; entre 5-15%), intermedios (maíz, apio y ocumo chino; entre 2,5-5,0%) y bajos (yuca y maíz *waxy*; entre 1-2,5%), así como una alta tasa de hidrólisis enzimática en su estado crudo. Las películas elaboradas con el almidón de maíz *waxy* fueron más digeribles que las preparadas con el almidón de maíz regular. La excreción de ácido úrico y la actividad similar a α -amilasa permitieron evaluar la calidad nutricional de los almidones, encontrándose correlaciones negativas y positivas ($p < 0,05$) con el contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, respectivamente. No obstante, con las películas comestibles no se encontró correlación alguna entre los parámetros de digestibilidad *in vitro* y estos biomarcadores. Estos resultados permiten identificar propiedades que incrementan el valor nutricional de las películas comestibles, por ejemplo, los altos contenidos de almidón resistente como fuente de fibra alimentaria, lo que contribuiría a ampliar los usos de estas preparaciones como vehículo de ingredientes funcionales (prebióticos y probióticos).

Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Polisacáridos Vegetales** del Centro de Biología Celular, **Instituto de Biología Experimental**, Facultad de Ciencias, *Universidad Central de Venezuela*, bajo la supervisión del profesor Alexander Laurentin, Ph.D.

DEDICATORIA

A mi Alma Máter

La casa que vence la sombra

A la academia

Conocimiento, constancia y disciplina

A mis profesores

Vocación, orgullo y tenacidad

A mis estudiantes

Progreso y futuro

AGRADECIMIENTOS

A mi maravillosa familia

Al Dr. Alexander Laurentin

A mis amigas, las Doctorísimas: Ana, Meris y Carolina

A las Dras. María Soledad Tapia y Elevina Pérez

A mis compañeros de Laboratorio:

Carlos Prazuela y Carlos González

A los entes financiadores:

El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela

y el Ministerio del Poder Popular de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Tabla de contenido

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	4
	2.1. Películas y coberturas comestibles	4
	2.2. Aspectos generales del almidón	6
	2.3. Películas comestibles a base de almidón	12
	2.4. Fuentes botánicas para la obtención de almidón	14
	2.5. Digestibilidad de almidones	15
	2.6. Estudios de digestibilidad <i>in vitro</i> en películas comestibles a base de almidón.....	21
	2.7. Bioensayo del gorgojo de arroz	23
III.	Objetivos.....	25
IV.	Materiales y Métodos	26
	4.1. Materia prima	26
	4.2. Extracción y purificación del almidón.....	26
	4.3. Composición proximal de los almidones extraídos.....	27
	4.4. Películas comestibles a base de almidón	27
	4.4.1. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones	28
	4.4.2. Preparación de la solución formadora de película	28
	4.4.3. Caracterización de las películas comestibles	29
	<i>Determinación del grosor</i>	29
	<i>Determinación de la actividad de agua</i>	29
	<i>Determinación de la permeabilidad al vapor de agua</i>	29
	<i>Solubilidad en agua</i>	31
	<i>Capacidad de retención de agua</i>	32
	<i>Determinación de color</i>	32
	<i>Determinación del pH</i>	33
	<i>Determinación de la prueba de punción</i>	33
	<i>Microscopia electrónica de barrido</i>	33
	4.5. Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> de los almidones y las películas comestibles.....	34
	<i>Determinación del contenido de almidón disponible</i>	34

<i>Determinación del contenido de almidón resistente total</i>	37
<i>Determinación de la tasa de hidrólisis enzimática</i>	39
4.6. Determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> de los almidones y las películas comestibles.....	42
<i>Preparación de las dietas de almidones y de películas comestibles</i>	42
<i>Mantenimiento del cultivo de gorgojos y bioensayo</i>	43
<i>Determinación de la supervivencia y variación de peso</i>	44
<i>Determinación de la actividad similar a α-amilasa</i>	44
<i>Determinación de la excreción de ácido úrico</i>	45
4.7. Análisis estadístico	48
V. Financiamiento	48
VI. Resultados.....	49
Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles	49
Formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles.....	63
Caracterización nutricional de las películas comestibles.....	74
VII. Discusión	82
Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles	82
Formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles.....	109
Caracterización nutricional de las películas comestibles.....	137
VIII. Conclusiones.....	149
IX. Recomendaciones	152
X. Bibliografía.....	153

Índice de figuras

Figura 1. Enzimas de la biosíntesis del almidón y la estructura del gránulo.....	8
Figura 2. Tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de los almidones estudiados.....	54
Figura 3. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.	57
Figura 4. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones....	57
Figura 5. Variación de peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.	59
Figura 6. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.	59
Figura 7. Pérdida de agua del sistema experimental en función del tiempo, en cada una de las películas comestibles.....	67
Figura 8. Morfología de las películas comestibles a base de distintas fuentes de almidón..	73
Figura 9. Tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de las películas comestibles.	76
Figura 10. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	78
Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	78
Figura 12. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la morfología de las películas comestibles a base de almidón de maíz <i>waxy</i>	114

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón.....	18
Tabla 2. Composición proximal y pureza de los almidones.....	50
Tabla 3. Contenido de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones.....	52
Tabla 4. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de los almidones.....	55
Tabla 5. Pesos promedio de los insectos y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con los diferentes almidones.	60
Tabla 6. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.....	61
Tabla 7. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.....	62
Tabla 8. Criterios cualitativos de selección que presentaron las formulaciones seleccionadas de películas comestibles a base de almidón y glicerol.	64
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas y de barrera de las películas a base de almidón.	65
Tabla 10. Determinación del color de las películas comestibles.	69
Tabla 11. Propiedades mecánicas de las películas comestibles determinadas con la prueba de punción.	71
Tabla 12. Contenido de almidón disponible y almidón resistente total de las películas comestibles.	74
Tabla 13. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de las películas comestibles.	77
Tabla 14. Pesos promedio y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con las diferentes películas comestibles.	79
Tabla 15. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	80
Tabla 16. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	81

I. Introducción

Las películas comestibles han recibido una atención considerable en los últimos años, debido a las ventajas que ofrecen en relación a las películas fabricadas a partir de materiales sintéticos (Bourtoom, 2008). La principal ventaja de las películas comestibles, es que pueden ser ingeridas sin generar toxicidad. Esto es posible, debido a que son preparadas utilizando ingredientes biodegradables y comestibles (Bourtoom, 2008), los cuales, en su mayoría, pueden ser digeridos por el sistema digestivo humano y los productos de su digestión ser aprovechados biológicamente, produciendo con ello, importantes efectos fisiológicos en el consumidor.

El uso de películas comestibles como vehículo para la incorporación de compuestos funcionales y bioactivos, ha surgido como una alternativa novedosa en la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan mejorar la calidad y las propiedades nutricionales de los alimentos consumidos por el hombre (Han y Gennadios, 2005). Por ejemplo, las películas comestibles pueden incrementar las propiedades organolépticas de los alimentos empaquetados, mediante la incorporación de saborizantes, colorantes y edulcorantes (Bourtoom, 2008). Por su parte, los agentes antioxidantes y antimicrobianos pueden ser incorporados para desarrollar coberturas o empaques activos (Han, 2002), ofreciendo protección al deterioro físico, químico y biológico de los alimentos (Kester y Fennema, 1986).

Diversos compuestos con la capacidad de formar películas, se han utilizado para la fabricación de películas y coberturas comestibles, entre ellos se encuentran los biopolímeros como las proteínas, polisacáridos, además de los compuestos lipídicos como

resinas, ácidos grasos y ceras (Han y Gennadios, 2005). Entre los polisacáridos utilizados, el almidón es una molécula que posee un gran potencial para ser empleado como matriz estructural de películas comestibles, debido a su comportamiento hidrofílico y a su habilidad para actuar como barrera al oxígeno (Hernández, 2006). Los estudios realizados utilizando almidón como base para fabricar películas comestibles, incluyen diversas fuentes vegetales como: maíz (Mali y col., 2004b; Xu y col., 2005; Bertuzzi y col., 2007; López y col., 2008; 2010), ñame (Mali y col., 2004a; 2004b), papa (Jansson y Thuvander, 2004; Hernández y col., 2008; Rojas, 2007), plátano (Romero-Bastidas y col., 2005; Sothornvit y Pitak, 2007; Ortiz, 2010), yuca (Parra y col., 2004; Mali y col., 2004b; Kampeerapappum y col., 2007; Famá y col., 2007; Chillo y col., 2008; Phan The y col., 2009), arroz (Bourtoom y Chinnan, 2008; Li y col., 2008), sagú (Hernández y col., 2008) y mango (Romero-Bastidas y col., 2005). Dependiendo del tipo de materia prima del cual provenga el almidón (cereales, tubérculos o frutos) y de sus características intrínsecas como polímero (tamaño y forma del gránulo, contenido de amilosa y amilopectina, grado de cristalinidad de los polímeros, temperatura de gelatinización, modificaciones químicas o físicas del almidón, etc), podrían obtenerse películas con diferentes propiedades mecánicas que pudieran ser utilizadas para diversos propósitos en el área de tecnología de alimentos.

En la fabricación de películas y coberturas comestibles, por lo general se adicionan polioles plastificantes como el glicerol (Donhowe y Fennema, 1993; Gontard y col., 1993; Park y col., 1994; Sothornvit y Krochta, 2000; Banker y col., 2000; Yang y Paulson, 2000; Cao y col., 2009; Adeodato y col., 2011) y ciertos aditivos (Shrestha y col., 2003; Seydim y Sarikus, 2006; Rojas-Graü y col., 2007), los cuales pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, morfológicas y de barrera de las películas, ampliando así su uso

en la industria de alimentos. Por lo tanto, el estudio de estas propiedades podría orientar al investigador, en la selección del vehículo adecuado para la incorporación de otros compuestos, que permitan aumentar la vida útil de los alimentos sin alterar las propiedades naturales de los mismos, además de incrementar su valor nutritivo y los efectos beneficiosos que tienen estos sobre la salud del consumidor. La elección de estos compuestos y/o aditivos activos a añadir, está totalmente relacionado con la función para la cual se desea utilizar la película o cobertura comestible, la naturaleza del alimento y el método de aplicación (Debeaufort y col., 1998).

El almidón es uno de los materiales poliméricos más utilizados para la elaboración de coberturas y películas comestibles. A pesar de la abundante información sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas y tecnológicas de las películas a base de almidón, poco se conoce sobre su digestibilidad *in vitro* e *in vivo* y, aunque usualmente sólo representan una pequeña parte del alimento que recubre, conocer la digestibilidad puede proveer información útil que pudiera ampliar los usos de este tipo de material (Lovera y col., 2012) En este sentido, el estudio de la digestibilidad *in vivo* empleando como modelo biológico al gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae*, constituye un enfoque novedoso para evaluar nutricionalmente estas preparaciones.

II. Antecedentes

2.1. Películas y coberturas comestibles

Las películas comestibles se definen como una capa delgada de un material generalmente polimérico, que puede ser ingerido y que, además, provee una barrera a la humedad, al intercambio de oxígeno y al transporte de masa a través de alimentos frescos o manufacturados (Martín-Polo y col., 1992; Bourtoom, 2008). Este material puede encontrarse dispuesto como una capa continua entre los componentes del alimento o puede estar cubriendo totalmente al mismo (Guilbert, 1986 citado por Bourtoom, 2008), llamándose así cobertura. En este caso, la matriz polimérica se aplica sobre la superficie del alimento en adición o reemplazo de la corteza natural, comportándose principalmente como barreras que reducen la difusión de gases (O_2 , CO_2 y vapor de agua), permitiendo de esta forma extender la vida útil del alimento (Carrasco y col., 2002). Este tipo de coberturas, por lo general se emplean en frutas y vegetales frescos, tanto enteros como cortados (Hernández, 2006; Tapia y col., 2008; Villalobos-Carvajal y col., 2009), formando una barrera entre el alimento y el medio externo, que promueve un intercambio respiratorio controlado y simultáneamente evita la respiración anaeróbica (Kester y Fennema, 1986).

Durante su preparación, los materiales formadores de películas, deben dispersarse y disolverse en un solvente como el agua, alcohol o una mezcla de agua y alcohol, u otros solventes de grado comestible. Durante este proceso se pueden añadir plastificantes, agentes microbianos, antioxidantes, colorantes y saborizantes (Bourtoom, 2008). En la mayoría de los casos, es necesario un ajuste del pH de las soluciones y un tratamiento con

calor, de manera de facilitar la dispersión de cada polímero específico. Finalmente, la solución formadora de película es secada a una temperatura y humedad relativa característica (Bourtoom, 2008), o puede ser aplicada directamente a los alimentos por medio de diversos métodos como la impregnación al vacío y el enriquecimiento directo (Tapia y Carmona, 2008). En el caso de las películas, el material polimérico se deja solidificar en una capa delgada y se estudia separado del sistema que va a recubrir. De esta manera, se pueden investigar sus propiedades de forma aislada, las cuales se podrían extrapolar al caso cuando se encuentren recubriendo una matriz alimentaria (Ortiz, 2010).

Los mecanismos involucrados en la formación de películas a partir de biopolímeros, incluyen fuerzas intermoleculares como enlaces covalentes (puentes disulfuros y entrecruzamientos) y/o interacciones electrostáticas, hidrofóbicas e iónicas (Han y Gennadios, 2005). El pH, la temperatura, la adición de sal, el uso de solventes de grado alimenticio, la adición de otros compuestos químicos (plastificantes y aditivos) y el proceso de secado, pueden afectar considerablemente las interacciones entre los biopolímeros (Han y Gennadios, 2005).

Los componentes usados en la formulación de películas comestibles pueden ser clasificados en tres categorías: hidrocoloides (tales como proteínas y polisacáridos), lípidos (tales como ácidos grasos, triacilglicerol y ceras) y materiales compuestos, aquellos formados por la combinación de hidrocoloides y lípidos (Donhowe y Fennema, 1993). Estas moléculas pueden ser hidrofílicas o hidrofóbicas, por lo que mezclas entre ellas, por lo general, permiten la formación de una matriz estructural con suficiente cohesión (Debeaufort y col., 1998). Esta característica viene dada por la habilidad de los polímeros para formar puentes moleculares numerosos y estables entre cadenas poliméricas, los

cuales impiden su separación (Guilbert y Biquet, 1996 citado por Tapia, 2007). El grado de cohesión gobierna las propiedades de barrera y mecánicas de las coberturas (Tapia, 2007).

En las películas heterogéneas se combinan las ventajas de ciertos componentes (Kester y Fennema, 1986), modificando las propiedades físicas y reológicas de los geles formados. Esto es consecuencia de la compatibilidad que puede darse entre las diferentes macromoléculas utilizadas, por ejemplo: en cuanto a peso molecular, estructuras químicas, conformaciones, comportamiento en soluciones acuosas o capacidad de hidratación (Phan The y col., 2009). Es por ello, que las características físicas y químicas de los biopolímeros afectan notablemente las propiedades de las películas y coberturas resultantes (Sothornvit y Krochta, 2000).

Entre los polisacáridos capaces de formar películas se encuentran: el almidón y los polisacáridos no amiláceos (agar, celulosa, gomas, quitosano, carragenano, pectina, alginato, entre otros) (Han y Gennadios, 2005). Los almidones son frecuentemente utilizados en la industria de alimentos (Badui, 2006; Bourtoom, 2008), debido a que poseen múltiples propiedades funcionales: ligante, enturbiante, formador de películas, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante (Edel-Leon y col., 2007; Singh y col., 2007).

2.2. Aspectos generales del almidón

Desde el punto de vista químico, los gránulos de almidón se componen de una mezcla de dos tipos de polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina, los cuales representan aproximadamente un 98–99% del peso seco del gránulo, con una pequeña

cantidad de lípidos, minerales y fósforo en la forma de fosfatos esterificados a los grupos hidroxilos de las moléculas de glucosa (Tester y col., 2004; Copeland y col., 2009).

La amilosa es producto de la condensación de α -D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$, que establece largas cadenas esencialmente lineales con 200-2500 unidades (Badui, 2006) y pesos moleculares de 10^5 – 10^7 daltons (Mua y Jackson, 1997 citado por Tester y col., 2004). Este polímero tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta consta de seis moléculas de glucosa (Badui, 2006). Por su parte, la amilopectina además de presentar enlaces $\alpha(1,4)$, es una molécula ramificada con puntos de ramificación $\alpha(1,6)$ cada 24 a 30 residuos de glucosa (Voet y Voet, 2006) y con un peso molecular de 10^7 – 10^9 daltons (Mua and Jackson, 1997 citado por Tester y col., 2004). Las características de ambos polímeros, como el tamaño, forma y estructura molecular, van a variar dependiendo de la fuente botánica de la cual se extraiga el almidón (Tester y col., 2004).

Existen una serie de genes involucrados en la síntesis del gránulo almidón (Jobling, 2004) y la expresión de estos genes es responsable de la composición química y de la estructura del gránulo (Figura 1). Los almidones contienen, generalmente, 15–20% de amilosa y 80–85% de amilopectina (Mayes y Bender, 2003); sin embargo, estas relaciones son variables y pueden encontrarse almidones ricos en amilosa, así como también almidones compuestos principalmente por amilopectina (almidones cerosos o *waxy*) (Jobling, 2004; Copeland y col., 2009).

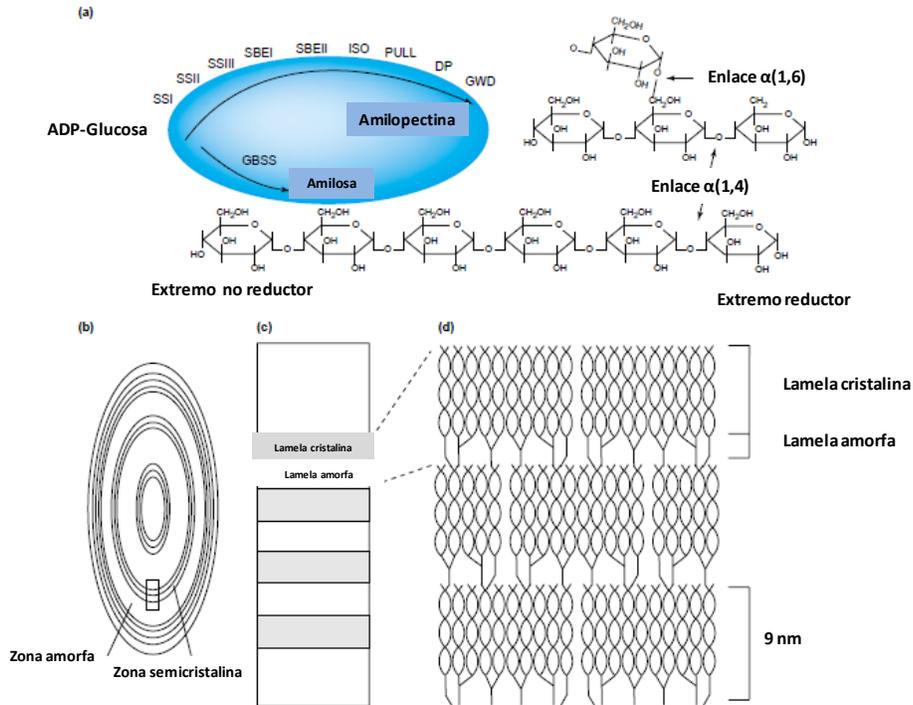


Figura 1. Enzimas de la biosíntesis del almidón y la estructura del gránulo.

(a) Vista esquemática de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la amilopectina y la amilosa, junto con la estructura molecular de estos glucanos. La GBSS se muestra en el gránulo como la única enzima que se encuentra exclusivamente unida al gránulo de almidón y ser la responsable de la síntesis de la amilosa. La biosíntesis de la amilopectina ocurre en la superficie del gránulo a través de las actividades de las enzimas indicadas. La síntesis del almidón utiliza ADP-glucosa como donador de unidades de glucosa a los extremos no reductores de las cadenas de glucanos. La unión ocurre mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$. Por su parte, las enzimas ramificadoras rompen estas cadenas y las unen a otras a través de enlaces $\alpha(1,6)$. (b) Vista esquemática de la estructura de un gránulo de almidón mostrando las zonas amorfas y cristalinas de manera alternada. Pares de estas zonas constituyen un anillo de crecimiento. Las zonas amorfas contienen amilopectina en un estado menos ordenado junto con la amilosa. El gránulo es de aproximadamente $50 \mu\text{m}$ de longitud. (c) Vista en aumento de un anillo de crecimiento de la región semicristalina, mostrando el rearreglo alternado de las lamelas cristalinas y amorfas. (d) Cada lamela cristalina consiste en una agrupación de cadenas de glucanos unidas por enlaces $\alpha(1,4)$ de manera paralela, con una conformación helicoidal. Los puntos de ramificación $\alpha(1,6)$ en las bases de estas hélices forman la lamela amorfa y la unión con la lamela cristalina. SS: sintasa de almidón I, II y III; SBE: enzima ramificadora del almidón I y II; ISO: isoamilasa; PULL: pululanasa; DP: enzima desproporcionadora; GWD: α -glucano diquinasa; GBSS: sintasa de almidón unida al gránulo. Tomado de Jobling (2004).

El carácter ceroso es causado por una mutación en el locus *waxy*, afectando la producción de amilosa (Gianibelli y col., 2005). Por lo tanto, los mutantes *waxy* no producen amilosa y sus almidones están constituidos prácticamente de amilopectina (Brown y col., 1971; Robutti, 2004; Jobling, 2004; Gianibelli y col., 2005). Estos mutantes carecen de la proteína *waxy* o la sintasa de almidón unida al gránulo (GBSS de sus siglas en inglés: *granule-bound starch synthase*) y han sido identificados en varias especies de plantas como maíz, arroz, cebada y sorgo (Gianibelli y col., 2005). La falta de amilosa en el almidón de maíz ceroso significa que gelatiniza fácilmente, obteniéndose pastas claras que no gelifican (Jobling, 2004). Es comunmente utilizado como un estabilizador y espesante en productos alimenticios y como un emulsificador para aderezos de ensaladas (Jobling, 2004). La presencia de estas variantes genéticas hace del almidón de maíz un polímero con numerosas aplicaciones, que se pueden ampliar aun más, ya sea por modificación química o mejoramiento genético (Robutti, 2004).

El almidón es almacenado en las plantas en forma de gránulos altamente condensados que tienden a adquirir una conformación macromolecular semi-cristalina; confiriéndoles un patrón de difracción de rayos X característico (Martín, 2010). Estos patrones se han diferenciado en tres grupos denotados como A, B y C. Los almidones tipo A se encuentran principalmente en cereales (arroz, trigo y maíz), mientras que los almidones tipo B se encuentran en tubérculos, raíces (papa, sagú, ñame y mapuey) y almidones ricos en amilosa (amilomaíz). El tercer tipo de estructura cristalina denominada tipo C parece ser una mezcla de las formas A y B, encontrándose en almidones de semillas, leguminosas y tubérculos (Hoover, 2001). Además de la organización de la molécula de almidón en el gránulo, hoy en día se sabe que la longitud de las cadenas ramificadas de la amilopectina, influye sobre

el patrón de difracción de rayos X, siendo un factor determinante en el tipo de estructura cristalina que ha de adoptar el gránulo de almidón (Hizukuri, 1985; Hoover, 2001; Sajilata y col., 2006). Se ha descrito que los almidones de tubérculos contienen menos cadenas de amilopectina de estructura tipo A (entre 23–29 residuos de glucosa) y más cadenas largas de estructura tipo B (entre 30–44), que los almidones de cereales. Mientras que en la estructura tipo C, la longitud promedio de las cadenas de amilopectina está entre 26–29 residuos de glucosa (Hizukuri, 1985; Sajilata y col., 2006).

Desde el punto de vista nutricional, los almidones con patrones del tipo B tienden a presentar una mayor resistencia a la hidrólisis enzimática que aquellos que presentan un patrón de difracción del tipo A, mientras que los almidones con patrones del tipo C, presentan un grado de hidrólisis intermedio, entre éstos (Gallant y col., 1992; Marín, 2009).

Los gránulos de almidón intactos son insolubles en agua fría, debido a que su estructura está altamente organizada y a que presenta una gran estabilidad por las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos constituyentes (Badui, 2006). Sin embargo, cuando se calientan empieza un proceso lento de absorción de agua en las zonas intermicelares amorfas, que son las menos organizadas y las más accesibles, ya que los puentes de hidrógeno no son tan numerosos ni rígidos como en las áreas cristalinas (Badui, 2006). Esta absorción de pequeñas cantidades de agua en forma reversible, ocasiona un pequeño hinchamiento (Haros y col., 2003). Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura se retiene más agua, las moléculas vibran vigorosamente, rompiéndose los enlaces intermoleculares y permitiendo así la formación de puentes de hidrógeno con el agua (Orthofer, 1991). El gránulo continúa hinchándose y aumentando de volumen,

fenómeno que puede observarse en el microscopio, sin que se presente un aumento importante de la viscosidad; una vez que la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina inicia un proceso semejante, pero para esto se requiere más energía (Badui, 2006).

Al llegar a ciertas temperaturas —normalmente cercanas a 65 °C, aunque depende de cada tipo de almidón—, el gránulo alcanza su volumen máximo y pierde tanto su patrón de difracción de rayos X como la propiedad de birrefringencia; si se administra más calor, el gránulo hinchado, incapacitado para retener más líquido, se rompe parcialmente y la amilosa y la amilopectina, fuertemente hidratadas, se dispersan en el seno de la solución (Badui, 2006). Esta pérdida de la estructura original del gránulo va acompañada de un aumento de la viscosidad de la solución. A todo este proceso se le llama gelatinización y es una transición de un estado ordenado (estructura cristalina) a otro desordenado en el que se absorbe calor. La temperatura de gelatinización es aquella en la que se alcanza el máximo de viscosidad y ocurre la pérdida de la cristalinidad. Normalmente la gelatinización se produce en un estrecho margen de temperatura, gelatinizándose primero los gránulos de mayor tamaño y por último los más pequeños (Edel-Leon y col., 2007). Durante la etapa de gelatinización los gránulos sufren un gran hinchamiento. En este estado, mediante agitación los gránulos son fácilmente desintegrados por friccionarse unos contra otros, lo cual provoca una disminución de la viscosidad de la pasta (Haros y col., 2006).

Las moléculas de amilosa, en la fase inicial de la gelatinización, difunden hacia y a través de la membrana superficial del gránulo y pasan así a la solución extragranular. Por enfriamiento rápido de la pasta de almidón, generalmente se produce un incremento de la viscosidad, mientras que en ausencia de agitación se produce la formación de un gel. Estos

geles tienden a sufrir retrogradación. Se designa con este término a la intensa e irreversible transición desde el estado soluble o disperso a otro insoluble, no hinchado y microcristalino (Edel-Leon y col., 2007). Este fenómeno también puede ser alcanzado por enfriamiento lento del engrudo, en este caso ocurre la precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan de forma paralela e interaccionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de múltiples grupos hidroxilos presentes en la molécula (Badui, 2006). Cada almidón tiene una tendencia diferente a la retrogradación, lo cual se relaciona con su contenido de amilosa. Es más difícil que la amilopectina desarrolle esta tendencia, debido a que sus ramificaciones impiden la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes (Badui, 2006).

2.3. Películas comestibles a base de almidón

Los almidones se han empleado en la formulación de películas comestibles debido a su bajo costo, durabilidad, buenas propiedades mecánicas (Xu y col., 2005) y su habilidad para actuar como barrera al oxígeno (Hernández, 2006). Por ejemplo, se han producido películas biodegradables a base de almidón, que reemplazan parcial o completamente polímeros como el plástico (Xu y col., 2005).

La capacidad de los almidones para formar películas está relacionada con la concentración de amilosa, así como también con la arquitectura macromolecular de sus componentes, principalmente el tamaño de las cadenas poliméricas (Mali y col., 2004a). En este sentido, almidones con un elevado contenido de amilosa como el almidón de maíz, han resultado ser una buena fuente vegetal para la formación de películas, las cuales se

obtienen a partir de soluciones acuosas de amilosa gelatinizada y un proceso de secado (Bourtoom, 2008). Tanto almidones nativos como modificados han sido capaces de formar películas y las diferencias encontradas en cuanto a la transparencia y la consistencia de las mismas, son principalmente atribuidas a las características intrínsecas de los almidones utilizados (Larotonda y col., 2004; López y col., 2010).

Las películas comestibles a base de almidón han sido descritas como inoloras, incoloras y sin sabor, además que poseen una muy baja permeabilidad al oxígeno (Phan The y col., 2009), lo cual disminuye la tasa de oxidación de los alimentos en los que se utilizan como coberturas (Forsell y col., 2002). Sin embargo, debido a que la amilosa y la amilopectina tienen un elevado comportamiento hidrofílico (Forsell y col., 2002), las propiedades de barrera al vapor de agua han sido relativamente pobres en comparación con las películas comestibles en las que se utilizan ceras o polietileno de baja densidad (Mathew y Abraham, 2008). Sin embargo, esta característica las hace idóneas para ser utilizadas en productos vegetales frescos, ya que permite el movimiento del vapor de agua, evitando así la condensación de la misma, lo que podría ser fuente potencial para el crecimiento de microorganismos (García y col., 1998).

La amilosa es responsable de la capacidad de formación de película en las películas comestibles a base de almidón (Mali y col., 2004a, Bertuzzi y col., 2007). En ausencia de plastificantes, las películas formuladas a partir de almidón o de amilosa, son frágiles (Koskinen y col., 1996). Los plastificantes se requieren en las formulaciones a base de polisacáridos y de proteínas para aumentar la flexibilidad y manejabilidad de las películas y coberturas, al aumentar el volumen libre o la movilidad molecular de los polímeros, reduciendo los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de polímeros y aumentando

el espaciamiento intermolecular (Tapia, 2007). Sin embargo, estos compuestos afectan la habilidad del sistema de atraer agua y también aumentan generalmente la permeabilidad de las películas al oxígeno (Sothornvit y Krochta, 2000). Jangchud y Chinnan (1999) reportaron que el glicerol es el mejor plastificante (entre sorbitol, propilenglicol y polietilenglicol) para los polímeros solubles en agua. Con base a este hallazgo, el glicerol es utilizado con frecuencia como plastificante de películas y coberturas comestibles.

2.4. Fuentes botánicas para la obtención de almidón

El almidón es la sustancia de reserva de las plantas y se encuentra en grandes cantidades en cereales, leguminosas, raíces y tubérculos. Los alimentos que contienen almidón, han sido de gran importancia en la nutrición humana desde que el hombre primitivo se estableció en comunidades agrarias, varios miles de años atrás (Drewnowski y Popkin, 1997). Actualmente, el estudio de esta molécula cada vez más se hace partícipe en la comunidad científica, ampliando su comprensión y utilización en beneficio de la especie humana.

Aun cuando los almidones de distintas fuentes exhiben una estructura fundamental similar, ellos difieren en detalles específicos de su micro y ultraestructura (Sívoli, 2009). Las diferencias entre los tipos de almidones con respecto a la morfología del gránulo (tamaño, forma, presencia de poros, canales y cavidades), estructura molecular (amilosa y amilopectina) y composición (relación amilosa amilopectina, contenido de componentes no amiláceos) son los responsables de las variaciones en las propiedades del almidón (Jobling, 2004; Sívoli, 2009).

Mundialmente la industria del almidón y las harinas ha estado limitada a unos pocos cultivos tradicionales: maíz, papa, trigo, arroz y yuca. Desde hace algún tiempo se ha venido estudiando la incorporación en productos alimenticios, de materias primas no convencionales, provenientes de raíces y tubérculos de origen local, que sean de importancia comercial y nutricional (Rached y col., 2006). Ejemplos de fuentes no convencionales de almidones serían el apio, el mapuey y el ocumo chino. Diversos estudios se han realizado sobre la composición química y/o estructura de los gránulos de estos almidones (Marcano, 1975; Pérez y col., 1999; Rached y col., 2006; Huang y col., 2007; Palomino y col., 2010; Pérez y col., 2011; Pérez y col., 2012; Tapia y col., 2012).

Existe un alto potencial para el uso comercial y lucrativo de los almidones y las harinas elaborados de raíces y tubérculos; sin embargo, es necesario realizar una mayor investigación de sus propiedades funcionales y desarrollar nuevos tipos de productos para explotarlos apropiadamente (Pérez y col., 2005). Tomando esto en consideración, una utilidad de estos almidones sería su utilización como material polimérico de películas y coberturas comestibles (Hernández, 2006).

2.5. Digestibilidad de almidones

La biodisponibilidad de un nutriente, como el almidón, se refiere a la proporción de ese nutriente para ser digerido o fermentado, absorbido, utilizado y/o almacenado en el organismo. En el sistema metabólico humano, los nutrientes provienen directamente de los alimentos por ende los mismos se obtienen luego del tránsito del alimento por el tracto gastrointestinal. Durante dicho tránsito, los nutrientes son transformados y absorbidos;

debido a lo cual la digestibilidad es un parámetro que puede ser utilizado para realizar la cuantificación de la biodisponibilidad de los nutrientes.

La digestibilidad es una medida de la susceptibilidad de un alimento al ataque enzimático en el tracto gastrointestinal y se puede determinar este parámetro cuantitativo para saber cuan biodisponible es un nutriente; tal es el caso para los almidones y productos que los contienen (Tovar, 1992; Biró, 2006). La velocidad de hidrólisis del almidón y su digestibilidad se ven afectadas por diversos factores. Estos pueden ser de naturaleza intrínseca o extrínseca al almidón. Algunos de ellos son: el tamaño molecular del gránulo, el patrón de cristalinidad del polímero, la relación amilosa amilopectina, el grado de gelatinización y de retrogradación, la inaccesibilidad física, el procesamiento de los alimentos, la presencia de compuestos inhibidores de la actividad α -amilolítica, así como la concentración de α -amilasa salival y pancreática disponible (Tovar, 1992).

El primer paso en la digestión de los carbohidratos, es la masticación de los alimentos. Durante esta fase, los gránulos de almidón se rompen y se reduce el tamaño de sus partículas (Szepesi, 1991), aumentando la superficie de exposición a las enzimas amilolíticas. La α -amilasa salival cataliza la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1,4)$ de las cadenas de amilosa y amilopectina. Sin embargo, el pH óptimo de esta enzima es de 6,7 y su acción es eventualmente inhibida por el jugo gástrico ácido luego del ingreso del bolo alimenticio al estómago (Ganong, 2003). De esta manera, la hidrólisis se retrasa o detiene en el estómago y vuelve a iniciarse en el duodeno (región proximal del intestino delgado), adonde llega la α -amilasa secretada por el páncreas (α -amilasa pancreática) (Szepesi, 1991). Ambas α -amilasas hidrolizan las uniones $\alpha(1,4)$, pero no las uniones $\alpha(1,6)$ ni las uniones $\alpha(1,4)$ adyacentes a los puntos de ramificación (Ganong, 2003). En consecuencia,

la acción acumulativa de ambas α -amilasas son oligosacáridos: el disacárido maltosa, el trisacárido maltotriosa y algunos polímeros de glucosa ligeramente mas grandes con uniones $\alpha(1,4)$; así como α -dextrinas o dextrinas límite, que son polímeros de glucosa con enlaces $\alpha(1,4)$ (entre 3–5 unidades) con una unidad de glucosa con uniones $\alpha(1,6)$ (Ganong, 2003).

Las enzimas que completan la hidrólisis de los productos de la digestión del almidón y los principales disacáridos de la dieta (sacarosa y lactosa) se encuentran en el borde en cepillo de las membranas celulares de los enterocitos o células de la mucosa intestinal. La acción catalítica de las disacaridasas y oligosacaridasas produce glucosa libre que es transportada activamente al interior de los enterocitos y desde allí al sistema circulatorio (Tovar, 1992; 1994).

El almidón ha sido clasificado nutricionalmente por Englyst y col. (1992) en tres tipos: almidón rápidamente digerible, almidón lentamente digerible y almidón resistente. El almidón resistente es uno de los factores de mayor influencia sobre la digestión del almidón (Hernández, 2006). El mismo se define como “el almidón y los productos de su degradación que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sano” (Asp, 1992). Tres consideraciones importantes están ligadas a esta definición fisiológica. Primero, el almidón resistente no está compuesto únicamente por polímeros de alto peso molecular, sino que también incluye a dextrinas, pequeños oligosacáridos e incluso glucosa, todos derivados de almidón digerido que escapa a la absorción. En segundo lugar, el almidón resistente llega hasta el intestino grueso donde es metabolizado por la microbiota del colon (fermentación). Finalmente, la cantidad actual de almidón resistente

en una comida (la cantidad que alcanza el colon) depende de la fisiología del individuo y puede ser afectada por la edad (Laurentin y Edwards, 2013).

Algunas propiedades físicas del almidón hacen que una parte de él resista a la digestión en el intestino delgado y pase al colon para ser fermentado. Existen múltiples factores que inciden en la cantidad de almidón resistente que puede contener un alimento. Entre ellos puede mencionarse: fuente botánica del almidón, el grado de gelatinización, la proporción amilosa amilopectina, así como la aplicación de refrigeración luego de procesos térmicos, entre otros (Tovar, 1994; Goñi y col., 1996).

El almidón resistente ha sido clasificado en tres grupos: almidón físicamente inaccesible (AR1), gránulos resistentes (AR2) y almidón retrogradado (AR3). Actualmente se habla de un cuarto tipo de almidón resistente (AR4) en el cual se incluyen almidones modificados química (Sajilata y col., 2006; Fuentes-Zaragoza y col., 2010) y físicamente (Laurentin y Edwards, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón.

Tipo de almidón	Ejemplo de alimentos que lo contienen
Rápidamente digerible	Alimentos amiláceos recién cocinados
Lentamente digerible	La mayoría de los cereales crudos; pastas
Resistente (AR):	
Tipo 1. Físicamente inaccesible (AR1)	Granos y semillas parcialmente molidas; pasta
Tipo 2. Gránulo resistente (AR2)	Plátanos y cambures verdes, papas crudas, almidón de maíz rico en amilosa
Tipo 3. Almidón retrogradado (AR3)	Papas cocinadas y enfriadas, pan y algunos cereales comerciales
Tipo 4. Almidón con enlaces no amiláceos (AR4)	Alimentos que contienen almidones modificados mediante tratamientos químicos y algunos tratamientos físicos drásticos

Modificado de Englyst y col., 1992 y Laurentin y Edwards, 2013.

El AR1 posee gránulos amiláceos que se hallan físicamente encerrados dentro de las paredes celulares intactas que impiden el acceso de las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal (físicamente inaccesibles). Se encuentra particularmente en semillas de leguminosas y granos parcialmente molidos. El contenido de AR1 se modifica según el grado de procesamiento del alimento (por ejemplo, la molienda) y durante el proceso de masticación (Laurentin y Edwards, 2013).

El AR2 presenta algunos gránulos de almidón que permanecen resistentes a la acción de la amilasa, probablemente debido a las características intrínsecas del gránulo (tamaño y forma, proporción amilosa amilopectina, relación del material cristalino y amorfo, arquitectura supramolecular del almidón y la formación de complejos con otros componentes como grasa y proteína) (Laurentin y Edwards, 2013). Se cree que ciertas combinaciones de estos factores hacen que unos gránulos sean más resistentes al ataque de enzimas digestivas que otros (Englyst y col., 1992; Laurentin y Edwards, 2013). El AR2 se encuentra, por ejemplo, en el plátano verde, en la papa cruda y en los almidones con un elevado contenido de amilosa (Laurentin y Edwards, 2013).

El AR3 es el almidón resistente más abundante en los alimentos (Laurentin y Edwards, 2013), ya que éste se forma en la mayor parte de los procesos industriales y culinarios a los que se somete el alimento antes de ser ingerido (Mataix, 2009). Se produce por el procesamiento ordinario de los alimentos al cocinarlos y dejarlos enfriar. La producción de AR3 está afectada por la proporción amilosa amilopectina del gránulo, la cantidad de agua y la temperatura durante la cocción y el número de ciclos de cocción-enfriamiento (Englyst y col., 1992; Tovar y Melito, 1996; Laurentin y Edwards, 2013). El AR3 comprende fundamentalmente a la amilosa retrogradada, que a menudo se

produce durante el procesamiento del alimento (Englyst y col., 1992). Por lo que, está presente en panes, cereales de desayuno procesados, alimentos cocinados y enfriados (papas, pastas y arroz) (Laurentin y Edwards, 2013).

El AR4 es producto de la modificación de la estructura química de los polímeros de almidón. Se puede formar por modificación química (derivatización, entrecruzamiento) o modificación física realizadas a alta temperatura y baja humedad (pirodextrinación, extrusión, secado en tambor) (Laurentin y col., 2003; Laurentin, 2004). Laurentin y Edwards (2013) han propuesto el nombre de almidón con enlaces no amiláceos para esta categoría (Tabla 1). También es conocido que las interacciones amilosa-lípidos pueden producir fracciones resistentes a la digestión (Holm y col., 1983; Laurentin, 1999; Tovar y col., 1999a; Laurentin y col., 2003).

El almidón resistente (al igual que los oligosacáridos) es actualmente considerado como un componente de la fibra alimentaria (AACC, 2001) y la principal propiedad nutricional proviene de su fermentación en el colon, por la acción de la microbiota del intestino grueso, como ocurre con los polisacáridos no amiláceos y la lignina (Laurentin y Edwards, 2013). El grado y la velocidad de la fermentación dependen del tipo de fibra, de la forma física o del medio (por ejemplo, si se encuentra como parte de un alimento o en forma aislada y el tamaño de las partículas), así como de la microbiota presente en el hospedador (Gallaher y Schneeman, 2003). La fermentación lleva a que aumente la masa microbiana en el intestino grueso y a la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente acetato, propionato y butirato; así como, los gases hidrógeno, dióxido de carbono y, en algunos casos, metano (Gallaher y Schneeman, 2003; Laurentin y Edwards, 2013). Los gases producidos pueden ser metabolizados por algunas bacterias, ser

absorbidos por los colonocitos y/o ser excretados, ya sea en el aliento o por vía rectal (flatulencia) (Gallaher y Schneeman, 2003; Mann, 2003).

Los ácidos grasos de cadena corta son responsables del pH ácido presente en el intestino grueso (5,5–6,6), lo que intensifica la absorción de sodio y agua, y facilita la instauración de una microbiota beneficiosa (preferente bífida) en detrimento de las patógenas. Además, el 90–95% de estos ácidos grasos son absorbidos por los colonocitos, lo que determina los siguientes efectos: 1) aumenta la proliferación de estas células; 2) incrementa la producción de energía metabólica e 3) intensifican el flujo sanguíneo colónico (Mataix, 2009).

Los efectos de los ácidos grasos de cadena corta, sumados a los efectos intrínsecos de la menor digestibilidad del almidón resistente, han llevado a que alimentos con altos contenidos de estas fracciones sean considerados como alimentos funcionales (Niba, 2002). Un alimento puede considerarse como “funcional” si se demuestra que puede afectar beneficiosamente una o más funciones del cuerpo, más allá de los efectos claramente atribuidos a los nutrientes que contienen, de tal manera, que promueva el bienestar y la salud o reduzca el riesgo a padecer ciertas enfermedades (Roberfroid, 2002). En la actualidad, el almidón resistente es utilizado por la industria alimentaria como un ingrediente en la formulación de este tipo de alimentos, especialmente indicados para promover una óptima funcionalidad gastrointestinal (Mataix, 2009).

2.6. Estudios de digestibilidad *in vitro* en películas comestibles a base de almidón

La caracterización de la digestibilidad *in vitro* se realiza mediante análisis químico-enzimáticos, que simulan las condiciones *in vivo*, y está basada en la estimación

del contenido de almidón disponible y de almidón resistente en la muestra. Además, se realiza la determinación de la tasa a la cual la enzima amilolítica ejerce su función sobre el gránulo de almidón (Englyst y col., 1992; Tovar y col., 2003; Tovar y col., 2005).

Hernández y col. (2008) evaluaron la influencia de la producción de las películas comestibles sobre la digestibilidad *in vitro* del almidón aislado de cuatro fuentes botánicas (maíz, papa, plátano y sagú), prestando especial atención al efecto de la incorporación del glicerol como agente plastificante. Estos investigadores encontraron una tasa de amilólisis menor para las películas elaboradas con glicerol (excepto papa la película de almidón de plátano), lo que sugiere que este agente plastificante afecta la cinética de la digestión del almidón. Esto podría promover una moderada respuesta glucémica *in vivo*, parámetro importante a ser considerado en el manejo dietético de la diabetes (Björck y col., 1994).

Los estudios realizados hasta ahora indican que la elaboración de películas comestibles a base de almidón tiene una marcada influencia sobre los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* del carbohidrato (Lovera y col., 2012). En términos generales, los cambios en la biodisponibilidad se evidencian por el descenso del tenor de la fracción granular resistente a la digestión, el incremento en el contenido de las fracciones retrogradadas resistentes y un marcado incremento en la velocidad de hidrólisis enzimática de las porciones digeribles del biopolímero. Al igual que en otros procesos de modificación del almidón, la magnitud del efecto de la formación de películas comestibles sobre la biodisponibilidad depende en gran parte del origen botánico del polisacárido (Lovera y col., 2012).

2.7. Bioensayo del gorgojo de arroz

El uso de modelos animales en estudios nutricionales se justifica ya que todos los animales utilizan en general los mismos nutrientes y poseen enzimas digestivas similares (Lovera, 2008). El gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae* L., ha sido utilizado para evaluar la presencia de factores tóxicos en alimentos (Szwarcbort, 1980; Carmona y col., 1998; Gamero, 2009) 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).

En este tipo de análisis se evalúan diferentes parámetros (biomarcadores) que son reflejo de las interacciones metabólicas que ocurren en el organismo, según sea la biodisponibilidad del almidón en el alimento (Martín, 2010). Entre los biomarcadores utilizados se encuentran: supervivencia, variación de peso, composición corporal, excreción de ácido úrico y la actividad similar a la α -amilasa. Algunos de estos parámetros han resultado ser buenos biomarcadores para clasificar a los almidones de acuerdo a su calidad nutricional. Por ejemplo, los almidones de buena calidad nutricional son más digeribles y como consecuencia la actividad similar a la α -amilasa y la excreción de ácido úrico disminuyen.

El bioensayo con el gorgojo de arroz constituye una herramienta expedita para la realización de estudios nutricionales en alimentos y la evaluación del efecto de

ingredientes funcionales añadidos a biopelículas (Laurentin y col., 2008). En el cambiante mundo de la ciencia, nutrición y tecnología de alimentos, este modelo podrá utilizarse para determinar las complejas interrelaciones que determinan la biodisponibilidad de los nutrientes (Laurentin y col., 2008).

Existen pocos estudios en donde se evalúa la digestibilidad *in vivo* de las películas comestibles. Rojas (2007) determinó la toxicidad de películas comestibles a base de almidón de papa, alginato y goma gelano. Encontró que los insectos alimentados con la película de almidón de papa presentaban una supervivencia y una variación de peso comparables a la condición alimentada con arvejas verdes peladas, a diferencia de aquellas a base de goma gelano y de alginato, que resultaron ser tóxicas y ocasionaron la muerte de la población de insectos en pocos días. Ortiz (2010) también reportó resultados similares con películas de almidón de plátano, batata y yuca. Estos resultados demuestran que las películas formuladas a base de almidón pueden ser ingeridas sin generar toxicidad, de allí su importancia como preparaciones comestibles que pudieran servir de vehículo para la incorporación de ingredientes funcionales.

En este trabajo se planteó formular películas comestibles a base de distintas fuentes de almidón, y combinar el estudio fisicoquímico, morfológico, propiedades mecánicas, de barrera y nutricionales de las películas, para obtener una caracterización más completa de estas formulaciones, con el objeto de ampliar los posibles usos tecnológicos e incrementar el valor nutritivo de estas presentaciones, y con ello, los efectos fisiológicos beneficiosos sobre la salud del consumidor.

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar física, química y nutricionalmente a las películas comestibles a base de almidón aislado de siete fuentes botánicas [cereal: maíz y maíz *waxy* (*Zea mays* L.), tubérculos radicales: mapuey (*Dioscorea trifida* L.), yuca (*Manihot sculenta* Crantz) y apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), y tubérculos caulinares: ocumo chino (*Colocasia esculenta* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.)].

Objetivos específicos

1. Aislar el almidón a partir de las diferentes fuentes botánicas.
2. Determinar la composición proximal, el grado de pureza y la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de los almidones aislados, como materia prima para la formulación de las películas comestibles.
3. Formular las películas comestibles a partir de los almidones aislados, utilizando glicerol como agente plastificante y agua como agente dispersante.
4. Evaluar las características físicas, químicas, mecánicas, morfológicas y las propiedades de barrera de las películas comestibles formuladas.
5. Caracterizar nutricionalmente las películas comestibles formuladas, mediante el estudio de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*.

IV. Materiales y Métodos

4.1. Materia prima

Las fuentes vegetales utilizadas para la extracción de los almidones fueron adquiridas en los mercados locales. Se utilizaron almidones provenientes de: a) cereales, como el de maíz regular y el maíz *waxy* (*Zea mays* L.), b) tubérculos radicales, como el de mapuey (*Dioscorea trifida* L., variedad blanca), yuca (*Manihot sculenta* Crantz) y apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) y c) tubérculos caulinareos, como el de ocumo chino (*Colocasia esculenta* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). Los almidones de maíz, maíz *waxy* y yuca de Industrias del maíz, C.A. (La Encrucijada-Turmero, Aragua), así como los almidones de mapuey y de ocumo chino, fueron donados por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Dra. Mercedes Beragaño de Mosqueda”, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

4.2. Extracción y purificación del almidón

Los almidones fueron aislados de la parte comestible de cada uno de los tubérculos, según una modificación de la metodología descrita por Pérez y col. (1993), para la obtención del almidón de amaranto. Los tubérculos se lavaron, pelaron y trocearon, y la parte comestible fue colocada en bolsas plásticas de sello hermético con agua destilada y llevadas a congelación por 16 horas aproximadamente. Luego de descongelar la pulpa, ésta fue licuada con agua destilada en una licuadora industrial (marca Mertvisa Mod: LQ4, 30129 de 10 L de capacidad). Con la ayuda de mallas de muselina, la mezcla obtenida fue tamizada para obtener la lechada (constituida por almidón y agua) y el residuo de la pulpa. Este último, fue lavado con agua destilada (3 veces) para asegurar una completa extracción

del almidón. Por su parte, la lechada obtenida se centrifugó (centrifuga marca DAMON/IEC-División Modelo CRV-5000) a 900 g por 10 min y el sobrenadante descartado. Se repitió el paso de centrifugación, haciendo lavados con agua destilada hasta no observar ninguna capa oscura en la parte superior del sedimento (usualmente, 3 lavados). El precipitado obtenido (almidón) por este procedimiento, fue trasvasado a una bandeja de aluminio para ser secado en un deshidratador de bandeja (MITCHELL, modelo 645159, EE.UU.) por 18 horas a 45 °C. Finalmente, el almidón seco fue molido en una pica todo marca Oster (Caracas) y luego tamizado usando un tamiz Tyler con tamaño de malla de 60 mesh, para así obtener el almidón nativo. El almidón extraído fue colocado en bolsas plásticas selladas herméticamente, para su posterior análisis.

4.3. Composición proximal de los almidones extraídos

Usando la técnica descrita por la AACC (2003), se determinó el contenido de agua (N° 44-15A), de cenizas (N° 08-17) y de proteína cruda (N° 46-13). El contenido de grasa se determinó usando la técnica descrita por Schoch (1964). La pureza de los almidones fue calculada según Pérez (1994).

4.4. Películas comestibles a base de almidón

Para la formulación de las películas comestibles se utilizó como matriz polimérica los siguientes almidones: maíz, maíz *waxy*, mapuey, yuca, apio, ocumo chino y papa. Se empleó el glicerol de grado comestible como agente plastificante y el agua destilada como agente dispersante. La formulación de las películas y su caracterización fisicoquímica, mecánica y propiedades de barrera fue realizada en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías,

del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

4.4.1. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones

Distintas combinaciones entre el almidón (3, 5 ó 6% p/v) y el agente plastificante (1,5 ó 2% v/v) fueron utilizadas para la preparación de las películas comestibles, a fin de seleccionar la formulación adecuada basada en los siguientes aspectos cualitativos señalados por Ortiz (2010): 1) manejabilidad (facilidad de la película de ser despegada de la cápsula sin romperse), 2) flexibilidad, 3) elasticidad y 4) mejor apariencia y consistencia.

4.4.2. Preparación de la solución formadora de película

La solución formadora de película (SFP) fue preparada mezclando el almidón con agua destilada. Esta mezcla fue calentada lentamente hasta ebullición con agitación constante por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente se adicionó el agente plastificante en la concentración correspondiente. Seguidamente, la mezcla fue dispersada con un homogeneizador Ultra-Turrax (T 25 basic, Ika[®] Werke, EE.UU.) a 18.000 r.p.m durante tres minutos (según modificación del método de Romero-Bastidas, 2005). La SFP obtenida (8 mL) se vertió en placas de Petri de polietileno de 5,5 cm de diámetro, las cuales fueron secadas a 50 ± 2 °C en estufa por 24 horas. Después del proceso de secado, las películas deben mantenerse sin grietas y ser fácilmente desprendidas de la placa, sin ruptura o resquebrajamiento durante el proceso. Finalmente, las películas fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas herméticamente cerradas, para luego

proceder a su caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera, así como su caracterización nutricional.

Para las pruebas de digestibilidad *in vitro*, las películas fueron sometidas a un segundo proceso de secado, en este caso, a 60 °C durante 16 horas. Posteriormente, se trituraron en un molino (Ika®-Labortechnik, Alemania) y fueron almacenadas en bolsas plásticas herméticamente cerradas en un desecador con sílica gel activa, hasta el momento de su utilización.

4.4.3. Caracterización de las películas comestibles

Determinación del grosor

El grosor de las películas se midió con un micrómetro digital (Electronic Digital Micrometer), con una escala de calibración de 0–25 mm y de 0,001 mm de precisión. Para ello se tomaron 5 medidas en diferentes posiciones seleccionadas al azar en cada película (por triplicado) y se obtuvo un promedio de ellas.

Determinación de la actividad de agua

La actividad de agua se estimó por triplicado, empleando un equipo psicrométrico Aqualab CX-2 (Decagon, Pullman, Washington, EE.UU.) previamente calibrado con agua destilada a 25 °C, de acuerdo lo descrito por Roa y Tapia de Daza (1991).

Determinación de la permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimétricamente a 25 °C, utilizando una modificación del método estándar de la ASTM, método E96-93 (ASTM,

1995). Se tomaron tres películas de cada formulación y se colocaron sobre cápsulas de metilmetacrilato de 3 cm de diámetro interno, 4,5 cm de diámetro externo y 2 cm de profundidad. El diámetro de las películas debe ser ligeramente mayor que el diámetro de la cápsula. Seguidamente, se colocó sobre la película una tapa hueca tipo anillo, que se ajustó a presión mediante una goma tipo O-ring, tensando la película sobre la cápsula de acuerdo al diseño descrito por Kaya y Kaya (2000). Las cápsulas fueron llenadas con 5 mL de agua destilada dejando un espacio de aire de 1 cm entre la película y el agua. El sistema formado por las cápsulas, el agua y las películas fue colocado en desecadores sellados herméticamente, que contenían en el fondo una solución saturada de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Panreac Química S.A., Barcelona, España) que genera 33,3% de humedad relativa a 25 °C. El peso de las cápsulas con su contenido fue registrado a intervalos de 1 hora durante seis horas. Estos datos se utilizaron para graficar la variación de peso de la cápsula en función del tiempo. La transferencia del vapor de agua a través de las películas (m_1 , pendiente de la curva de pérdida de peso vs. tiempo) fue estimada por análisis de regresión realizado con el programa Microsoft® Office Excel (2010). Las velocidades de transmisión de vapor de agua (VTVA) a través de las películas en estudio, se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por Kaya y Kaya (2000) y Chinnan y Park (1995), usando las siguientes fórmulas:

$$VTVA = \frac{\text{pendiente de la recta}}{\text{área expuesta de la película}} = g/cm^2 \cdot s$$

$$PVA = L \times VTVA (p_i - p_a)$$

Donde p_a es la presión externa de la cápsula y es igual a 1,046 kPa; p_i es la presión interna de la cápsula y es igual a 3,17 kPa (Tapia y col., 2007); y L es el grosor promedio de la película (m). La PVA se expresó como $\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$.

Solubilidad en agua

La solubilidad en agua (SA) de las películas fue determinada de acuerdo al método de Gontard y col. (1992) y Rhim (2004). Se escogieron al azar seis muestras de cada tipo de película; tres de ellas fueron secadas a 105 °C por 24 horas para obtener la materia seca inicial. Las otras tres muestras se colocaron individualmente en vasos de precipitado de 50 mL con 30 mL de agua destilada; los vasos de precipitado se sellaron con parafilm y fueron colocados a temperatura ambiente por 24 horas, agitando ocasionalmente. La solución con la película fue filtrada por pliegues utilizando un embudo tallo corto y un papel de filtro Whatman N° 1 (previamente tarado). El papel de filtro con la película se lavó suavemente con agua destilada y luego fue colocado en una estufa a 105 °C por 24 horas para determinar finalmente la materia seca remanente (no solubilizada). La siguiente fórmula se utilizó para determinar la SA:

$$SA = \frac{(S_o - S)}{S_o} = \frac{\text{sólidos solubles (g)}}{\text{sólidos totales (g)}}$$

Donde S_o es la materia seca inicial (sólidos totales) y S es la materia seca final (no solubilizada).

Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (RA) se determinó de acuerdo a Lee y col. (2004) y Rhim (2004). Para ello, muestras de películas pre-pesadas (por triplicado) fueron sumergidas en agua destilada a 25 °C por 10 minutos, secadas suavemente con papel absorbente por 1 min de manera de remover el agua superficial, para finalmente determinar el peso final de las muestras hinchadas. La siguiente fórmula se utilizó para determinar la RA:

$$RA = \frac{A}{S_o} = \frac{\text{agua ganada (g)}}{\text{sólidos totales (g)}}$$

Determinación de color

La determinación del color se realizó por triplicado, mediante el método de Giese (1995), utilizando un colorímetro triestímulo Colorflex (marca HunterLab modelo 45°/0°; Reston-VA, EE.UU), empleando el software Color Universal Cielab. Se empleó un iluminante D65 y un observador 10°. El aparato fue calibrado con un prisma blanco ($a^* = -0,81$; $b^* = 1,58$; $L^* = 93,54$). Los parámetros medidos fueron los siguientes:

L^* : Índice de claridad y luminosidad (blanco 100% y negro 0%)

a^* : Matiz, indica la longitud de onda predominante [rojo (+) y verde (-)]

b^* : Intensidad del color [amarillo (+) y azul (-)]

El cambio total del color (ΔE) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

El índice de blanco (IB), el cual representa la blancura total de la muestra, se calculó de acuerdo a la ecuación usada por Chin-Lin y col., (2003):

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Determinación del pH

El pH se midió por triplicado en cada SFP preparada, utilizando un potenciómetro (pHmetro) digital (Modelo Hanna) calibrado con soluciones buffer a pH 4,0 y pH 7,0.

Determinación de la prueba de punción

La resistencia de la película a la punción y deformación fue determinada con un texturómetro (Stable Micro Systems TA-XT2i, Surrey, Reino Unido). Muestras de cada película fueron montadas sobre cápsulas de metilmetacrilato (por triplicado), actuando como soporte. Se utilizó una sonda cilíndrica lisa (0,8 cm), que se hizo mover perpendicularmente a una velocidad de 1 mm/seg hasta romper la película (ensayo de una sola compresión). La curva de la fuerza de deformación de la película, fue procesada con el software del equipo para determinar los siguientes parámetros: dureza, fracturabilidad, adhesividad y elasticidad.

Microscopia electrónica de barrido

El estudio morfológico de la superficie de las películas comestibles, fue evaluado con un microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras fueron sometidas a secado en punto crítico y luego cortadas con una tijera. Las secciones obtenidas fueron montadas en soportes de aluminio con cinta adhesiva para colocarle recubrimiento metálico con

oro-paladio (400 kV), para su posterior análisis en el MEB (Hitachi, S-2400, 1992) del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales de la Universidad Central de Venezuela; utilizando un voltaje de 7,0 kV.

4.5. Determinación de la digestibilidad *in vitro* de los almidones y las películas comestibles

La caracterización de la digestibilidad *in vitro* de los almidones y las películas comestibles a base de almidón se realizó mediante la determinación del contenido de almidón disponible, el almidón resistente total y la tasa de hidrólisis enzimática del almidón. Previo a cada análisis enzimático-colorimétrico, las muestras de las películas de almidón previamente deshidratadas y trituradas (ver sección 4.4.2), fueron homogeneizadas en el solvente correspondiente (ver más adelante) con un homogeneizador Ultra-Turrax (Trekmar®, Alemania) aplicando 3 pulsos de 1 minuto cada uno (Tovar y col., 1990).

Determinación del contenido de almidón disponible

Para la determinación del contenido de almidón disponible se siguió la metodología enzimática/colorimétrica propuesta por Holm y col. (1986). Este método permite estimar el contenido de almidón potencialmente disponible al ataque amilolítico en un alimento. De manera general, se efectúa la dispersión del almidón en agua hirviente, lo cual excluye la solubilización de fracciones que han sufrido retrogradación firme. A continuación se procede a hidrolizar el polisacárido en forma consecutiva con Termamyl® y amiloglucosidasa. Finalmente, se determina por colorimetría la glucosa liberada (Trinder, 1969) y se calcula la cantidad equivalente de almidón que produjo.

La homogeneización de las películas se llevó a cabo en tubos de ensayos (124 x 13mm) utilizando 500 mg de materia seca en 10 mL de agua destilada y empleando un homogeneizador Ultra-Turrax como fue descrito anteriormente. Terminada la homogeneización se transfirió el material a vasos de precipitado de 100 mL y se completó el volumen a 20 mL, también con agua destilada. En el caso de las muestras de almidón, se dispersaron 500 mg de materia seca con agitación magnética directamente en 20 mL de agua destilada, por un tiempo de 5–10 min. Luego de la dispersión de las muestras se ajustó el pH de la solución entre 6 y 7.

El procedimiento descrito a continuación se realizó por igual tanto para los almidones como para las películas comestibles. Un volumen de 100 μ L de la α -amilasa bacteriana termoestable Termamyl[®] 120L (Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) fue agregado a cada vaso de precipitado, para luego incubar la suspensión en un baño de María en ebullición durante 20 minutos, con agitación magnética cada 5 minutos. Las suspensiones obtenidas se dejaron enfriar con agitación constante hasta alcanzar temperatura ambiente. Después del enfriamiento, cada una de las suspensiones fueron transferidas a un balón aforado de 100 mL (primera dilución). Previamente, se preparó una solución 0,5 g/L de amilogucosidasa de *Rhizopus sp* (A-7255: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.); suspendiendo 0,5 mg de la enzima liofilizada en 1 mL de buffer acetato de sodio 0,1 mol/L pH 4,75. Esta solución se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa (Clay-Adams) a temperatura ambiente. Del sobrenadante de dicha centrifugación se tomó 1 mL y se agregó en tubos de ensayo junto con 500 μ L de la preparación diluida de las muestras predigeridas. Esta mezcla se incubó en un baño de María con agitación a 40 °C durante 1 hora. Luego, la solución fue

transferida a un balón aforado de 10 mL, completando el volumen con agua destilada (segunda dilución). Para estimar la cantidad de glucosa liberada, de esta dilución se tomó 50 μL y se transfirió a tubos de ensayo junto con 1 mL de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa (Industrias Invelab[®], Caracas), incubándose durante 10 minutos a 37 °C.

El fundamento del método de Trinder (1969) para la cuantificación de glucosa se basa en la oxidación enzimática de la glucosa por la acción catalítica de la glucosa oxidasa, los productos de dicha catálisis son: ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); a su vez el H_2O_2 oxida al cromógeno 4-aminoantipiridina en una reacción catalizada por la peroxidasa. Esta última reacción produce una coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente en el sistema. Con el fin de determinar la concentración de glucosa en cada una de las muestras, se realizó una curva de calibración con 0, 10, 20 y 30 μg de glucosa, a partir de una solución patrón de glucosa de 1 g/L, con un volumen final de 50 μL por tubo, a los cuales se les agregó igualmente 1 mL del reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa, seguido de la incubación bajo las mismas condiciones. Luego de la incubación se determinó la absorbancia a 510 nm a cada muestra y punto de la curva de calibración. La ecuación de la recta de la curva promedio para la determinación de glucosa fue: $y = 0,0309x + 0,000$ ($R^2 = 0,999$; $n = 13$). Tanto los almidones como las películas se analizaron por triplicado y en cada una de las determinaciones realizadas se utilizó almidón de papa (Lyckeby Stärkelsen, Suecia) como control de calidad del método.

El porcentaje de almidón disponible se calculó con la siguiente fórmula:

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

donde:

- (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.

Determinación del contenido de almidón resistente total

Se siguió la metodología propuesta por Goñi y col. (1996). El mismo se fundamenta en la estimación del contenido de almidón resistente total, que es la suma del almidón físicamente inaccesible (AR1), el material resistente de gránulos nativos no digeribles (AR2), el almidón resistente debido a retrogradación (AR3) y los complejos de almidón con otros componentes (Tovar, 2001a). El método se basa en la hidrólisis consecutiva de las muestras con pepsina y α -amilasa pancreática para obtener el material indigerible insoluble. Este es luego tratado con KOH y amiloglucosidasa, tras lo cual se realiza la cuantificación de la glucosa liberada.

La homogeneización de las películas se llevó a cabo con 100 mg de materia seca en 10 mL de buffer KCl-HCl 0,2 mol/L pH 1,5, en tubos de centrifuga Córex de 30 mL y empleando un homogeneizador Ultra-Turrax como ya fue descrito. En el caso de los almidones, la dispersión de los 100 mg de materia seca se realizó con agitación magnética

directamente en 10 mL de buffer KCl-HCl 0,2 mol/L pH 1,5 contenidos en el tubo Córax de 30 mL. Seguidamente se ajustó el pH de la suspensión a $1,5 \pm 0,02$. A cada tubo se le agregó, 0,2 mL de una solución de pepsina 0,1 g/mL (P-7000: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) y se incubó en un baño de María a 40 °C en agitación constante durante 60 minutos y con agitación manual cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se estabilizaron las muestras a temperatura ambiente y a la suspensión se le adicionó 9 mL de buffer 0,1 mol/L de Tris-maleato[®] (T-3128: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) pH 6,9 y se ajustó el pH a $6,9 \pm 0,02$ con soluciones de HCl y NaOH de concentraciones de 2 mol/L, 0,5 mol/L y 0,1 mol/L. Seguidamente, se agregó 1 mL de una solución de α -amilasa (tipo VI-B de páncreas de porcino A-3176: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (40 mg α -amilasa/mL de buffer Tris-maleato[®]) y se incubó durante 16 horas en un baño de María a 37 °C con agitación magnética constante a una velocidad de 200 r.p.m. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a $3.000 \times g$ (entre 0 y 5 °C) (Sorvall[®] RC-5B) y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido con agitación magnética y se realizó un lavado con 10 mL de agua destilada bajo las mismas condiciones de centrifugación. Al sedimento resultante se le adicionó 3 mL de agua destilada y 3 mL de KOH 4 mol/L recién preparado; manteniendo la suspensión en agitación vigorosa al momento de añadir la base. La agitación magnética se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 5,5 mL de HCl 2 mol/L y 3 mL de buffer acetato de sodio 0,4 mol/L pH 4,75 y se ajustó el pH a $4,75 \pm 0,02$. A continuación se adicionó 1 mL de la solución de amilogucosidasa de *Rhizopus sp* (A-7255: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (4,8 mg/mL) en buffer acetato 0,1 mol/L, pH 4,75 a cada tubo Córax y se incubó durante 1 hora a 40 °C con agitación magnética constante. Seguidamente se centrifugó la suspensión durante

15 minutos a $3.000 \times g$ (entre 0 y 5 °C) (Sorvall® RC-5B) y se colectó el sobrenadante en un balón aforado de volumen apropiado (usualmente 50 mL) dependiendo de la cantidad de glucosa liberada. El sedimento resultante fue resuspendido en 10 mL de agua destilada con agitación magnética (lavado) y se centrifugó nuevamente recolectando el sobrenadante en el mismo balón aforado y completando finalmente el volumen con agua destilada. De cada uno de los balones aforados se colocó una alícuota de 50 μ L en tubos de ensayo y se determinó la glucosa liberada, aplicando el método enzimático colorimétrico descrito.

Las muestras fueron analizadas por triplicado, utilizando como control de calidad Corn Flakes de Kellogg`s (Alimentos Kellogg`s, Maracay).

El porcentaje de almidón resistente total se determinó aplicando la siguiente fórmula:

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

donde:

- ^(a) Vf: Volumen final de la solución que contiene la glucosa liberada a partir del almidón resistente, en mililitros (usualmente 50 mL, para el almidón de mapuey y de papa se utilizó un Vf de 250 mL).
- ^(b) Corrección de glucosa a glucano.
- ^(c) Alícuota tomada para la cuantificación de la glucosa, en mililitros.
- ^(d) Conversión de microgramo a miligramo.

Determinación de la tasa de hidrólisis enzimática

La tasa de hidrólisis enzimática del almidón presente en las películas y los correspondientes almidones fue evaluada siguiendo la metodología propuesta por Holm y col. (1985). Este método se basa en la medición de la velocidad a la cual el almidón es hidrolizado a azúcares reductores por la acción catalítica de la α -amilasa pancreática

porcina. Este método permite la determinación de la tasa de hidrólisis *in vitro* del almidón de un alimento tal como se ingiere. El almidón es hidrolizado por la α -amilasa y se reduce a azúcares los cuales son reportados como equivalentes de maltosa determinados por un método químico-colorimétrico (Hostettler y col., 1951).

Para las muestras de las películas, se tomó la cantidad que contiene 500 mg de almidón disponible y se homogeneizaron en un Ultra-Turrax a razón de 3 pulsos de 1 minuto con 20 mL de buffer fosfato Na-K 44 mmol/L, pH 6,9 con NaCl 7 mmol/L, en tubos de centrifuga Córex de 30 mL. Luego se completó el volumen a 50 mL con 30 mL de buffer fosfato Na-K 44 mmol/L, pH 6,9 y la solución fue trasvasada a fioas de 125 mL. Para las muestras de los almidones, se realizó la dispersión de los 500 mg de almidón disponible con agitación magnética, directamente en 50 mL de buffer fosfato Na-K 44 mmol/L, pH 6,9 con NaCl 7 mmol/L, en fioas de 125 mL. El control de calidad del método y las muestras (almidones y películas), fueron incubados durante 20 minutos en un baño de María en ebullición con agitación cada 5 minutos a fin de promover la gelatinización total del almidón (muestras gelatinizadas). A otra réplica de las muestras se le determinó la velocidad de hidrólisis, omitiendo la gelatinización previa (muestras crudas). Seguidamente, las muestras se incubaron en un baño de María a 37 °C con agitación magnética constante (200 r.p.m). A continuación, se transfirió una alícuota de 0,2 mL a tubos de ensayo conteniendo 0,8 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico; este corresponde al tiempo cero de la reacción hidrolítica. Luego, al remanente de cada muestra en las fioas, se le adicionó 1 mL de solución de α -amilasa (tipo VI-B de páncreas bovino A-3176: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (4 mg/mL buffer fosfato Na-K 44mmol/L pH 6,9 con NaCl 7 mmol/L.). Transcurridos 5, 15, 30 y

60 minutos de la adición de la solución de α -amilasa se tomó una alícuota de 0,2 mL de cada muestra y se agregó en tubos conteniendo 0,8 mL de agua destilada 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). Completada la toma de las muestras; los tubos de ensayo para la reacción fueron incubados durante 10 minutos en un baño de agua a ebullición; seguida de una incubación de 2 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente, para el enfriamiento de las muestras. Posteriormente se añadió 15 mL de agua destilada, seguido de agitación por inversión. Con el fin de determinar los mg equivalentes de maltosa liberados de cada muestra por acción de la α -amilasa pancreática, se realizó una curva de calibración con 0, 0,25, 0,5, 1,0 y 2,0 mg de maltosa, a partir de una solución patrón de maltosa de 10 g/L, con un volumen final de 1 mL por tubo, a los cuales se le agregó igualmente 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico, seguido de incubación bajo las mismas condiciones. Luego de la incubación se determinó la absorbancia a 530 nm a cada muestra y punto de la curva de calibración. La ecuación de la recta de la curva promedio para la determinación de maltosa fue: $y = 0,3932x + 0,000$ ($R^2 = 0,999$; $n = 7$).

El porcentaje de hidrólisis *in vitro* a $t = 0, 5, 15, 30$ y 60 minutos se calculó aplicando la siguiente fórmula:

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

donde:

^(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.

Las muestras fueron analizadas por duplicado, utilizando como control de calidad el almidón de maíz (Alfonso Rivas C.A, Turmero).

4.6. Determinación de la digestibilidad *in vivo* de los almidones y las películas comestibles

La estimación de la digestibilidad *in vivo* de los almidones y las películas comestibles se llevó a cabo mediante la utilización del bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.); evaluándose diferentes biomarcadores como: supervivencia, variación de peso, excreción de ácido úrico y actividad similar a α -amilasa.

Preparación de las dietas de almidones y de películas comestibles

Los almidones se suministraron a los insectos bajo la forma de semillas artificiales, las cuales se prepararon según la metodología descrita por Martín (2010). Para ello, se pesaron 12 g de almidón y se añadió 10 mL agua, inicialmente; mezclándose la suspensión con una espátula. Luego, se continuó añadiendo una cantidad de agua variable hasta que obtener una suspensión con una consistencia semisólida. Posteriormente, se colocaron gotas de la suspensión sobre un papel encerado (2 gotas por semilla artificial), utilizando una jeringa de 10 mL, sin aguja. Por último, las semillas artificiales se dejaron secar en estufa a 37 °C por 24 horas. Por su parte, las películas comestibles formuladas (ver sección 4.4.2) fueron cortadas en tiras para ser suministradas a los insectos durante el bioensayo.

Mantenimiento del cultivo de gorgojos y bioensayo

Para el cultivo de los insectos, se colocaron 200 individuos en frascos de vidrio, con un tercio de su volumen ocupado por arvejas (aproximadamente 200 g) y se mantuvieron en oscuridad, tapados con una malla. A las dos semanas se retiraron los padres y luego de tres o cuatro semanas adicionales, emergió la F1.

El bioensayo se realizó según la metodología descrita por Martín (2010). Los insectos fueron seleccionados en función de su tamaño el día previo al comienzo del bioensayo (día -1), dejados en viales de plástico cerrados y mantenidos en ayuno hasta el día siguiente (día 0 del bioensayo), para garantizar que presentaran un peso promedio por individuo de $1,7 \pm 0,1$ mg. Se tomaron 30 individuos de la F1 y se colocaron en viales de vidrio con 2 g de la dieta correspondiente (semillas artificiales o películas comestibles). Además de los viales con las dietas a estudiar, se incluyó un control de calidad [condición de ayuno y condición alimentada (dieta de arvejas verdes)] y un almidón de referencia [semillas artificiales de almidón de maíz comercial (Maizina Americana®, Alfonso Rivas & Cia., C.A., Caracas)]. Cada dieta se realizó por triplicado.

Los insectos se mantuvieron en los viales durante 8 días. Durante este tiempo se midió el peso neto y la supervivencia de manera interdiaria; luego de haber retirado los individuos muertos. Al octavo día se congelaron los insectos supervivientes. Estos se destinaron a la extracción de proteínas para la evaluación de la actividad similar a α -amilasa. Los tres viales, conteniendo las excretas y restos del alimento, fueron utilizados para cuantificar la excreción del ácido úrico.

Determinación de la supervivencia y variación de peso

A partir de los datos interdiarios, se calcularon estos biomarcadores mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Número de insectos sobrevivientes al día "n"}}{\text{Número inicial de insectos}} \times 100$$

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

^(a) El *peso promedio al día "n"* es el peso total del grupo de insectos sobrevivientes al día "n", entre el número de sobrevivientes.

^(b) El *peso promedio inicial* es el peso total del grupo de insectos al día 0, entre el número de insectos seleccionados (30 insectos).

Determinación de la actividad similar a α -amilasa

La actividad similar a α -amilasa de los grupos de insectos alimentados con las diferentes dietas, se estimó según las condiciones descritas por Szwarcbort (1980) con modificaciones realizadas por Prazuela y Laurentin (comunicación personal, 2013).

Los grupos de insectos provenientes de cada vial, que sobrevivieron al final del bioensayo (día 8), fueron homogeneizados en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 10 golpes a 750 r.p.m. (usualmente un minuto); empleando un volumen apropiado de buffer acetato de sodio (50 mmol/L, pH 5 a 4 °C), en una relación buffer:insecto de 0,067 mL por cada insecto. Los extractos obtenidos fueron centrifugados en tubos Eppendorf a $16.000 \times g$ por 5 minutos y a los sobrenadantes se les determinó la actividad similar a α -amilasa. Para ello, se tomó una alícuota de 40 μ L de cada sobrenadante y se completó a 500 μ L con buffer acetato 50 mmol/L, pH 5. Posteriormente, se añadió 500 μ L de una solución al 5% de almidón soluble comercial (Fisher Scientific Inc., New Jersey,

EE.UU.), previamente gelatinizado en el mismo buffer. Esta solución fue preparada calentando la preparación en una plancha con agitación manual, hasta que la muestra se observara traslúcida (usualmente 15 min.). El coctel de reacción se incubó a 45 °C por 3 minutos; deteniéndose la reacción con 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico. La estimación de los azúcares reductores liberados se realizó mediante el método químico propuesto por Hostettler y col. (1951), tal y como se describió en la sección 4.5, en la determinación de la tasa de hidrólisis enzimática.

La actividad similar a α -amilasa (ASA) se expresó como los micromoles de equivalente de maltosa liberados por segundo y por litro del sobrenadante del extracto de insectos ($\mu\text{mol/s} \times \text{L}$) y se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

(a) Factor de conversión de mol a micromol.

(b) Factor de conversión de microlitro a litro.

(c) Factor de 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.

Determinación de la excreción de ácido úrico

La extracción del ácido úrico excretado por los insectos se realizó según la metodología descrita por González-Quilen (2013). El ácido úrico excretado por los insectos se extrajo y cuantificó a partir de las excretas adheridas a la superficie interna de los viales de vidrio y a los restos de 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 dependiendo del tipo de dieta. Para pulverizar los restos de arvejas verdes de la condición alimentada, estas fueron molidas en un molinillo eléctrico aplicando dos ciclos de 30 segundos y luego trituradas manualmente en el mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo (usualmente 2 minutos). Por su parte, las semillas artificiales se transfirieron directamente a un mortero para ser trituradas de manera manual. Finalmente, las películas comestibles fueron trasvasadas a cápsulas de aluminio para ser deshidratadas en la estufa a 100 °C por 3 horas continuas; luego, las películas deshidratadas fueron homogeneizadas en el molinillo (dos ciclos de 30 segundos cada uno), trituradas en el mortero durante 30 segundos y homogeneizadas nuevamente en el molinillo durante 30 segundos. Con este procedimiento, se logró obtener un material particulado para realizar la extracción del ácido úrico.

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. Seguidamente, se tapó el vial y se agitó la mezcla inmediatamente en un vórtex a velocidad máxima por 1 minuto. Con los restos de dieta de la mayoría de las películas comestibles (maíz *waxy*, yuca, ocumo chino y apio) y del almidón de apio, no se obtuvo un sobrenadante luego de agitar la mezcla. Por esta razón, se requirió repetir el procedimiento de extracción, empleando 1 mL de agua destilada en ebullición. Luego de la extracción, la suspensión obtenida se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 16.000 x g durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un segundo tubo

Eppendorf de 2 mL. 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 de la concentración 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: $y = 0,1533x - 0,002$ ($R^2 = 0,999$; $n = 5$).

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 es proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra analizada.

La concentración de ácido úrico (EAU) fue reportada 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 (partes por millón), según la siguiente ecuación:

$$\text{EAU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{Cantidad de ácido úrico} (\mu\text{g}) \times \text{Vf}^{(a)}}{0,025^{(b)} \times \text{Peso de los insectos sobrevivientes al día 8}(\text{mg})}$$

^(a) Vf: Volumen final de agua empleado para la extracción (usualmente 2 mL).

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

4.7. Análisis estadístico

Los cálculos y las regresiones lineales (coeficiente de determinación) de las curvas patrón se realizaron con Microsoft Office Excel[®] 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE.UU.). Los análisis de varianza (ANOVA de una vía), la prueba *a posteriori* de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) y las correlaciones simples, se realizaron mediante el programa estadístico Minitab[®] 16 de Minitab Inc. (State College, Pensilvania, EE.UU.). Se utilizó $\alpha = 0,05$ como nivel de significancia.

V. Financiamiento

Este trabajo estuvo enmarcado dentro del proyecto individual No. PG-03-8074-2011-1 (responsable Lic. Mighay Lovera), financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, por el proyecto individual PEII No. 2012000766 (responsable Dr. Alexander Laurentin) financiado por el Ministerio del Poder Popular de Ciencia, Tecnología e Innovación, a través de FONACIT y por el proyecto LOCTI-25, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, aporte al proyecto "Fortalecimiento al Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Centro de Biología Celular" por parte de la empresa Plásticos Eurobags, C.A. (Rif J-00272936-8), realizado en febrero del 2008.

VI. Resultados

La descripción de los resultados y la discusión de los mismos se presentará dividida en tres partes organizadas de la siguiente manera: (i) caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles, (ii) formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles y (iii) caracterización nutricional de las películas comestibles.

Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles

En la Tabla 2 se muestran los datos comparativos de la composición proximal de los almidones utilizados en este estudio. Se encontraron diferencias significativas en todos los renglones de la composición proximal así como en la pureza total de los almidones estudiados.

Los almidones de ocumo chino y mapuey presentaron el mayor contenido de humedad, seguido por los almidones de maíz (normal y ceroso) y de yuca, con contenidos de humedad intermedios y finalmente el almidón de papa y el de apio con un contenido de humedad menor ($p < 0,05$).

El mayor contenido de ceniza se encontró en el almidón de ocumo chino seguido del almidón de papa y de yuca. El resto de los almidones presentaron un contenido de cenizas menor ($p < 0,05$) que varió entre 0,08–0,16%.

Tabla 2. Composición proximal y pureza de los almidones.

Almidón	Humedad (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Pureza total (%)
Maíz	11,2 ± 0,5 ^b	0,16 ± 0,01 ^c	1,09 ± 0,06 ^a	0,13 ± 0,03 ^{b,c}	98,6 ± 0,1 ^d
Maíz waxy	11,2 ± 0,3 ^b	0,08 ± 0,01 ^e	0,60 ± 0,01 ^b	ND	99,3 ± 0,0 ^b
Mapuey	13,1 ± 0,1 ^a	0,15 ± 0,03 ^{c,d}	1,09 ± 0,19 ^a	0,18 ± 0,03 ^b	98,6 ± 0,2 ^d
Yuca*	10,4 ± 0,0 ^c	0,24 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,00 ₅ ^d	ND	99,7 ± 0,0 ^a
Apio	7,5 ± 0,3 ^e	0,12 ± 0,01 ^d	0,88 ± 0,10 ^a	0,08 ± 0,03 ^d	99,0 ± 0,0 ^c
Ocumo chino	13,1 ± 0,4 ^a	0,43 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,07 ^{b,c}	0,54 ± 0,10 ^a	98,6 ± 0,0 ^d
Papa	8,1 ± 0,4 ^d	0,28 ± 0,01 ^b	0,46 ± 0,13 ^c	0,11 ± 0,03 ^{c,d}	99,2 ± 0,1 ^{b,c}

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$) y están expresados en base seca, excepto la humedad. La pureza total fue calculada por sustracción del contenido de proteínas, grasa y cenizas de 100 g de muestra. El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). ND: no detectado.

*Los datos para el almidón de yuca fueron tomados con permiso de Caraballo (2011).

El contenido de grasa mostró diferencias entre los distintos almidones, obteniéndose los mayores valores en los almidones de maíz, mapuey y apio. Los almidones de maíz *waxy*, ocumo chino y papa presentaron un contenido de grasa intermedio, mientras que el almidón de yuca resultó ser el almidón con el contenido de grasa más bajo ($p < 0,05$) entre los almidones estudiados.

El mayor contenido de proteínas se encontró en el almidón de ocumo chino ($p < 0,05$). Los almidones de mapuey, maíz, papa y apio presentaron un contenido de proteína intermedio.

Tomando en consideración la composición química, especialmente su bajo contenido de proteínas y lípidos, todos los almidones presentaron una alta pureza entre 99–100% (Tabla 2), siendo mayor para el almidón de yuca y menor ($p < 0,05$) para los almidones de maíz, ocumo chino y mapuey.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* de los almidones se realizó mediante el análisis del contenido de almidón disponible y almidón resistente total. Además, se evaluó la tasa de α -amilólisis *in vitro*, con la finalidad de conocer la susceptibilidad a la digestión.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón disponible en los almidones. Con la excepción del almidón de papa, el contenido de almidón disponible fue mayor a 90%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los almidones de distinto origen botánico.

El mayor contenido de almidón disponible se encontró para el almidón de maíz seguido por el almidón de ocumo chino y de yuca, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de almidón disponible entre los almidones de mapuey, maíz *waxy* y apio, pero si entre estos almidones y el almidón de maíz y el almidón de papa, almidones que presentan el mayor y el menor contenido de almidón disponible respectivamente.

Tabla 3. Contenido de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones.

Almidón	Almidón disponible (%)	Almidón resistente total (%)
Maíz	97,4 ± 1,5 ^a	1,2 ± 0,1 ^e
Maíz <i>waxy</i>	93,8 ± 2,5 ^{b,c}	1,1 ± 0,2 ^e
Mapuey	94,0 ± 1,7 ^{b,c}	55,8 ± 3,7 ^a
Yuca	94,8 ± 1,5 ^{a,b}	1,8 ± 0,1 ^d
Apio	91,2 ± 1,4 ^c	17,5 ± 0,5 ^b
Ocumo chino	95,9 ± 1,6 ^{a,b}	13,8 ± 0,5 ^c
Papa	86,3 ± 1,2 ^d	48,5 ± 7,5 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$) expresados sobre base seca. El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El control de calidad para la determinación del almidón disponible fue almidón de papa ($93,3 \pm 1,6\%$; $n = 13$). El control de calidad para la determinación del almidón resistente total fue Corn Flakes[®] ($4,0 \pm 0,2\%$; $n = 10$).

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón resistente total en los almidones. Según la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996), los almidones de mapuey, papa y apio presentan un contenido de almidón resistente total muy alto (>15%), significativamente mayor al encontrado en el almidón de ocumo chino, que presentó un contenido de almidón resistente total alto (entre 5,0–15%) y que los

almidones de maíz (normal y ceroso) y de yuca que presentaron un contenido de almidón resistente total bajo según esta clasificación (entre 1–2,5%). El contenido de almidón resistente total en el almidón de maíz normal resultó igual ($p > 0,05$) que el obtenido en el almidón de maíz ceroso.

En la Figura 2 se muestran las tasas de α -amilólisis obtenidas para cada uno de los almidones en su estado crudo y gelatinizado. El estudio de la cinética de hidrólisis se basó en el análisis de la velocidad inicial y magnitud final de la α -amilólisis del almidón (Tabla 4).

Todos los almidones evaluados en su estado crudo presentaron una velocidad inicial y una magnitud final de hidrólisis muy baja, entre 1,2–4,5% y 2,6–11%, respectivamente. La mayor velocidad inicial de hidrólisis se encontró con el almidón de apio, seguida por el almidón de yuca, mientras que las velocidades más bajas se obtuvieron para los almidones de maíz, papa y ocumo chino. Los almidones de apio, yuca y maíz *waxy* presentaron las mayores magnitudes finales de hidrólisis, seguida del almidón de maíz con una velocidad intermedia y finalmente por los almidones de mapuey, papa y ocumo chino, con la menor magnitud final de hidrólisis. El almidón de maíz *waxy* crudo fue hidrolizado más rápidamente que el almidón de maíz.

Las tasas de α -amilólisis de los almidones gelatinizados fueron mucho mayores que las obtenidas para los almidones crudos (Figura 2). Con velocidades iniciales comprendidas entre 49–68% y magnitudes finales de hidrólisis entre 67–91%. Se encontraron diferencias entre los comportamientos de los almidones gelatinizados.

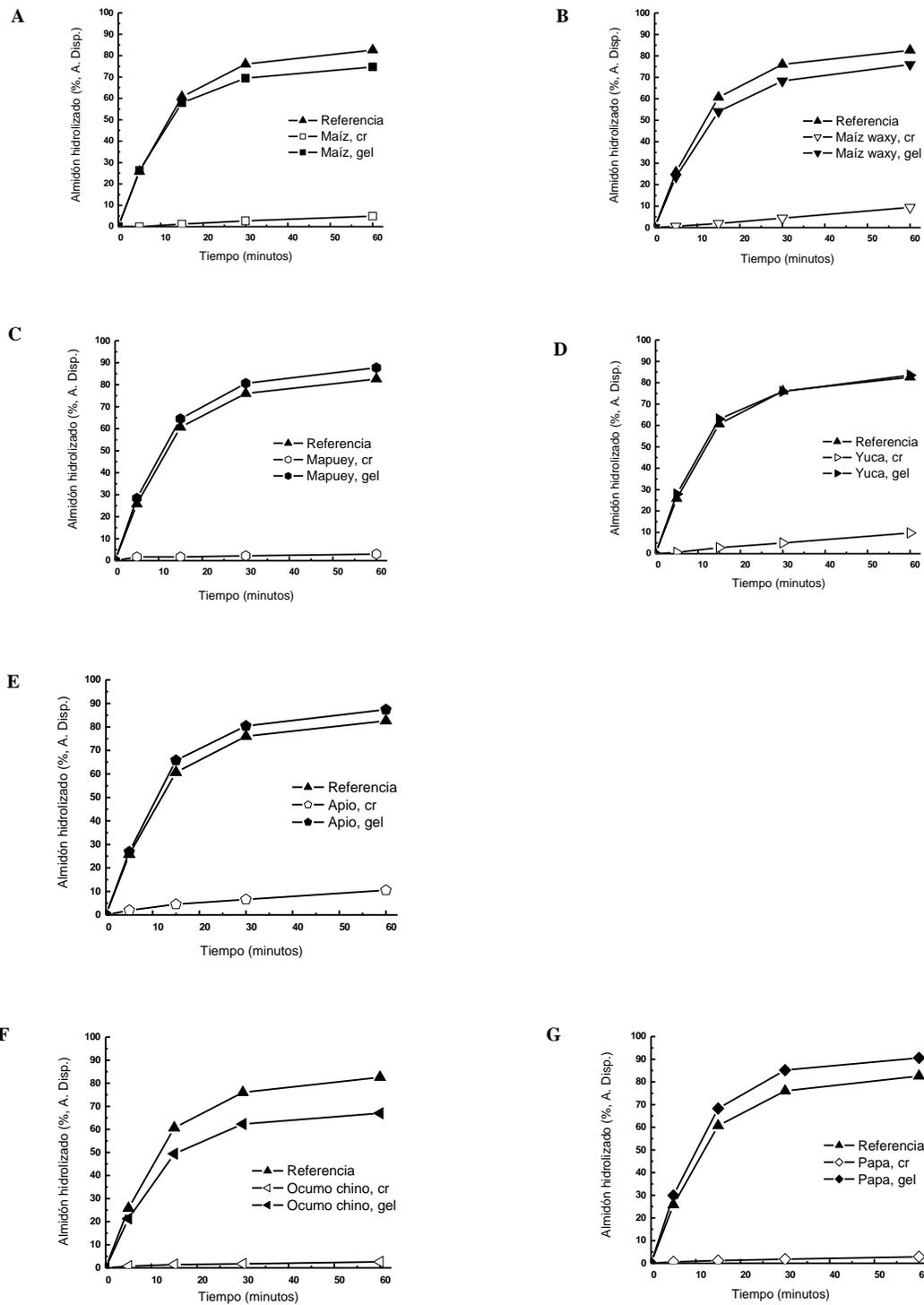


Figura 2. Tasa de α -amilólisis *in vitro* de los almidones estudiados.

Cada punto representa el porcentaje de almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible y representan el promedio de dos determinaciones. La referencia fue el almidón de maíz gelatinizado ($n = 7$). cr: crudo y gel: gelatinizado.

Los almidones de papa, mapuey, apio y yuca gelatinizados presentaron los valores mayores de magnitudes finales de hidrólisis, seguido por los almidones de maíz (ceroso y normal) con valores intermedios, y finalmente por el almidón de ocumo chino, que presentó la menor magnitud final de hidrólisis. Este comportamiento fue similar a lo obtenido para las velocidades iniciales de hidrólisis de estos almidones, pero los valores fueron menores.

Tabla 4. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis *in vitro* de los almidones.

Almidón	Almidón crudo		Almidón gelatinizado	
	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)	Velocidad Inicial (%)	Magnitud final (%)
Maíz	1,17	4,87	57,9	74,6
Maíz waxy	1,86	9,42	54,1	76,0
Mapuey	1,67	3,01	64,4	87,7
Yuca	2,75	9,73	63,0	83,5
Apio	4,53	10,5	65,8	87,4
Ocumo chino	1,38	2,62	49,4	67,0
Papa	1,18	2,91	68,2	90,6

Los porcentajes son el promedio del almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible ($n = 2$). La velocidad inicial es la proporción de almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos, mientras que la magnitud final es la proporción total de almidón hidrolizado al cabo de los 60 minutos. El control de calidad para la determinación de la tasa de α -amilólisis *in vitro* fue el almidón de maíz gelatinizado. La velocidad inicial y magnitud final obtenida para el control de calidad fueron $60,9 \pm 4,0\%$ y $82,6 \pm 5,3\%$, respectivamente ($n = 7$).

Los resultados obtenidos en la digestibilidad *in vitro* de los almidones, pueden ser correlacionados con los parámetros que caracterizan su digestibilidad *in vivo* en el gorgojo de arroz *S. oryzae*. En estos estudios se analizaron los siguientes parámetros: supervivencia y variación de peso, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico de los insectos alimentados con los diferentes almidones.

La Figura 3 muestra la supervivencia de los insectos en la condición de ayuno, en la condición alimentada y en la referencia, durante los 8 días del bioensayo. La supervivencia de los insectos que permanecieron en ayuno disminuyó a partir del cuarto día, hasta llegar a $82 \pm 5\%$. Este resultado fue menor ($p < 0,05$) al obtenido para la condición alimentada y la referencia.

En general, la supervivencia de los insectos alimentados con los diferentes almidones se mantuvo cercana a 100%, con la excepción de la dieta de almidón de papa, en donde la supervivencia fue similar ($p > 0,05$) a la del ayuno ($76 \pm 5\%$ al día 8; Figura 4).

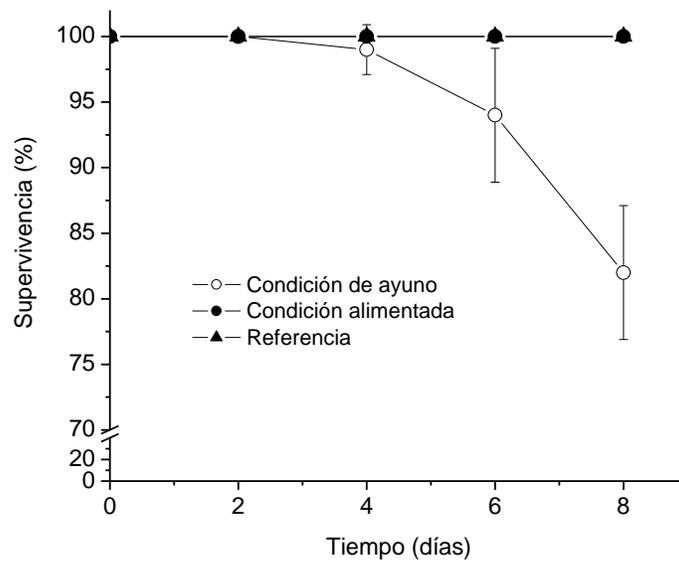


Figura 3. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

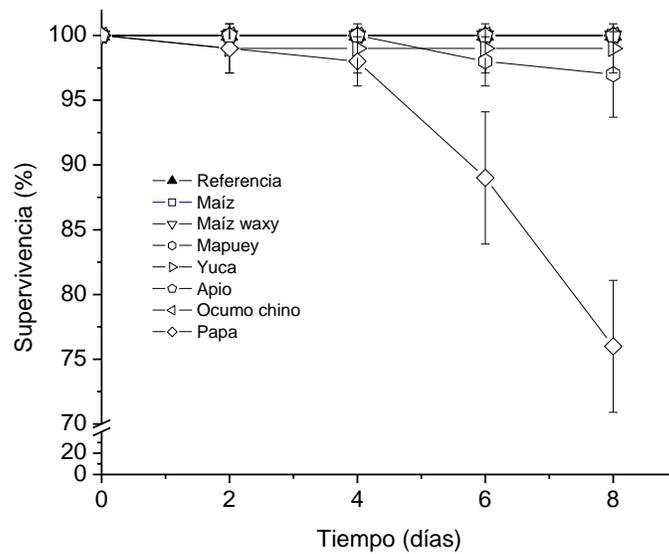


Figura 4. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

La Figura 5 muestra la variación de peso en los insectos mantenidos en ayuno, en la condición alimentada y la referencia. En la restricción alimentaria total, el peso se redujo gradualmente hasta un $21 \pm 3\%$ del peso inicial. En contraste, en la condición alimentada y la referencia el peso aumentó un $6 \pm 1\%$.

En la mayoría de los almidones estudiados (yuca, maíz *waxy*, maíz y mapuey) se promovió una ganancia de peso en los insectos similar a la referencia. Con los almidones de ocumo chino y apio la ganancia de peso en los insectos fue menor ($p < 0,05$) que la referencia, mientras que con la dieta de almidón de papa se obtuvo una pérdida importante de peso al día 8 del bioensayo (Figura 6 y Tabla 5).

En la Figura 6 se puede observar como la pérdida significativa de peso en los insectos alimentados con semillas artificiales de almidón de papa, ocurre gradualmente desde el inicio del bioensayo y de manera menos acentuada que como sucede en los insectos de la condición de ayuno.

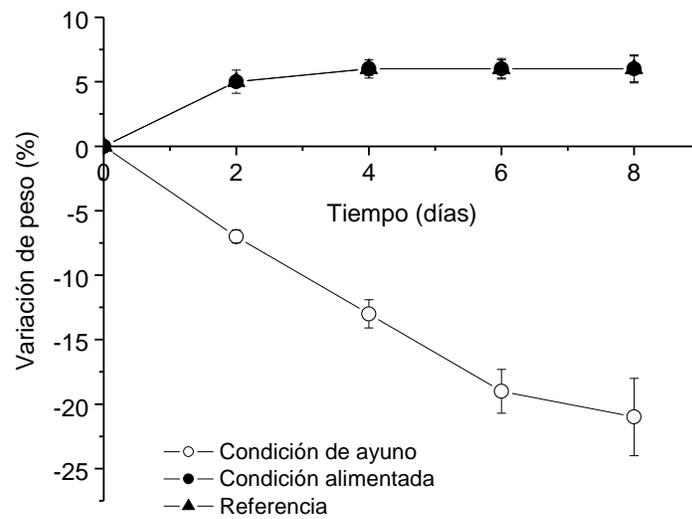


Figura 5. Variación de peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

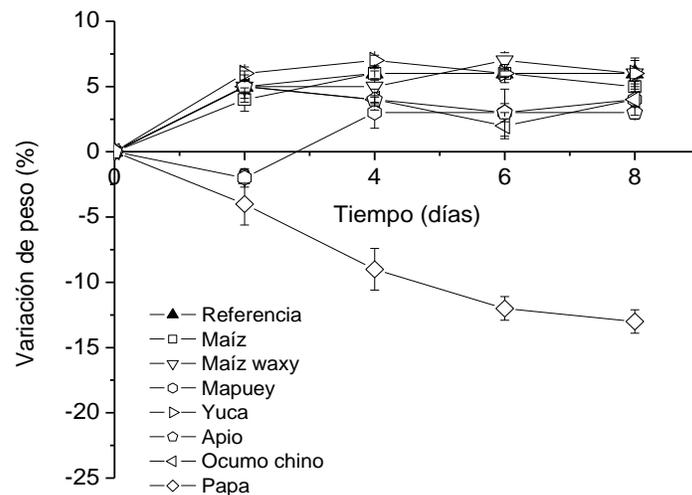


Figura 6. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

Tabla 5. Pesos promedio de los insectos y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con los diferentes almidones.

Dieta	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Variación de peso al día 8 (%)
Referencia	1,72 ± 0,00 ₂ ^b	1,82 ± 0,02 ^b	5,9 ± 1,0 ^{b,c}
Almidón de maíz	1,72 ± 0,00 ₄ ^{a,b}	1,82 ± 0,00 ^b	5,3 ± 0,4 ^{b,c,d}
Almidón de maíz <i>waxy</i>	1,76 ± 0,03 ^a	1,86 ± 0,06 ^{a,b}	5,7 ± 1,2 ^{b,c}
Almidón de mapuey	1,75 ± 0,00 ₂ ^{a,b}	1,82 ± 0,02 ^{a,b}	4,0 ± 1,2 ^{c,d}
Almidón de yuca	1,77 ± 0,00 ^a	1,88 ± 0,01 ^a	6,3 ± 0,4 ^b
Almidón de apio	1,77 ± 0,00 ₅ ^a	1,83 ± 0,01 ^{a,b}	3,4 ± 0,5 ^d
Almidón de ocumo chino	1,65 ± 0,06 ^c	1,71 ± 0,07 ^c	3,6 ± 0,6 ^d
Almidón de papa	1,74 ± 0,00 ₃ ^{a,b}	1,51 ± 0,02 ^d	-13,4 ± 0,9 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$). La referencia fue el almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). Para la condición de ayuno los pesos promedios fueron 1,56 ± 0,00₂ mg (día 0) y 1,24 ± 0,05 mg (día 8), la variación de peso fue -20,6 ± 3,0% ($n = 3$). Para la condición alimentada los pesos promedios fueron 1,71 ± 0,00₂ mg (día 0) y 1,82 ± 0,02 mg (día 8), la variación de peso fue 6,1 ± 1,0% ($n = 3$). La media de los pesos promedios al día 0 en las dietas de almidón y la referencia fue de 1,73 ± 0,01 mg ($n = 8$).

La Tabla 6 muestra el efecto de las diferentes dietas de almidones sobre la actividad similar a α -amilasa en el gorgojo de arroz. Con el almidón de papa y de mapuey se promovió la mayor actividad α -amilolítica en los insectos, la cual resultó mayor ($p < 0,05$) a la referencia. Por el contrario, con el almidón de maíz *waxy* se generó la actividad más baja en los insectos ($p < 0,05$) en comparación a la referencia, mientras que el resto de los almidones promovieron actividades α -amilolíticas iguales ($p > 0,05$) al almidón de referencia.

Tabla 6. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

Dieta	Actividad similar a α-amilasa ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{L}$)	Cociente de actividad similar a α-amilasa
Referencia	$139 \pm 17^{\text{c,d}}$	1,00
Almidón de maíz	$148 \pm 10^{\text{c}}$	1,06
Almidón de maíz <i>waxy</i>	$88 \pm 4^{\text{e}}$	0,63
Almidón de mapuey	$421 \pm 15^{\text{b}}$	3,03
Almidón de yuca	$112 \pm 7^{\text{c,d,e}}$	0,80
Almidón de apio	$98 \pm 11^{\text{d,e}}$	0,70
Almidón de ocumo chino	$144 \pm 5^{\text{c,d}}$	1,04
Almidón de papa	$728 \pm 71^{\text{a}}$	5,24

La actividad similar a α -amilasa está expresada en μmol de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía mostró que las medias con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El cociente constituye la actividad enzimática correspondiente a la dieta entre la actividad enzimática correspondiente al almidón de referencia. Las actividades enzimáticas en la condición de ayuno y en la condición alimentada fueron de 432 ± 18 y $773 \pm 56 \mu\text{mol/s}\cdot\text{L}$, respectivamente ($n = 3$).

La Tabla 7 muestra el efecto de las diferentes dietas de almidones sobre la excreción de ácido úrico en el gorgojo de arroz. Al comparar los diferentes almidones estudiados y la dieta de referencia, la mayor excreción de ácido úrico en los insectos se encontró con la dieta de almidón de papa, seguida por el almidón de mapuey y de apio. La excreción de este metabolito en los insectos mantenidos con estos últimos almidones resultó mayor ($p < 0,05$) que la obtenida en los insectos alimentados con la referencia y los demás almidones estudiados. No se encontraron diferencias significativas entre la excreción de ácido úrico de los insectos alimentados con los almidones de maíz (normal y ceroso) y el almidón de referencia.

Tabla 7. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

Dieta	Excreción de ácido úrico (mg/kg peso al día 8)	Cociente de excreción de ácido úrico
Referencia	360 ± 19 ^{d,e}	1,00
Almidón de maíz	503 ± 16 ^d	1,39
Almidón de maíz <i>waxy</i>	488 ± 52 ^d	1,36
Almidón de mapuey	1504 ± 119 ^b	3,00
Almidón de yuca	263 ± 21 ^e	0,72
Almidón de apio	976 ± 36 ^c	2,72
Almidón de ocumo chino	343 ± 10 ^{d,e}	0,94
Almidón de papa	2532 ± 258 ^a	7,03

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 ± desviación estándar ($n = 3$). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía mostró que las medias con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El cociente constituye la excreción correspondiente a la dieta entre la excreción correspondiente al almidón de referencia. Los niveles de excreción de ácido úrico en la condición de ayuno y en la condición alimentada fueron de 9886 ± 887 y 5292 ± 366 mg/kg, respectivamente ($n = 3$).

Formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles

Para la selección de las formulaciones de películas comestibles a base de almidón, se ensayaron distintas concentraciones del carbohidrato (3, 5 y 6%) a dos concentraciones diferentes del agente plastificante (1,5% y 2%). Dependiendo del tipo de almidón utilizado, la capacidad de formación de película varió, encontrándose que no todas las formulaciones ensayadas fueron capaces de originar películas. De manera cualitativa se pudo evaluar las características de flexibilidad, elasticidad y manejabilidad en las formulaciones seleccionadas (Tabla 8), según el criterio descrito por Ortiz (2010) y Tapia (2007).

Las formulaciones que contenían 3% de almidón y 1,5% de glicerol se fragmentaban al momento de separarlas de la cápsula. La mayoría de las películas de esta formulación presentaron poca resistencia al estiramiento, es decir, baja elasticidad, con excepción de la película de almidón de papa. Por su parte, las formulaciones que contenían 5% de almidón y 2% glicerol, en su mayoría, fueron fácilmente separadas de las placas y presentaron mayor elasticidad, flexibilidad y manejabilidad. En el caso de las películas de almidón de ocumo chino y yuca se requirió ensayar una tercera concentración de almidón (6%) al 2% de glicerol, para obtener las características anteriormente señaladas. Todas las películas seleccionadas presentaron cierta flexibilidad. Por su parte, las películas de almidón de maíz y mapuey a pesar de ser flexibles no fueron elásticas, pues tendieron a romperse cuando fueron sometidas a fuerzas de estiramiento.

Tabla 8. Criterios cualitativos de selección que presentaron las formulaciones seleccionadas de las películas comestibles a base de almidón y glicerol.

Fuente de Almidón	Almidón (% p/v)	Glicerol (% v/v)	Criterio cualitativo de selección														
			Traslúcido		Flexibilidad				Elasticidad				Manejabilidad				
			Si	No	N	B	M	A	N	B	M	A	N	B	M	A	
Maíz	5	2	X			X				X						X	
Maíz waxy	5	2	X				X				X					X	
Mapuey	5	2	X			X				X				X			
Yuca	6	2	X					X					X				X
Apio	5	2	X					X					X			X	
Ocumo chino	6	2	X				X			X						X	
Papa	5	2	X				X				X					X	

N: carece; B: baja; M: media; A: alta.

Las películas comestibles a base de almidón fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico, mecánico, morfológico y sus propiedades de barrera. En la Tabla 9 se incluye el pH, el grosor, la actividad de agua, la permeabilidad al vapor de agua, la solubilidad y la capacidad de retención de agua. El pH de la solución formadora de película no varió según la fuente de almidón ($p > 0,05$) y resultó ligeramente ácido (5,2–5,7). Las películas con mayor grosor fueron las de almidón de mapuey, de ocumo chino y de papa, las cuales resultaron significativamente iguales entre sí, pero diferentes del resto de las películas ($p < 0,05$), con la excepción de la película de almidón de maíz. No se encontraron diferencias significativas entre las películas de almidón de maíz estudiadas (Tabla 9).

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas y de barrera de las películas a base de almidón.

Película de almidón de:	pH (SFP)	Grosor (mm)	Permeabilidad al vapor de agua (10⁻¹⁰ x g/m.s.Pa)	Actividad de agua	Solubilidad en agua (g de sólidos solubles/ g de sólidos totales)	Retención de agua (g de agua ganada/ g de sólidos totales)
Maíz	5,51 ± 0,20 ^a	0,14 ± 0,01 ^{a,b}	8,1 ± 0,5 ^c	0,48 ± 0,00 <sub3< sub="">^d</sub3<>	0,34 ± 0,04 ^{d,e}	1,31 ± 0,02 ^e
Maíz waxy	5,23 ± 0,18 ^a	0,13 ± 0,02 ^{b,c}	5,9 ± 0,2 ^d	0,51 ± 0,00 <sub2< sub="">^{a,b}</sub2<>	0,79 ± 0,04 ^b	7,13 ± 0,45 ^c
Mapuey	5,46 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	9,7 ± 0,1 ^a	0,51 ± 0,00 <sub4< sub="">^a</sub4<>	0,27 ± 0,04 ^{d,e}	1,36 ± 0,07 ^e
Yuca	5,31 ± 0,11 ^a	0,12 ± 0,01 ^c	3,8 ± 0,2 ^e	0,50 ± 0,01 ^{b,c}	0,91 ± 0,02 ^a	13,08 ± 0,32 ^{a*}
Apio	5,48 ± 0,12 ^a	0,13 ± 0,01 ^{b,c}	8,4 ± 0,3 ^{b,c}	0,48 ± 0,01 ^d	0,49 ± 0,09 ^c	8,15 ± 0,31 ^{b*}
Ocumo chino	5,70 ± 0,35 ^a	0,15 ± 0,00 <sub2< sub="">^a</sub2<>	8,8 ± 0,2 ^b	0,51 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,09 ^d	4,54 ± 0,04 ^d
Papa	5,44 ± 0,48 ^a	0,15 ± 0,00 <sub3< sub="">^a</sub3<>	8,5 ± 0,1 ^{b,c}	0,50 ± 0,00 <sub4< sub="">^c</sub4<>	0,25 ± 0,06 ^e	1,07 ± 0,04 ^e

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$). El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). Todas las películas fueron preparadas a base de almidón al 5% p/v y 2% v/v de glicerol, con excepción de las películas de ocumo chino y yuca, en las cuales se utilizó un 6% p/v de almidón (Tabla 8).

*Los valores de retención de agua pudieran estar sobreestimados debido al hinchamiento de las películas ocurrido durante el ensayo (más detalle en el texto).

La mayor permeabilidad al vapor de agua se obtuvo con la película de almidón de mapuey, la cual resultó estadísticamente diferente del resto de las películas. Por su parte, las películas de almidón de yuca y maíz *waxy* presentaron los valores de permeabilidad al vapor de agua más bajos ($p < 0,05$) entre las películas estudiadas. Se encontraron diferencias entre las películas de almidón de maíz, siendo menor ($p < 0,05$) la permeabilidad al vapor de agua en la película de almidón de maíz ceroso.

En la Figura 7 se muestra la pérdida de agua del sistema experimental (cápsula de metilmetacrilato más la película) en función del tiempo. La pendiente de cada una de las rectas constituye la transferencia del vapor de agua (en una atmósfera con 33,3% de humedad relativa) a través de las películas y fueron usadas para calcular la permeabilidad al vapor de agua, tomando en cuenta parámetros como grosor, área de la cápsula y las presiones interna y externa de la misma; pudiéndose observar el mismo comportamiento que mostró la permeabilidad al vapor de agua. A menor pendiente de la recta, menor es la transferencia del vapor de agua y, por lo tanto, el valor de la permeabilidad al vapor de agua es más bajo, como ocurrió para las películas de almidón de yuca (Tabla 9).

La mayor actividad de agua se encontró para las películas de almidón de mapuey, de maíz *waxy* y de ocumo chino, mientras que la menor actividad se obtuvo con las películas de maíz y de apio ($p < 0,05$) (Tabla 9). La película de almidón de maíz *waxy* presentó una mayor actividad de agua que la formulada con almidón de maíz normal ($p < 0,05$).

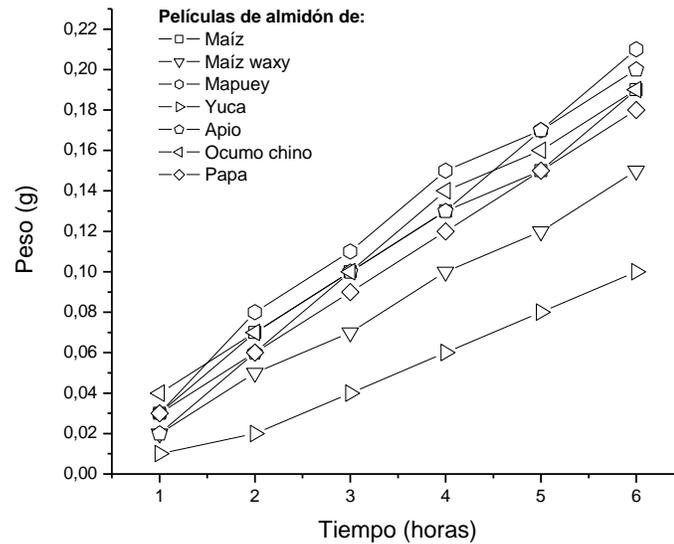


Figura 7. Pérdida de agua del sistema experimental en función del tiempo, en cada una de las películas comestibles.

Cada punto representa el promedio de tres determinaciones ($n = 3$). La pendiente de cada curva de pérdida de peso en función del tiempo, estimada mediante el análisis de regresión, constituye la transferencia del vapor de agua a través de la película (g/h).

La solubilidad en agua de las películas comestibles permitió agruparlas como películas de baja solubilidad en agua (ocumo chino, maíz, mapuey y papa), películas de intermedia solubilidad en agua (apio) y en películas de alta solubilidad en agua (yuca y maíz *waxy*) ($p < 0,05$). Por su parte, la capacidad de retención de agua permitió agrupar a las películas en cuatro categorías: películas con baja retención de agua (mapuey, maíz y papa), películas con intermedia retención de agua (ocumo chino), películas con alta retención de agua (maíz *waxy* y apio) y películas con muy alta retención de agua (yuca) ($p < 0,05$) (Tabla 9).

La Tabla 10 muestra los resultados de color obtenidos para las películas comestibles. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en el cambio total del color como

en el índice de blanco, ambos valores calculados a partir de los parámetros L^* , a^* y b^* obtenidos durante el análisis. Cuando se observan los valores del parámetro L^* (luminosidad), todas las películas tendieron al negro (valores cercanos a cero) y esto también se vio reflejado en un índice de blanco próximo a cero y en un mayor cambio total de color (en comparación al prisma blanco, cercano a 93,56). Las películas de almidón de yuca fueron más oscuras ($p < 0,05$) que el resto de las películas estudiadas, mientras que las películas de almidón de papa, apio, maíz y ocumo chino fueron las más blancas. Las películas de almidón de maíz estudiadas fueron distintas, siendo menor el índice de blanco para la película a base de maíz *waxy* ($p < 0,05$).

Tabla 10. Determinación del color de las películas comestibles.

Película de almidón de:	Índice de claridad y luminosidad (L*)	Matiz (a*)	Intensidad del color (b*)	Cambio total del color (ΔE)	Índice de blanco (IB)
Maíz	20,79 \pm 0,71 ^{a,b}	-0,25 \pm 0,05 ^d	-1,40 \pm 0,10 ^d	72,82 \pm 0,70 ^{d,e}	20,77 \pm 0,70 ^{a,b}
Maíz waxy	14,27 \pm 0,40 ^a	0,04 \pm 0,06 ^{b,c}	-0,97 \pm 0,39 ^c	79,32 \pm 0,40 ^b	14,26 \pm 0,40 ^d
Mapuey	17,32 \pm 0,54 ^c	-0,03 \pm 0,08 ^c	-0,88 \pm 0,32 ^c	76,27 \pm 0,55 ^c	17,31 \pm 0,55 ^c
Yuca	3,32 \pm 0,36 ^e	0,13 \pm 0,12 ^{a,b}	0,00 \pm 0,24 ^b	90,24 \pm 0,36 ^a	3,32 \pm 0,36 ^e
Apio	20,53 \pm 1,31 ^{a,b}	-0,02 \pm 0,04 ^c	-0,41 \pm 0,09 ^b	73,04 \pm 1,30 ^{d,e}	20,53 \pm 1,31 ^{a,b}
Ocumo chino	19,83 \pm 0,07 ^b	0,21 \pm 0,04 ^a	1,77 \pm 0,16 ^a	73,72 \pm 0,07 ^d	19,81 \pm 0,07 ^b
Papa	21,48 \pm 0,33 ^a	-0,06 \pm 0,08 ^c	-1,21 \pm 0,24 ^{c,d}	72,12 \pm 0,34 ^e	21,47 \pm 0,33 ^a

Los valores son el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). Todas las películas fueron preparadas a base de almidón al 5% p/v y 2% v/v de glicerol, con excepción de las películas de ocumo chino y yuca, en las cuales se utilizó un 6% p/v de almidón (Tabla 8). El colorímetro fue calibrado con un prisma blanco con las siguientes características: L* = 93,54; a* = -0,81; b* = 1,58.

Los valores correspondientes de resistencia a la fuerza de punción de las películas comestibles estudiadas se muestran en la Tabla 11. No se encontraron diferencias significativas en el parámetro de elasticidad de las películas estudiadas, pero si en la dureza, fracturabilidad y adhesividad de las mismas ($p < 0,05$). La película de mapuey presentó una dureza y una fracturabilidad mayor que el resto de las películas, mientras que la película de almidón de maíz *waxy* resultó ser la película con menor dureza y fracturabilidad ($p < 0,05$). La película de almidón de maíz normal presentó mayor dureza y fracturabilidad que la película de almidón de maíz ceroso ($p < 0,05$), mientras que ésta última resultó significativamente más adhesiva.

Tabla 11. Propiedades mecánicas de las películas comestibles determinadas con la prueba de punción.

Película de almidón de:	Dureza (N)	Fracturabilidad (N)	Adhesividad (kg.m².s⁻²)	Elasticidad
Maíz	0,88 ± 0,10 ^c	0,70 ± 0,09 ^b	-0,31 ± 0,08 ^a	0,05 ± 0,05 ^a
Maíz waxy	0,69 ± 0,01 ^d	0,50 ± 0,02 ^d	-0,49 ± 0,04 ^b	0,04 ± 0,01 ^a
Mapuey	1,30 ± 0,06 ^a	0,81 ± 0,03 ^a	-1,02 ± 0,03 ^d	0,04 ± 0,02 ^a
Yuca	1,11 ± 0,10 ^b	0,70 ± 0,09 ^b	-0,51 ± 0,09 ^b	0,03 ± 0,02 ^a
Apio	0,89 ± 0,06 ^c	0,59 ± 0,06 ^{c,d}	-0,40 ± 0,09 ^{a,b}	0,04 ± 0,01 ^a
Ocumo chino	1,00 ± 0,07 ^{b,c}	0,64 ± 0,04 ^{b,c}	-0,85 ± 0,11 ^c	0,09 ± 0,10 ^a
Papa	0,99 ± 0,10 ^{b,c}	0,60 ± 0,01 ^{c,d}	-0,33 ± 0,07 ^a	0,03 ± 0,03 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$). El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). Todas las películas fueron preparadas a base de almidón al 5% p/v y 2% v/v de glicerol, con excepción de las películas de ocumo chino y yuca, en las cuales se utilizó un 6% p/v de almidón (Tabla 8).

En la Figura 8 se muestran las micrográficas de las películas comestibles formuladas con los almidones obtenidos a partir de distintas fuentes botánicas. En la mayoría de las películas se observó una distribución interna homogénea y compacta de la matriz polimérica. Las dos superficies de la película (inferior y superior) parecen tener un grado de compactación diferente a la región interna y estar sujetas a las fuerzas de fractura. En la Figura 8A, se observa claramente la diferencia entre el interior de la película y las dos capas superficiales señaladas, mientras que en las Figuras 8B, D y G, estas diferencias no son tan notables.

En varias de las películas analizadas se observaron líneas de fractura en las superficies y grietas en el interior de las mismas. Por ejemplo, en la película de almidón de maíz *waxy* se evidenciaron numerosas líneas de fractura en la superficie y algunas grietas en el interior compacto de la matriz polimérica (Figura 8B), a diferencia de la película de almidón de maíz normal que presentó una superficie lisa y sin fracturas (Figura 8A).

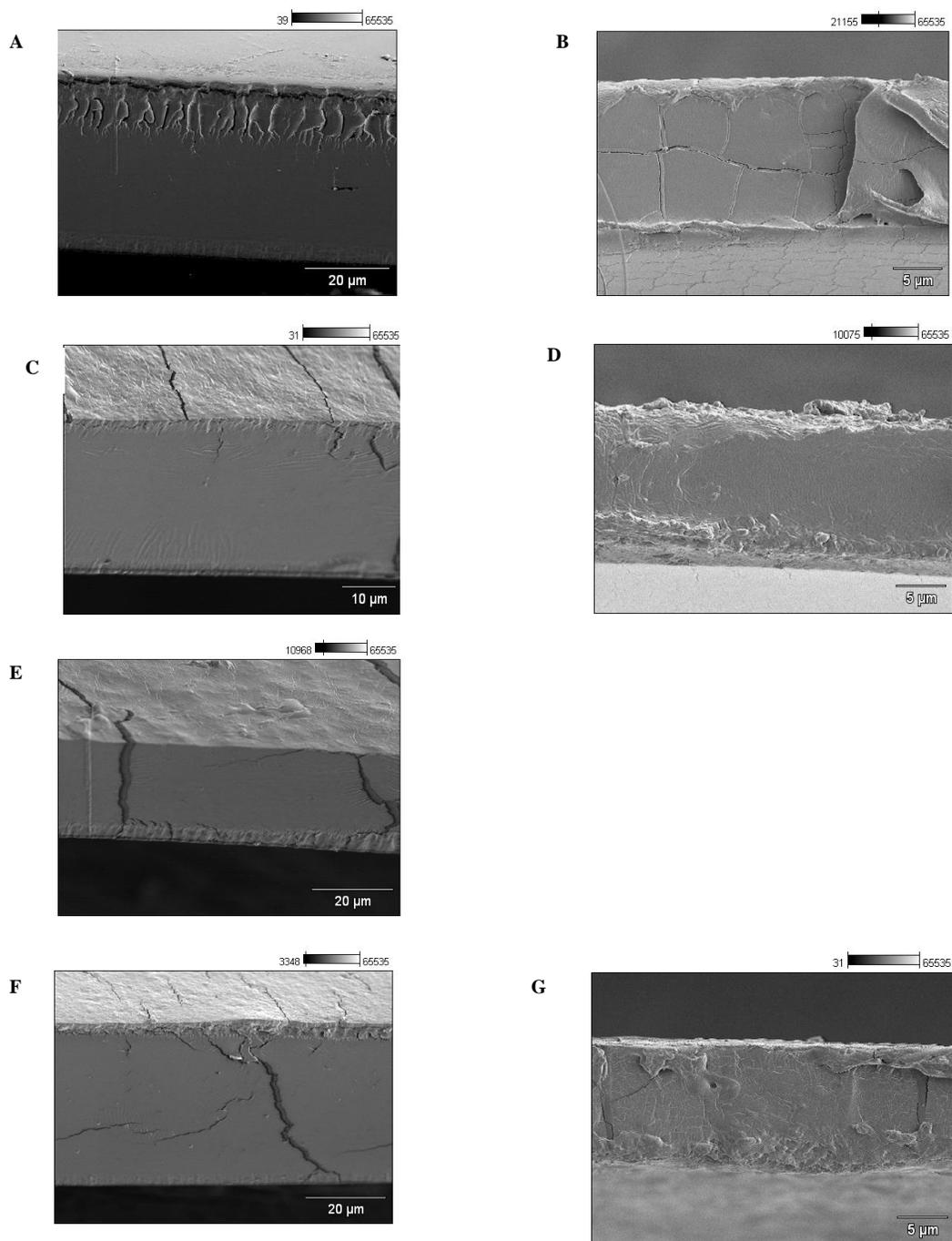


Figura 8. Morfología de las películas comestibles a base de distintas fuentes de almidón.

Micrograffías obtenidas por microscopía electrónica de barrido, vistas de perfil. Los paneles muestran la película de almidón de: A) maíz, B) maíz *waxy*, C) mapuey, D) yuca, E) apio, F) ocumo chino y G) papa.

Caracterización nutricional de las películas comestibles

Los resultados de la caracterización nutricional (digestibilidad *in vitro* e *in vivo*) de las películas comestibles se presentan a continuación. En la Tabla 12 se muestra el contenido de almidón disponible y de almidón resistente total obtenido en cada una de las películas comestibles enasayadas. Las películas comestibles formuladas a partir de los siete almidones nativos, presentaron un contenido de almidón disponible menor ($p < 0,05$), en comparación con sus respectivos almidones nativos (Tabla 3). El contenido de almidón disponible varió entre 58–70%, estos valores corresponden a las películas de almidón de maíz y yuca, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabla 12. Contenido de almidón disponible y almidón resistente total de las películas comestibles.

Película de almidón de:	Almidón disponible (%)	Almidón resistente total (%)
Maíz	58,1 ± 2,4 ^d	4,3 ± 0,2 ^c
Maíz waxy	66,2 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,1 ^f
Mapuey	62,1 ± 0,4 ^c	10,4 ± 0,3 ^b
Yuca	69,6 ± 0,6 ^a	2,2 ± 0,1 ^e
Apio	60,6 ± 1,8 ^{c,d}	3,5 ± 0,2 ^d
Ocumo chino	63,3 ± 1,7 ^c	3,3 ± 0,1 ^d
Papa	58,7 ± 1,8 ^d	11,8 ± 0,1 ^a

Los valores son el promedio ± desviación estándar ($n = 3$) expresados sobre base seca. El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El control de calidad para la determinación del almidón disponible fue almidón de papa (93,3 ± 1,6%; $n = 13$). El control de calidad para la determinación del almidón resistente total fue Corn Flakes® (4,0 ± 0,2%; $n = 10$).

Según la clasificación de Goñi y col. (1996), las películas de almidón de papa y de mapuey presentaron contenidos altos de almidón resistente total (entre 5–15%; Tabla 12). Estas películas resultaron diferentes entre sí y del resto de las películas comestibles estudiadas ($p < 0,05$). Las películas de almidón de maíz, apio y ocumo chino presentaron contenidos intermedios de almidón resistente total (entre 2,5–5,0%) y aquellas formuladas con almidón de yuca y de maíz *waxy* presentaron contenidos bajos de almidón resistente total (entre 1–2,5%).

La película de almidón de maíz *waxy* presentó un mayor tenor de almidón disponible y un menor contenido de almidón resistente total que su contraparte formulada con almidón de maíz normal ($p < 0,05$).

En la Figura 9 se muestran las tasas de α -amilólisis obtenidas para cada una de las películas comestibles analizadas y en la Tabla 13 se muestra la velocidad inicial y magnitud final de la hidrólisis de las películas (crudas y gelatinizadas). Todas las películas comestibles en su estado crudo, es decir, aquellas que no fueron sometidas a ebullición previa al análisis enzimático, presentaron una mayor tasa de α -amilólisis en comparación con la obtenida con los almidones nativos (Tabla 4). La velocidad inicial varió entre 24-64% y la magnitud final de hidrólisis entre 43–83%. Las películas de almidón de apio, maíz *waxy* y yuca presentaron la mayor magnitud final, seguida de las películas de almidón de maíz y de papa, con valores intermedios, y por las películas de mapuey y ocumo chino, con la menor magnitud final de hidrólisis (Figura 9). La película de almidón de maíz *waxy* cruda presentó una mayor tasa de hidrólisis en comparación con la película de almidón de maíz.

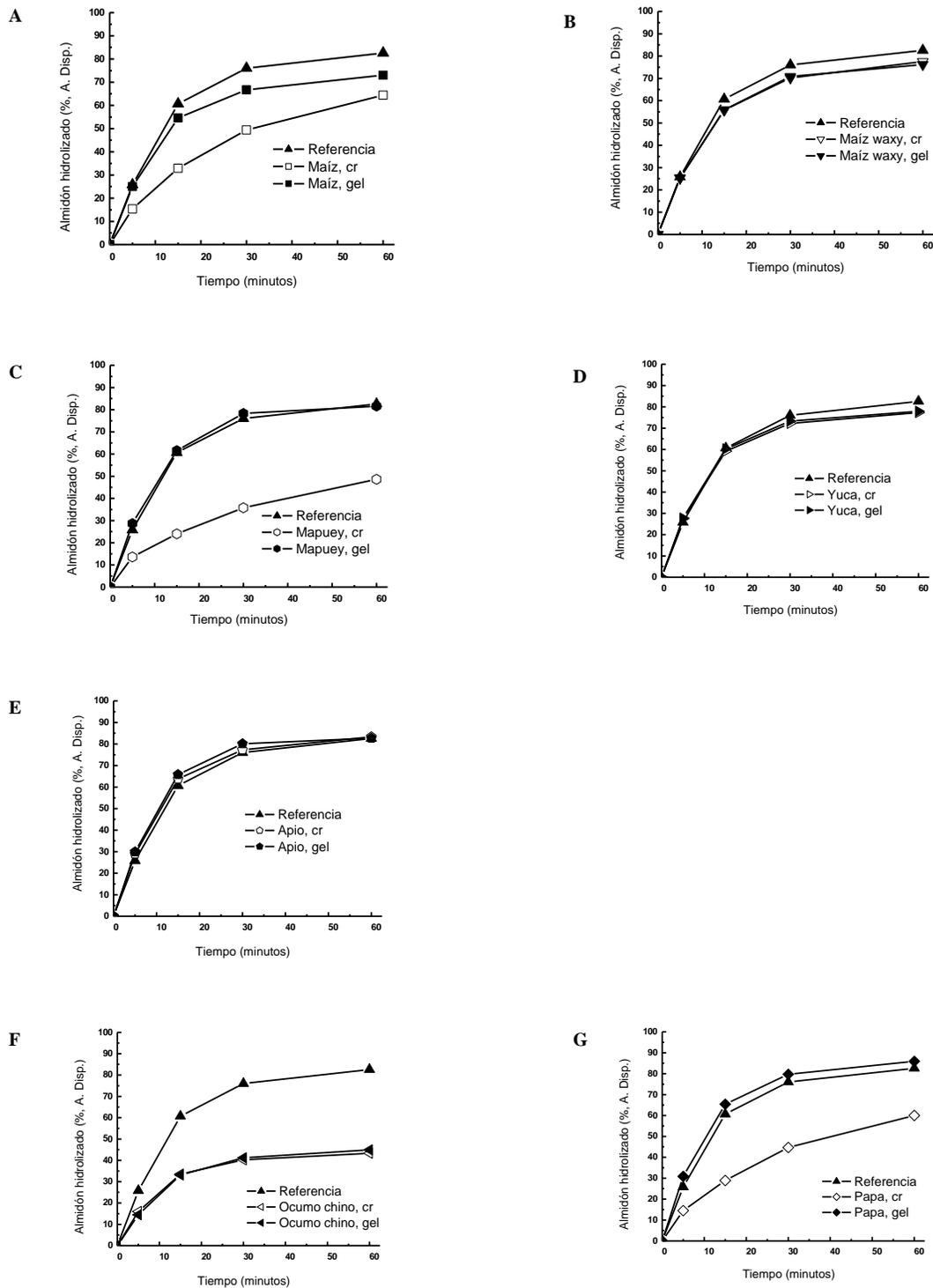


Figura 9. Tasa de α -amilólisis in vitro de las películas comestibles.

Cada punto representa el porcentaje de almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible y representan el promedio de dos determinaciones. La referencia fue el almidón de maíz gelatinizado ($n = 7$). cr: crudo y gel; gelatinizado.

En la mayoría de las películas, el tratamiento térmico antes del ensayo enzimático (películas gelatinizadas) ocasionó un incremento de la α -amilólisis. La velocidad inicial varió entre 33–66% y la magnitud final de hidrólisis entre 44–86%. El incremento en la velocidad inicial producto de la gelatinización varió entre las películas, siendo más evidente este incremento con las películas de almidón de papa (de 29% con la película cruda a 66% luego de la gelatinización), de almidón de mapuey (de 24% a 62%) y de almidón de maíz (de 33% a 55%). Con el resto de las películas, no se encontraron diferencias producto de la gelatinización. Entre las películas de almidón de maíz y de maíz *waxy* gelatinizadas, no se encontraron diferencias (Figura 9A y B).

Tabla 13. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis *in vitro* de las películas comestibles.

	Almidón crudo		Almidón gelatinizado	
	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)	Velocidad Inicial (%)	Magnitud final (%)
Película de almidón de:				
Maíz	32,9	64,4	54,6	73,0
Maíz <i>waxy</i>	55,8	77,5	55,9	76,2
Mapuey	24,0	48,6	61,6	81,6
Yuca	59,2	77,3	60,3	77,9
Apio	63,8	83,3	65,8	82,7
Ocumo chino	33,5	43,3	33,1	44,5
Papa	28,9	60,0	65,4	85,9

Los porcentajes son el promedio del almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible ($n = 2$). La velocidad inicial es la proporción de almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos, mientras que la magnitud final es la proporción total de almidón hidrolizado al cabo de los 60 minutos. El control de calidad para la determinación de la tasa de α -amilólisis *in vitro* fue el almidón de maíz gelatinizado. La velocidad inicial y magnitud final obtenida para el control de calidad fueron $60,9 \pm 4,0\%$ y $82,6 \pm 5,3\%$, respectivamente ($n = 7$).

La supervivencia de los gorgojos alimentados con las películas comestibles fue igual a la de la referencia ($p > 0,05$) (Figura 10). En todos los insectos se promovió una ganancia

de peso (Figura 11; Tabla 14).

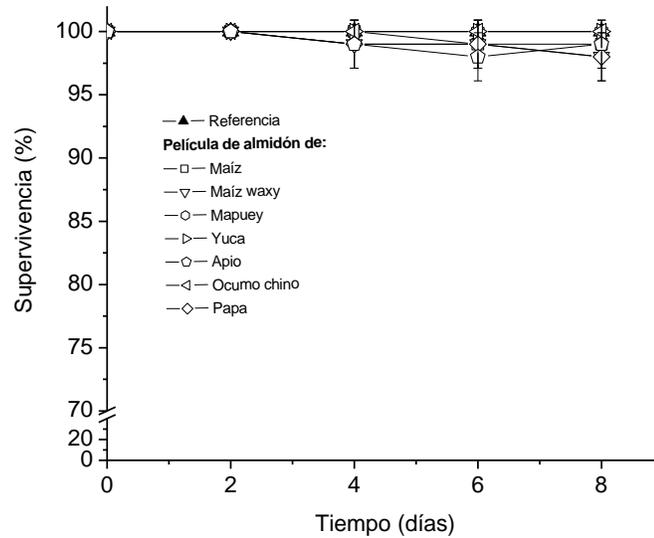


Figura 10. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

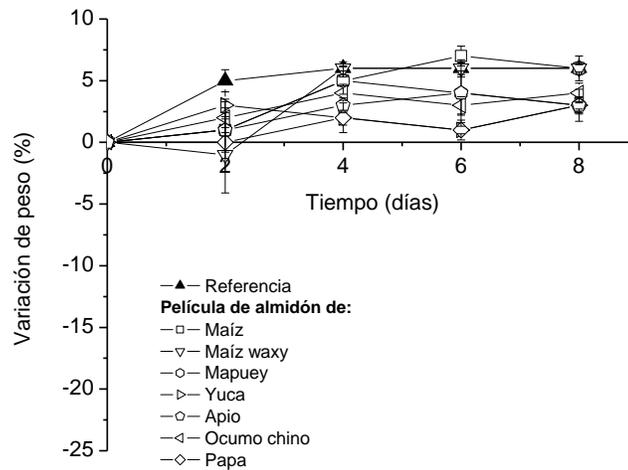


Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Las barras indican la desviación estándar de la media. La referencia fue el almidón de maíz ($n = 3$).

El aumento de peso en los insectos alimentados con las películas de almidón de maíz (normal y ceroso) fue similar al promovido por la referencia ($p > 0,05$), pero mayor ($p < 0,05$) al inducido en los insectos alimentados con las demás películas.

Tabla 14. Pesos promedio y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con las diferentes películas comestibles.

Película de almidón de:	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Variación de peso al día 8 (%)
Referencia	$1,72 \pm 0,002^a$	$1,82 \pm 0,02^{a,b}$	$5,90 \pm 1,00^a$
Maíz	$1,74 \pm 0,01^a$	$1,86 \pm 0,02^a$	$6,46 \pm 0,53^a$
Maíz waxy	$1,75 \pm 0,002^a$	$1,86 \pm 0,005^a$	$6,30 \pm 0,25^a$
Mapuey	$1,79 \pm 0,003^a$	$1,85 \pm 0,01^a$	$3,35 \pm 0,56^b$
Yuca	$1,75 \pm 0,004^a$	$1,80 \pm 0,02^b$	$2,73 \pm 0,66^b$
Apio	$1,75 \pm 0,04^a$	$1,79 \pm 0,04^b$	$2,58 \pm 0,31^b$
Ocumo chino	$1,73 \pm 0,002^a$	$1,79 \pm 0,01^b$	$3,53 \pm 0,80^b$
Papa	$1,72 \pm 0,06^a$	$1,77 \pm 0,06^b$	$2,87 \pm 1,35^b$

Los valores son el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). La referencia fue el almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). Para la condición de ayuno los pesos promedios fueron $1,56 \pm 0,002$ mg (día 0) y $1,24 \pm 0,05$ mg (día 8), la variación de peso fue $-20,6 \pm 3,0\%$ ($n = 3$). Para la condición alimentada los pesos promedios fueron $1,71 \pm 0,002$ mg (día 0) y $1,82 \pm 0,02$ mg (día 8), la variación de peso fue $6,1 \pm 1,0\%$ ($n = 3$). La media de los pesos promedios al día 0 en las dietas de películas y la referencia fue de $1,74 \pm 0,007$ mg ($n = 8$).

La Tabla 15 muestra el efecto de las diferentes dietas de películas comestibles sobre la actividad similar a α -amilasa en el gorgojo de arroz. La mayoría de las películas comestibles promovieron actividades α -amilolíticas menores ($p < 0,05$) o iguales a la referencia (semillas artificiales de almidón de maíz comercial), con la excepción de la película de almidón de maíz *waxy* que promovió la mayor actividad α -amilolítica en los insectos ($p < 0,05$).

Tabla 15. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Película de almidón de:	Actividad similar a α-amilasa ($\mu\text{mol/s.L}$)	Cociente de actividad similar a α-amilasa
Referencia	139 ± 17^b	1,00
Maíz	99 ± 13^d	0,71
Maíz <i>waxy</i>	162 ± 18^a	1,16
Mapuey	$120 \pm 19^{b,c,d}$	0,86
Yuca	102 ± 10^d	0,73
Apio	$111 \pm 6^{c,d}$	0,80
Ocumo chino	103 ± 12^d	0,74
Papa	$128 \pm 8^{b,c}$	0,92

La actividad similar a α -amilasa está expresada en μmol de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía, mostró que las medias con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El cociente constituye la actividad enzimática correspondiente a la dieta entre la actividad enzimática correspondiente al almidón de referencia. Las actividades enzimáticas en la condición de ayuno y en la condición alimentada fueron de 432 ± 18 y $773 \pm 56 \mu\text{mol/s.L}$, respectivamente ($n = 3$).

La excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con las diferentes películas comestibles resultó mayor ($p < 0,05$) a la obtenida con la referencia (Tabla 16). Sin embargo, entre las diferentes películas comestibles no se encontraron diferencias ($p > 0,05$). Todas las películas estudiadas promovieron una excreción de ácido úrico significativamente igual a la película de almidón de maíz, con la excepción de la película de almidón de apio, con la cual, la excreción de este metabolito en los insectos incrementó de manera significativa ($p < 0,05$).

Tabla 16. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Película de almidón de:	Excreción de ácido úrico (mg/kg peso al día 8)	Cociente de excreción de ácido úrico
Referencia	360 ± 19 ^c	1,00
Maíz	906 ± 93 ^b	2,53
Maíz waxy	980 ± 75 ^{a,b}	2,72
Mapuey	1006 ± 137 ^{a,b}	2,80
Yuca	1040 ± 38 ^{a,b}	2,89
Apio	1135 ± 166 ^a	3,14
Ocumo chino	1052 ± 46 ^{a,b}	2,92
Papa	993 ± 27 ^{a,b}	2,75

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 ± desviación estándar ($n = 3$). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía, mostró que las medias con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ($p < 0,05$; Prueba LSD de Fisher). El cociente constituye la excreción correspondiente a la dieta entre la excreción correspondiente al almidón de referencia. Los niveles de excreción de ácido úrico en la condición de ayuno y en la condición alimentada fueron de 9886 ± 887 y 5292 ± 366 mg/kg, respectivamente ($n = 3$).

VII. Discusión

Como se mencionó en la sección anterior, la discusión de los resultados se presenta dividida en tres partes: (i) caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles, (ii) formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles y (iii) caracterización nutricional de las películas comestibles.

Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles

Bajo condiciones atmosféricas normales, muchos almidones comerciales nativos contienen entre 10 y 20% de humedad (p/p) (Swinkels, 1985). Según Thomas y Atwell (1999), la humedad en almidones típicamente se equilibra al alcanzar 12%. Estos valores de humedad son los adecuados para lograr que el producto tenga una mayor estabilidad durante el período de almacenamiento, ya que a estos valores el desarrollo microbiano es muy lento (Jay, 1996).

Algunos estudios han reportado que la humedad del almidón de yuca puede variar entre 5,0–13,7% y el de papa entre 7,0–13,3% (Hoover, 2001; Sangeetha, 2006). Por su parte, González y Pérez (2003) obtuvieron una humedad de 10,2% para el almidón de yuca y Boatella y Codony (2004) reportaron un 13,0% y 19,0% para los almidones de yuca y de papa, al igual que Zaidul y col. (2007) con 13,4% y 15,6% para estos dos almidones respectivamente. Bello y col. (2001) reportaron un 14,1% de humedad para el almidón de papa, mayor a lo obtenido en este estudio.

En el proceso de obtención del almidón de papa, una vez realizado el secado en un deshidratador de bandeja por 24 horas a 45 °C, se realizó una primera determinación del contenido de humedad, resultando ser de $15,8 \pm 0,09\%$ ($n = 3$), valores similares a los obtenidos por Zaidul y col. (2007) y Boatella y Codony (2004). Sin embargo, para obtener un producto más estable en el tiempo como explica Jay (1996), se decidió realizar un segundo proceso de secado a 45 °C por 24 horas más, obteniéndose finalmente una humedad de 8,1%. Este mismo procedimiento fue llevado a cabo para el almidón de apio, cuya humedad inicial fue de $17,8 \pm 0,21\%$ ($n = 3$). Marcano (1975) y Melito (1998) reportaron valores de humedad para el apio criollo amarillo de 5,4% y 13,5% respectivamente, valores diferentes al encontrado en este estudio (Tabla 2). Por su parte, se han obtenido para el almidón de mapuey (variedad blanca) y el de ocumo chino, un contenido de humedad de 9,1% (Rached y col., 2006) y 9,5% (Palomino y col., 2010) respectivamente, menores a los reportados en este trabajo. Para el almidón de maíz se ha obtenido un 13,0% (Boatella y Codony, 2004) y 10,6% de humedad (Bello y col., 2001), valores similares a los obtenidos en este estudio (Tabla 2). La humedad de los almidones es dependiente de la humedad relativa de la atmósfera en la cual se almacenan y la humedad de equilibrio de los mismos depende del tipo de almidón (Bello, 2010).

El contenido de cenizas en el almidón permite inferir sobre el contenido de minerales en el mismo (Bello, 2010). Se presume que un contenido elevado de ciertos elementos químicos sea el responsable de tener altos porcentajes de cenizas, como por ejemplo, el potasio en los almidones de musáceas (Bello y col., 1999) y el fósforo en el almidón de papa (Boatella y Codony, 2004). Altos contenidos de cenizas le imparte valor nutricional al almidón (Bello, 2010).

Alvis y col. (2008) reportaron para el almidón de papa un contenido de cenizas de 0,44%, un poco más elevado al aquí obtenido. Sin embargo, Bello y col. (2001) obtuvieron 0,27% de cenizas para este mismo almidón, lo que coincide con lo encontrado en este estudio (Tabla 2). Las diferencias encontradas con Alvis y col. (2008) podrían deberse, a que cada variedad de papa posee contenidos de minerales característicos. Por su parte, para el almidón de ocumo chino, Palomino y col. (2010) y Tapia y col. (2012) reportaron un contenido de cenizas menor al encontrado en este estudio (0,19% y 0,24%, respectivamente). Para los demás almidones se han reportado los siguientes contenidos de cenizas: mapuey 0,07% (Rached y col., 2006), yuca 0,11% (González y Pérez, 2003), almidón de maíz 0,12% (Bello y col., 2001) y maíz *waxy* 0,02% (Gianibelli y col., 2005). Las diferencias existentes podrían estar relacionadas con las variedades utilizadas en los diversos estudios, así como en las condiciones de los suelos donde estos tubérculos y cereales fueron cultivados.

Con respecto al contenido de grasa, Boatella y Codony (2004) y Jobling (2004) reportaron para el almidón de maíz valores de 0,80% y 0,70%, respectivamente. Sin embargo, Bello y col. (2001) obtuvieron un 0,19% de grasa para este mismo almidón. Generalmente el nivel de lípidos en el almidón de cereales está entre 0,5 y 1% (Charley, 2004), lo que se asemeja a lo encontrado en este estudio. Cabe destacar, que entre las cinco clases generales de maíces, existen grandes diferencias en cuanto a los niveles de grasa y otros componentes del grano, esto pudiera verse reflejado en almidones con distintos contenidos de este componente. Gianibelli y col. (2005) en un estudio realizado con diferentes almidones *waxy*, reportó un contenido de grasa para el almidón ceroso de maíz de 0,60%, igual al obtenido en este estudio (Tabla 2). Por su parte, los valores encontrados

para el almidón de mapuey (un tubérculo radical) no concordaron con los reportados por Rached y col. (2006), quienes obtuvieron un contenido de grasa menor (0,07%). Alvis y col. (2008) reportaron para el almidón de yuca (tres variedades diferentes) y de papa, valores entre 0,30–0,35%, similar a lo obtenido para el almidón de papa en este estudio, pero mayor a lo encontrado para el almidón de yuca (Tabla 2). Huang (2001) reportó también contenidos entre 0,30–0,38% y 0,30–0,40% para el almidón de yuca y de papa, respectivamente. Sin embargo, González y Pérez (2003), Boatella y Codony (2004) y Jobling (2004) han reportado para el almidón de yuca entre 0,10–0,12% de lípidos, valores similares al obtenido en este estudio. En el caso del almidón de ocumo chino, Palomino y col. (2010) obtuvieron 0,33% de grasa y Marcano (1975) reportó 0,74% para el almidón de apio, similar a lo obtenido en esta investigación.

En cuanto al contenido de proteína, Palomino y col. (2010) no detectaron proteína en el almidón de ocumo chino. Por su parte, Alvis y col. (2008) reportaron para el almidón nativo de yuca y de papa contenidos entre 0,60–0,62%, muy similares entre sí. González y Pérez (2003) no determinaron proteína en el almidón de yuca y Boatella y Codony (2004), Bello y col. (2001) y Jobling (2004) reportaron valores intermedios de proteína para el almidón de papa con 0,10%, 0,08% y 0,06%, respectivamente. Para el almidón de maíz se ha obtenido 0,35% de proteína según Bello y col. (2001), Boatella y Codony (2004) y Jobling (2004), 0,20% en el almidón de maíz *waxy* (Gianibelli y col., 2005) y 0,36% en el almidón de mapuey (Rached y col., 2006), contenidos mayores a los obtenidos en esta investigación. Mientras que Melito (1998) reportó un contenido de proteína cruda de 0,05% para el almidón de apio criollo amarillo, similar al obtenido en este estudio (Tabla 2). Las diferencias en el contenido de proteína en los distintos trabajos pudieran

deberse, tanto a las fuentes botánicas seleccionadas como al método de extracción del almidón utilizado, por ejemplo, en el número de lavados realizados a la pulpa para la obtención de la lechada.

El elevado grado de pureza de los almidones aislados se corresponde con lo reportado para otras fuentes, tales como trigo y arroz (García-Alonso y col., 1999) y para almidones extraídos de raíces y tubérculos (99,4–99,9%; Tapia y col. 2012). Otros investigadores han reportado una pureza de 99,6% para el almidón de apio (Rodríguez, 2011), 99,4% para el almidón de ocumo chino (Palomino y col., 2010), 99,5% para mapuey (Rached y col., 2006), 99,8% para yuca (González y Pérez, 2003), 98,5% para maíz (Bello y col., 2001), 99,2% para el almidón de maíz *waxy* (Gianibelli y col., 2005) y 99,0% para el almidón de papa (Bello y col., 2001). La pureza de los almidones presentó una correlación negativa con el contenido de proteína ($r = -0,685$; $p < 0,05$; $n = 19$) y grasa ($r = -0,820$; $p < 0,05$; $n = 19$) obtenido en estas muestras. Estos componentes son con frecuencia designados como “contaminantes” en la industria del almidón (Thomas y Atwell, 1999). Sin embargo, el bajo contenido de esos componentes obtenido en los almidones estudiados sugiere que éstos fueron extraídos con una alta pureza; demostrando con ello un eficiente proceso de extracción a partir de cada una de sus fuentes botánicas, ya sea mediante una extracción a nivel industrial como los almidones de maíz y yuca, o mediante procedimientos de extracción a escala de laboratorio como se llevó a cabo con el resto de los almidones.

Un contenido de almidón disponible mayor a 91% es un indicativo de un nivel satisfactorio de pureza de estos almidones (Tovar y col., 2002; Hernández y col., 2008) (Tabla 3). Este parámetro de digestibilidad refleja la pureza que poseen los almidones

cuando carecen de una matriz alimentaria (como en las harinas) y por tanto, la eficacia del proceso de purificación (Martín, 2010).

El bajo contenido de almidón disponible encontrado para el almidón de papa aislado en el laboratorio (Tabla 3), no reflejó el alto porcentaje de pureza determinado luego del análisis de su composición proximal (Tabla 2). Otros investigadores han reportado para este almidón un contenido de almidón disponible de 95%, lo que coincide con su elevado grado de pureza (Tovar y col., 2002; García, 2003; Hernández y col., 2008). Debido a que en estos trabajos, los almidones fueron aislados empleando un procedimiento estándar (Pérez, y col., 1993) y el contenido de almidón disponible fue determinado a través del mismo método (Holm y col., 1986), las diferencias encontradas pudieran estar dadas por las variaciones en el origen botánico de las muestras analizadas. Ésta última puede provenir de distintos lotes y/o cultivares adquiridos en diferentes mercados locales y la variedad seleccionada para el estudio puede cambiar, y con ello, la composición proximal del almidón extraído. Además, la mayoría de las impurezas presentes en los almidones purificados corresponden a elementos como proteínas, grasas y cenizas, sin embargo, otros elementos como los restos de la pared celular y la presencia de polisacáridos no amiláceos que no son separados en el proceso de extracción, podrían contribuir con la disminución del contenido de almidón disponible (Bello-Pérez y col., 2004; Marín, 2009), tal como ha sido señalado para el almidón de plátano por estos autores.

En este estudio, el contenido de almidón disponible del almidón de maíz fue de 97%, igual al reportado por otros autores (Tovar y col., 1999b; Laurentin y col., 2003; García, 2003). Para el almidón de ocumo también se ha reportado un contenido de almidón disponible de 97% (Laurentin, 1999) igual que para el almidón de yuca (Cárdenas

y col., 1998). Un mayor contenido de amilopectina en el almidón de maíz *waxy*, ocasionó una disminución ($p < 0,05$) del contenido de almidón disponible. Tapia y col. (2012) también señalan que el almidón de mapuey es de naturaleza *waxy*, por presentar un alto contenido de amilopectina (96,2–98,6%), lo que explicaría el menor contenido de almidón disponible encontrado (Tabla 3).

Tovar y col. (1999b) y Galeno (2006) reportaron para el almidón de apio contenidos de almidón disponible de 96% y 94% respectivamente, ambos mayores a lo obtenido en este estudio (Tabla 3). Las diferencias encontradas entre los almidones estudiados reflejan una vez más las variaciones en el origen botánico de las muestras analizadas. Además, se ha reportado que preparaciones de almidones deshidratados presentan menores contenidos de almidón disponible (Herrera, 1997; Galeno, 2006). En este sentido, un segundo secado de 24 horas a 45 °C en el deshidratador de bandeja, para obtener una humedad inferior al 12%, pudo ocasionar un efecto en la disminución de la susceptibilidad del gránulo al ataque enzimático, al eliminar una parte del agua enlazada a las moléculas del polímero y con ello, modificar posiblemente la estructura cristalina del gránulo de almidón.

El almidón resistente es uno de los factores que más influencia la digestión del almidón (Hernández, 2006). La determinación del contenido de almidón resistente total según el método establecido por Goñi y col. (1996), permite cuantificar la cantidad de almidón resistente que pertenece al almidón inaccesible físicamente, al almidón intrínsecamente resistente y al almidón retrogradado. Sin embargo, la cantidad de almidón físicamente inaccesible desaparece con el proceso de molienda. Además, los almidones son analizados en su estado crudo, en el sentido de que no han sido sometidos a un proceso de gelatinización, por lo que, la cantidad de almidón retrogradado que podría encontrarse en

ellos sería muy baja o incluso nula (Hernández y col., 2008; Martín, 2010). Por esta razón, la mayoría del almidón resistente total encontrado en estos almidones se debe, principalmente, a fracciones de almidón intrínsecamente resistentes (Martín, 2010).

El elevado contenido de almidón resistente total encontrado para las muestras de almidón nativo de papa (Tabla 3), fue similar al obtenido por Hernández y col. (2008) para este mismo almidón (45%) y mayor al reportado por García (2003) con 17%. Se ha señalado que contenidos elevados de almidón resistente total de los almidones nativos de papa, plátano y sagú se deben a su particular organización cristalina que los hace menos susceptibles a la hidrólisis enzimática (Hernández, 2006). De manera similar ocurre con los almidones de mapuey y de apio, debido al elevado contenido de almidón resistente total obtenido en estas muestras (Tabla 3). Según la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996), estos almidones se encontrarían en el grupo de alimentos con una cantidad de almidón resistente total “muy alta” (más del 15%). Este hecho se corresponde con la baja digestibilidad de estos almidones cuando se consumen crudos (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992). Por su parte, el almidón de ocumo chino presentó una cantidad de almidón resistente total “alta” (entre 5,0–15%), lo que sugiere una organización cristalina un poco más susceptible a la hidrólisis enzimática, que aquella presente en los almidones de mapuey, papa y apio.

Los almidones provenientes de cereales, raíces y tubérculos presentan patrones de cristalinidad distintos (Hoover, 2001). Desde el punto de vista bioquímico, estas diferencias tienen que ver, por una parte, con la estructura molecular fina de los componentes básicos del biopolímero, la amilosa y la amilopectina; así como también con la manera en que éstas se asocian para formar la estructura supramolecular en la cual

aparecen en los tejidos de reserva: el gránulo de almidón (Gallant y col., 1992; Zobel, 1988b).

Se ha descrito un patrón de difracción de rayos X tipo B para la mayoría de los almidones provenientes de raíces y tubérculos, entre ellos el almidón de mapuey (Pérez y col., 2011) y el almidón de papa (Zobel, 1988a). Esta organización cristalina caracteriza a los almidones pobremente digeribles en estado nativo (AR2) (Englyst y col., 1992) y se ha reportado que ésta es una de las razones por las cuales los almidones señalados son altamente resistentes a la digestión enzimática (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992; Colonna y col., 1992; Gallant y col., 1992; Bello-Pérez y col., 2000). Para el almidón de apio, también se ha reportado un patrón de cristalinidad tipo B (Santacruz y col., 2002). Este almidón presentó un elevado contenido de almidón resistente total, mayor al 7,5% estimado por Galeno (2006).

Por su parte, se ha descrito para el almidón de yuca un patrón tipo C (Gallant y col., 1982) o tipo A (Moothy, 1994 citado por Hoover, 2001), lo que podría reflejar el bajo contenido de almidón resistente total encontrado para este almidón en comparación con el grupo de almidones provenientes de raíces y tubérculos (Tabla 3). También para el almidón de ocumo chino se ha descrito un patrón de difracción de rayos X tipo A (Lim y col., 1994) y más recientemente, Tapia y col. (2012) encontraron en este almidón un polimorfismo entre las estructuras tipo A y B, lo que explicaría el alto contenido de almidón resistente total obtenido en este estudio, en comparación a los almidones que exhiben un patrón tipo A solamente, como los cereales. Hizukuri (1985) reportó para el almidón de ocumo chino una longitud promedio de las cadenas de amilopectina de 25 residuos de glucosa, ésta longitud se encuentra dentro del grupo de almidones con

estructura tipo A, sin embargo, la presencia de cadenas más largas de estructura tipo B, explicaría la baja digestibilidad encontrada para este almidón (Tabla 3).

Los valores de almidón resistente total para los almidones de maíz (regular y ceroso), fueron bajos según la clasificación de Goñi y col. (1996), similar a lo encontrado por García (2003) para el almidón de maíz regular y mayor a lo reportado por Tovar y col. (1999b), Bello-Pérez y col. (2004) y Hernández y col. (2008) para este mismo almidón, con valores entre 0,2–0,4%. El bajo contenido de almidón resistente total se relaciona con el patrón de difracción de rayos X tipo A que presenta este almidón (Gallant y col., 1992), el cual es de alta digestibilidad en estado nativo. Se conoce que los gránulos que poseen este patrón de difracción, como los de almidón de maíz y otros cereales en general, poseen una serie de canales que permiten que las enzimas hidrolíticas tengan acceso al interior del gránulo nativo (Hernández, 2006), aumentando así la digestibilidad del almidón.

La tasa de α -amilólisis *in vitro* aporta información sobre la cinética de la digestión de los almidones (Martín, 2010). Se ha observado que este parámetro se correlaciona con algunas respuestas fisiológicas, como los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, por lo que su estudio ha sido de importancia en el análisis de la biodisponibilidad de almidones (Holm y col., 1985). Por esta razón, puede ser utilizado para predecir de forma bastante confiable la respuesta glucémica postprandial que inducen los alimentos (Tovar y col., 1990; Björck y col., 1994).

Al estudiar la tasa de hidrólisis de diferentes almidones nativos se pudo observar una gran heterogeneidad en los resultados (Tabla 4) lo cual evidencia diferencias en la composición y estructura del gránulo y por ende su susceptibilidad a la digestión

enzimática (Gallant y col, 1992; Tovar, 1992). Diversos investigadores han reportado una baja tasa de hidrólisis enzimática para los almidones crudos (Baker y Woo, 1992; García, 2003; Hernández, 2006; Marín, 2009; Martín, 2010; González-Quilen, 2013). García (2003) y Martín (2009) analizaron el almidón de maíz crudo y encontraron una magnitud final de hidrólisis de 8,7% y 9,6% respectivamente, valores superiores al estimado en el presente estudio. Mientras que González-Quilen (2013) reportó magnitudes finales de 6,5%, parecidas a las obtenidas en este trabajo. Las bajas velocidades iniciales (1,2–1,7%) y magnitudes finales de hidrólisis (2,6–3,0%) encontradas para los almidones de papa, mapuey y ocumo chino crudos (Tabla 4), fueron consistentes con los muy altos contenidos de almidón resistente total estimados en dichos almidones (Tabla 3). En el presente estudio, la magnitud final de hidrólisis del almidón crudo correlacionó negativamente ($r = -0,586$; $p < 0,05$; $n = 14$) con el contenido de almidón resistente. García (2003) reportó para el almidón de papa crudo una magnitud final de 11%, mayor a lo obtenido en este estudio, sin embargo, la fracción de almidón resistente total en este almidón fue mucho menor (17%), lo que sugiere la correlación negativa entre ambas variables.

La relación existente entre la baja tasa de hidrólisis y un alto contenido de almidón resistente total encontrado en estos almidones, no fue observado con el almidón de apio en su estado crudo, que presentó la mayor tasa de α -amilólisis a pesar de tener una elevada fracción de almidón resistente total. No es de esperarse que este almidón presente una alta susceptibilidad a la hidrólisis, dado que presenta un patrón de cristalinidad de tipo B (Santacruz y col., 2002), asociado con una baja digestibilidad.

Baker y Woo (1992) evaluaron la susceptibilidad a la hidrólisis de distintos almidones comerciales en su estado crudo empleando una mezcla de dos α -amilasas

(isoenzimas) purificadas a partir del adulto de *S. oryzae*. Estos investigadores encontraron una alta resistencia a la hidrólisis en los almidones de papa y de yuca (bajas actividades α -amilolíticas), mientras que los almidones de maíz (regular y ceroso) fueron significativamente más susceptibles a la hidrólisis (mayor actividad α -amilolítica). Estos resultados *in vitro* realizados con las α -amilasas purificadas de *S. oryzae*, fueron similares a lo encontrado en esta investigación empleando la α -amilasa pancreática bovina, con la excepción del almidón de yuca que presentó una alta velocidad de hidrólisis en su estado crudo (Tabla 4).

En los almidones gelatinizados la tasa de hidrólisis aumenta notablemente como consecuencia del proceso de gelatinización, lo que se ve reflejado tanto en la velocidad inicial como en la magnitud final de hidrólisis (Tabla 4). En los almidones gelatinizados, las enzimas pueden acceder a una mayor cantidad de sustrato (Colonna y col., 1992), al ocurrir el hinchamiento del gránulo y la posterior desorganización de su estructura cristalina; conduciendo a un incremento de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática.

La mayor tasa de hidrólisis encontrada para el almidón de maíz ceroso crudo y gelatinizado en comparación a la del almidón de maíz regular era un resultado esperado. Se ha mencionado que almidones que presentan un alto contenido de amilopectina son generalmente más digeribles que los enriquecidos en amilosa (Björk y col, 1994). En los almidones *waxy*, la absorción de agua puede estar menos impedida que en los almidones que tienen amilosa en sus capas amorfas (Copeland y col., 2009), lo que favorecería la acción de la α -amilasa pancreática sobre su sustrato (Lovera y col., 2012).

Baker y Woo (1992) también evaluaron la susceptibilidad a la hidrólisis de distintos almidones comerciales gelatinizados, empleando la mezcla de las dos α -amilasas purificadas a partir del adulto de *S. oryzae*. Estos investigadores encontraron actividades α -amilolíticas mayores a las obtenidas con los almidones crudos, pero similares para los almidones gelatinizados de papa, maíz y yuca. Solamente obtuvieron una disminución significativa de la actividad de esta enzima cuando se empleaba como sustrato almidón de maíz *waxy* gelatinizado. Estos resultados no concuerdan con lo obtenido en este estudio para el almidón con un alto contenido en amilopectina y con lo que ha sido reportado en la bibliografía en cuanto a la mayor digestibilidad de este almidón. Posiblemente, los resultados encontrados reflejen las diferencias en cuanto a las características cinéticas y estructurales de las α -amilasas utilizadas en ambos estudios. A pesar de las similitudes encontradas entre las α -amilasas de insectos y mamíferos (específicamente la α -amilasa pancreática porcina), en cuanto a su mecanismo de acción y requerimiento de iones para su activación, como ha sido señalado por Terra y Ferrera (1994), cabe destacar que existen diferencias entre estos dos grandes grupos. Inclusive se ha demostrado que en un mismo insecto existen isoformas que difieren en sus propiedades cinéticas, aun cuando presentan secuencias altamente conservadas, o tales diferencias se evidencian también entre distintas especies de insectos, al verse afectadas de diferente manera por inhibidores proteicos (Baker, 1987; Franco y col. 2002).

Es interesante que los almidones que en estado crudo presentan contenidos muy altos de almidón resistente (almidón de papa, mapuey y apio), se encontraran magnitudes finales de hidrólisis elevadas al ser gelatinizados (Tabla 4). De hecho, la magnitud final de hidrólisis de los almidones gelatinizados, correlacionó positivamente ($r = 0,633$; $p < 0,05$;

$n = 14$) con el contenido de almidón resistente total. Esto sugiere que buena parte de las fracciones resistentes (AR2) presentes en estos almidones, fueron altamente susceptibles al proceso de gelatinización. Sin embargo, este comportamiento no fue observado con el almidón de ocumo chino gelatinizado (Figura 2F). La baja tasa de hidrólisis en este almidón hace que pueda ser empleado como ingrediente en la fabricación de productos comestibles de bajo índice glucémico, en donde aun después del proceso de cocción, permanecen moderados y altos porcentajes de almidón lentamente digerible y de almidón resistente (Zhang, 2012).

Los resultados obtenidos en los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* de los almidones estudiados, ameritan estudios detallados de su comportamiento y destino metabólico *in vivo* (Tovar, 2001b). En este sentido, se ha empleado el bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) para estudios nutricionales, donde se evalúa la digestibilidad *in vivo* de alimentos amiláceos. Estos estudios permiten el análisis de un gran número de muestras en cortos períodos de tiempo, lo que que podría conducir a la identificación de aquellos almidones con características nutricionales de interés que posteriormente puedan ser evaluadas mediante estudios en animales superiores, incluyendo el hombre (González-Quilen, 2013).

El gorgojo de arroz presenta una alta supervivencia al ser mantenidos en la condición alimentada y en la dieta de referencia (Figura 3), similar a lo reportado por diferentes autores en estudios nutricionales realizados empleando este animal como modelo biológico (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col. 1998; García, 2003; Galeno, 2006; Lovera; 2008; Martín, 2010; González-Quilen, 2013). Estos resultados reafirman la utilización de la condición alimentada (con arvejas partidas y peladas) como una dieta rica

en nutrientes para el mantenimiento de los cultivos y a la dieta de referencia (almidón de maíz) como dieta basal, con un aporte limitado pero suficiente de nutrientes.

Cuando los insectos son sometidos a una restricción alimentaria total (condición de ayuno), la supervivencia disminuye de manera similar a lo reportado por Galeno (2006), Lovera (2008) y Martín (2010), con una supervivencia al cabo de 8 días de 81%, 88% y 77%, respectivamente. Se ha reportado que la tasa de mortalidad incrementa notablemente a partir del sexto día (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998; Lovera, 2008; Martín, 2010), como se muestra en la Figura 3. En el ayuno prolongado, la muerte sobreviene cuando se utilizan como nutrientes, las proteínas que desarrollan funciones vitales para el organismo, como lo es el sistema enzimático de la cadena respiratoria (Klieber, 1975 citado por López, 1999).

La pérdida de peso en los insectos mantenidos en ayuno fue similar a lo reportado por Lovera (2008) y González-Quilen (2013) con 19% y 23%, respectivamente y menor a la obtenida por Galeno (2006) y Martín (2010) con 27% y 26%, respectivamente. Mientras mayor sea el tiempo en ayuno mayor será la pérdida de peso en los insectos, esto refleja la utilización de las reservas energéticas en el transcurso del bioensayo, principalmente el contenido de grasa corporal.

En la condición alimentada y la referencia, los insectos mantuvieron una ganancia de peso de 6% al final del ensayo (Figura 5). Estos resultados fueron comparables a los reportados por Lovera (2008) con una ganancia de peso de 4%, quien además encontró que los insectos incrementaban de peso de manera progresiva a medida que transcurría el tiempo. Sin embargo, en este estudio, el aumento de peso ocurrió al segundo día del

bioensayo y este peso se mantuvo constante hasta finalizar el experimento. González-Quilen (2013) reportó una ganancia de peso de 8% y 5% para la condición alimentada y la dieta de referencia, respectivamente. Mientras que Galeno (2006) estimó una ganancia de peso de 10% en la condición alimentada.

La mayoría de los almidones analizados promovieron una ganancia de peso en el insecto y pueden ser ingeridos sin generar toxicidad. Resultados similares han sido reportados por Galeno (2006) para el almidón de apio y por Martín (2010) y González-Quilen (2013) para algunos almidones de banano. Sin embargo, la disminución de la supervivencia (Figura 4) y del peso (Figura 6) en los insectos alimentados con una dieta de almidón de papa crudo, sugiere una toxicidad moderada de este almidón sobre el gorgojo de arroz, según la clasificación propuesta por Gamero (2009). Galeno (2006) reportó supervivencias de 80–85% para las dietas poco biodisponibles de almidón de papa y de plátano, valores ligeramente superiores a lo obtenido en dicho estudio para la condición de ayuno (81%). Esta autora atribuyó la disminución de la supervivencia en los insectos, a los altos contenidos de almidón resistente determinados *in vitro*, presentes en los almidones de papa y de plátano.

García (2003) reportó para los almidones poco digeribles de papa y de *Canavalia ensiformis* (haba de burro), pérdidas de peso corporal del 5% y 10%, respectivamente. Por su parte, Galeno (2006) obtuvo sensibles variaciones en los insectos alimentados con la dieta de almidón de papa y de plátano, que alcanzaron entre 15–20% de disminución, mayor a lo obtenido en el presente estudio para el almidón de papa (Figura 6). Esta pérdida importante de peso con la dieta de almidón de papa podría estar relacionada con la disminución de la supervivencia de los insectos (Figura 4).

En el presente estudio, los biomarcadores supervivencia y variación de peso de los insectos correlacionaron negativamente con el contenido de almidón resistente total ($r_{\text{Sup}} = -0,611$; $r_{\text{Var.P}} = -0,610$; $p < 0,05$; $n = 21$) y positivamente con el contenido de almidón disponible ($r_{\text{Sup}} = 0,751$; $r_{\text{Var.P}} = 0,809$; $p < 0,05$; $n = 21$), lo que explicaría lo obtenido con la dieta de almidón de papa crudo. El bajo contenido de almidón disponible y el elevado contenido de almidón resistente total encontrado con el almidón de papa (Tabla 3), podría afectar el suministro de nutrientes y con ello, la movilización de las reservas energéticas del insecto para garantizar la supervivencia durante los 8 días del bioensayo. En este sentido, Galeno (2006) reportó una disminución de 20% en el contenido de grasa corporal de los insectos alimentados con el almidón de papa, en comparación con la referencia. Además, realizando un análisis de correlación múltiple encontró que la grasa corporal del insecto correlacionó negativamente con el contenido de almidón resistente total y positivamente con el contenido de almidón disponible y la tasa de hidrólisis. Estos resultados sugieren la movilización de las reservas energéticas del insecto como consecuencia de la ingesta de dietas amiláceas. No obstante, este comportamiento encontrado con el almidón de papa, no fue observado en los insectos alimentados con los almidones de mapuey y de apio, los cuales presentan un elevado contenido tanto de almidón resistente total como de almidón disponible (Tabla 3). En este caso, Galeno (2006) encontró un aumento de la grasa corporal en los insectos alimentados con el almidón de apio (20%), aspecto que explicaría la alta supervivencia y la ganancia de peso en estos insectos (Figura 4 y 6, respectivamente). Las diferencias encontradas entre estos almidones, sugiere que la baja biodisponibilidad del almidón de papa pudiera deberse también, a otros factores presentes en este almidón.

Además de lo señalado, podría existir un efecto directo del almidón resistente sobre el metabolismo lipídico del insecto, como ha sido reportado en varios estudios (Daubioul y col., 2000; López y col., 2000; Delzenne y Kok, 2001; Marti del Moral y col., 2003). Por ejemplo, en ratas o hámsters alimentados con dietas ricas en carbohidratos se ha encontrado una disminución de los triglicéridos hepáticos y séricos cuando fructanos tipo inulina, almidón resistente de arroz, almidón de papa o amilomaíz (ricos en AR2) se añaden a la dieta durante varias semanas. En estos animales, la disminución de la triacilgliceridemia suele ir unida a una menor lipogénesis de *novo* en hígado, pero no en células del tejido adiposo. Adicionalmente, la producción de altas concentraciones de propionato mediante fermentación, se ha propuesto como un mecanismo que explicaría la disminución de los niveles séricos y hepáticos del colesterol en ratas alimentadas con almidones resistentes y fructanos (Delzenne y Kok, 2001).

La supervivencia y la variación de peso fueron biomarcadores apropiados para cuantificar los efectos de tratamientos extremos como el ayuno, pero no permitieron evidenciar mayores diferencias entre grupos de insectos alimentados con almidones que difieren en su digestibilidad *in vitro*, con la excepción del almidón de papa. Sin embargo, estos resultados sugieren diferencias en la utilización de estos almidones, por el insecto, para cubrir sus requerimientos nutricionales (Galeno, 2006), sobre todo en aquellos almidones que presentan un elevado contenido de almidón resistente total y un bajo tenor de almidón disponible como el almidón de papa. En el presente estudio, ambos parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* del almidón correlacionaron negativamente entre sí ($r = -0,549$; $p < 0,05$; $n = 21$).

Las α -amilasas son enzimas ampliamente estudiadas en insectos, fundamentalmente aquellos pertenecientes al orden coleóptera (Baker, 1987; Baker y Woo, 1992; Alarcón y col., 2004; Dojnov y col., 2008), por constituir plagas de importantes cultivos agrícolas a nivel mundial. Estos insectos utilizan el almidón como principal fuente de energía, de allí la importancia del estudio de estas hidrolasas.

Dada la importancia de estas enzimas en los insectos, se ha empleado la estimación de la actividad α -amilolítica como parámetro para evaluar la digestibilidad *in vivo* de los almidones, utilizando como modelo animal al gorgojo de arroz, *S. oryzae*. En este sentido, se ha descrito que un alto contenido de almidón resistente total ejerce un efecto sobre la actividad similar a α -amilasa. Por ejemplo, cuando el insecto es alimentado con almidones que presentan un alto tenor de fracciones resistentes, esto hace que se produzca una mayor cantidad de enzima para tratar de digerir el alimento rico en estas fracciones (Galeno, 2006). En consecuencia, la actividad enzimática resulta elevada (Tabla 6), en comparación a la obtenida con la referencia.

La mayor actividad α -amilolítica en los insectos alimentados con los almidones de papa y mapuey en estado crudo (ricos en fracciones altamente resistentes), en comparación a la registrada con el almidón de referencia (Tabla 6), ha sido reportada también por diversos investigadores (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010 y González-Quilen, 2013). Estos autores, evidenciaron que las dietas amiláceas poco digeribles como los almidones de papa y de banano, tienden a promover en el gorgojo de arroz actividades α -amilolíticas superiores a la registrada en la referencia. Por ejemplo, Galeno (2006) reportó para el almidón de papa una actividad enzimática 9 veces superior a la obtenida para el almidón de referencia, casi el doble de la estimada en el presente estudio (Tabla 6).

Los estudios de digestibilidad *in vitro* empleando la mezcla de las dos α -amilasas intestinales purificadas a partir del adulto de *S. oryzae*, realizados por los investigadores Baker y Woo (1992), demostraron que esta enzima es menos activa para degradar gránulos de almidón intactos y que el proceso de masticación y la acción de las lipasas que se encuentran en el lumen del intestino medio de *S. oryzae* y/o de detergentes, juegan una acción importante en la digestión de estos almidones crudos. Las bajas actividades α -amilolíticas reportadas para los almidones de papa y yuca (altamente resistentes a la hidrólisis) y las mayores actividades encontradas para los almidones de maíz (regular y ceroso), significativamente más susceptibles a la hidrólisis, no concuerdan con lo reportado en este estudio, al evaluar la digestibilidad *in vivo* de estos almidones en estado crudo. Es importante resaltar que en estudios *in vivo* existen una serie de factores que pueden afectar la actividad de las α -amilasas (Baker y Woo, 1992; Tovar, 1992). Además, se ha descrito que la acción de la α -amilasa durante el tránsito del almidón en el buche y en el intestino medio del adulto de *S. oryzae*, no es un proceso completamente eficiente porque gránulos no digeridos (al menos gránulos no completamente degradados), son observados con frecuencia en el intestino posterior (Baker y Woo, 1992). Se ha reportado que en *Tenebrio molitor* sólo un 59% de los gránulos de almidón ingeridos son degradados (Evans y Goodliffe, 1939 citado por Baker y Woo, 1992), a pesar de que en estas especies de coleópteros la α -amilasa intestinal presenta una alta actividad.

En comparación con el almidón de referencia, los almidones estudiados pueden ser agrupados de menor a mayor digestibilidad tomando en cuenta este parámetro: 1) almidones de menor digestibilidad que la referencia (papa y mapuey), 2) almidones de

igual digestibilidad que la referencia (maíz, ocumo chino, yuca, y apio), y 3) almidón de mayor digestibilidad que la referencia (maíz *waxy*).

Los estudios nutricionales han demostrado de manera consistente, que la actividad similar α -amilasa del gorgojo de arroz *S. oryzae*, puede correlacionarse con los parámetros de digestibilidad *in vitro* de los almidones (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010; González-Quilen, 2013). En este sentido, la medición de algunos parámetros como el contenido de almidón disponible y el contenido de almidón resistente total, podrían en conjunto, ser indicativo de su digestibilidad *in vivo* en *S. oryzae*. Esto sería ventajoso y de gran utilidad práctica cuando se trabaja con un grupo de dietas almidáceas que difieren ampliamente en sus propiedades nutricionales, lo que permitiría predecir en una primera instancia y sin realizar las determinaciones experimentales, cuáles almidones tendrían o no una alta digestibilidad *in vivo*.

En esta investigación, se obtuvo una correlación positiva ($r = 0,833$; $p < 0,05$; $n = 21$) entre la actividad similar a α -amilasa y el contenido de almidón resistente total, lo que sugiere que a mayor contenido de almidón resistente total presente en el almidón, mayor será la actividad similar α -amilasa de los insectos alimentados con estos almidones. En contraste, la actividad similar α -amilasa correlacionó negativamente ($r = -0,694$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón disponible. Estas correlaciones entre la actividad similar a α -amilasa y el contenido de almidón resistente total, concuerdan con las obtenidas por García (2003), Galeno (2006) y Martín (2010).

Además, se encontró una correlación negativa ($r = -0,594$; $p < 0,05$; $n = 14$) entre la actividad similar a α -amilasa y la magnitud final de hidrólisis para los almidones crudos.

Por ejemplo, los gránulos de almidón de maíz *waxy* fueron hidrolizados más rápidamente que los gránulos que contenían cantidades significativas de amilosa. Esto fue evidenciado en una mayor magnitud final de hidrólisis de los almidones de maíz *waxy* crudos (Tabla 4; Figura 2A y B) y este almidón también promovió una baja actividad amilolítica en los insectos (Tabla 6), lo que indica una mayor biodisponibilidad de este almidón en comparación al almidón de maíz regular. García (2003) y Galeno (2006) también encontraron ésta correlación.

Martín (2010) y González-Quilen (2013) sugirieron la existencia de una relación inversa entre la digestibilidad de la dieta y la actividad α -amilolítica del insecto, lo que 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 Beckel, 1982; Magoulas y col., 1993). Más recientemente, se ha comprobado que en *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), la expresión del gen de la α -amilasa está regulada por la biodisponibilidad de los azúcares reductores, la sacarosa y del almidón (Hemlata y col. 2012). Por su parte, estudios en larvas de diferentes especies de coleópteros, también han demostraron que la composición de la dieta es un determinante en la actividad α -amilasa del animal (Wool y col., 1986; Alarcón y col., 2004) y la inducción de las α -amilasas puede ocurrir como respuesta a la ingesta de diferentes dietas (Silva y col. 1999), sean amiláceas, proteicas o una combinación de ambas. Es importante resaltar que la carencia de proteína en la dieta puede limitar la síntesis de *novo* de α -amilasas, incluso en presencia de su propio sustrato, causando una disminución aparente de las α -amilasas digestivas (Alarcón y col. 2004).

Además del control a nivel de la cantidad de enzima que se expresa en un momento dado, en una célula y tejido en particular, a través de la represión o inducción de los genes que la codifican, también puede ocurrir una regulación a nivel de la actividad de la enzima, es decir, cambios en la velocidad de reacción y en la afinidad de unión a su respectivo sustrato ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m). En este sentido, la disminución de la actividad de la α -amilasa podría estar relacionada con una inhibición de su actividad. Se ha descrito que la liberación y posterior difusión de los productos de hidrólisis como la maltosa y la maltotriosa desde los gránulos, podría influir de manera significativa sobre la velocidad de hidrólisis de los almidones (Colonna y col., 1988 citado por Copeland y col., 2009), actuando como una inhibición por acumulación de productos.

En los animales uricotélicos, el exceso de proteína de la dieta, que no es usada para la síntesis proteica, es desaminada y el nitrógeno es excretado principalmente en forma de ácido úrico (Lovera, 2008). Asimismo, el consumo de proteínas de baja calidad resulta en el incremento de este producto de excreción, como un mecanismo para deshacerse del exceso de nitrógeno no aprovechable (Carmona y col., 2001).

La excreción de ácido úrico por el gorgojo de arroz ha resultado ser un excelente biomarcador para evaluar la calidad nutricional de diversas proteínas (López, 1999), de almidones modificados (García, 2003; Galeno, 2006) o de almidones de banano con diferentes genotipos (Martín, 2010; González-Quilen, 2013), en la búsqueda de fuentes amiláceas no convencionales o alternativas de importancia comercial, con nuevas propiedades funcionales y nutricionales.

La acreción de nitrógeno y preservación de la proteína corporal como consecuencia de una ingesta adecuada de carbohidratos, es un fenómeno ampliamente conocido y estudiado en los animales superiores (Munro, 1951). En el gorgojo de arroz, la excreción de ácido úrico ha evidenciado relacionarse inversamente con la biodisponibilidad de los almidones (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010; González-Quilen, 2013) y de otras dietas farináceas (Alexander Laurentin, comunicación personal), lo que sugiere que este efecto protector del carbohidrato sobre la proteína corporal no es un fenómeno ajeno a los insectos (González-Quilen, 2013). En este sentido, la ingesta de una dieta amilácea altamente digerible y por ende de alta disponibilidad de carbono y energía, previene la degradación de la proteína corporal y propicia una baja excreción de ácido úrico. Por el contrario, una dieta amilácea poco biodisponible, promueve en el insecto la utilización de la proteína corporal como un nutriente energético; así, el catabolismo proteico se ve reflejado en una excreción incrementada del metabolito (González-Quilen, 2013).

La excreción de ácido úrico también puede ser alta en dos condiciones: 1) durante la restricción alimentaria total, en la cual, el insecto recurre a sus reservas corporales de proteínas; siendo degradadas para mantener un balance favorable en el fondo de aminoácidos (Lovera, 2008) y 2) con la ingesta de dietas proteicas, como las arvejas en la condición alimentada (contiene 27% de proteínas según Rojas, 2007), en las cuales, el exceso de aminoácidos que no es utilizado, se desamina y el nitrógeno se excreta como ácido úrico. En este sentido, el contenido de proteína del alimento puede influir en el desempeño del biomarcador como indicador de la digestibilidad, cuando existe un exceso en relación a los niveles óptimos de proteína del insecto (entre 0,5–0,7%, según López, 1999). El contenido de proteína de la mayoría de los almidones estudiados fue menor a

0,20%, con la excepción del almidón de ocumo chino, cuyo contenido de proteína fue de 0,54% (Tabla 2).

Exceptuando los almidones de apio, mapuey y papa que presentaron la mayor excreción de este metabolito (entre 2,7–7,0 veces más que la referencia), el resto de las dietas promovieron excreciones entre 0,72–1,39 veces superiores a la registrada en la referencia (Tabla 7). García (2003) y Galeno (2006) reportaron una excreción entre 8–10 veces superior en los insectos alimentados con la dieta de almidón de papa, similar a lo obtenido en el presente estudio, mientras que Galeno (2006) obtuvo una baja excreción con una dieta de almidón de apio, similar a la estimada en la referencia.

En comparación al almidón de referencia, los almidones estudiados pueden también ser agrupados de menor a mayor digestibilidad, en cuanto a este parámetro: 1) almidones de menor digestibilidad que la referencia (papa, mapuey y apio) y 2) almidones de igual digestibilidad que la referencia (maíz regular, maíz *waxy*, ocumo chino y yuca).

En su estado nativo, una buena parte de los almidones de baja digestibilidad, pasa a través del tracto gastrointestinal del insecto sin experimentar cambios sustanciales, debido a las características de los polímeros constituyentes y a su patrón de cristalinidad del tipo B, aspectos que los hacen altamente resistentes al ataque enzimático (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992), como lo confirma los elevados contenidos de almidón resistente total estimados para los almidones de mapuey, papa y apio (Tabla 3). La alta excreción de ácido úrico en el almidón de papa y de mapuey concuerda con la alta actividad α -amilolítica encontrada (Tabla 6), lo que reafirma una vez más su baja biodisponibilidad y su menor calidad nutricional. Sin embargo, esto no fue obtenido para el almidón de apio, donde a

pesar de encontrarse una alta excreción de ácido úrico se promovió una baja actividad α -amilolítica en los insectos. En este caso, los dos biomarcadores clasificaron al almidón de apio en una categoría diferente según su digestibilidad.

Por su parte, con los almidones de mayor digestibilidad se evita significativamente la pérdida de nitrógeno en el insecto, es decir, estos almidones tienen un marcado efecto protector sobre las proteínas corporales (Munro, 1951). En este caso, la baja excreción de ácido úrico en los almidones de maíz (regular y ceroso), de ocumo chino y de yuca, concuerda con la baja actividad α -amilolítica obtenida (Tabla 6), lo que reafirma su alta biodisponibilidad y por lo tanto, su mayor calidad nutricional.

En este estudio, el biomarcador excreción de ácido úrico correlacionó negativamente ($r = -0,789$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón disponible y positivamente ($r = 0,855$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón resistente total, sin embargo, no se obtuvo correlación alguna con la velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis. García (2003), Galeno (2006) y González-Quilen (2013) empleando almidones de distinto origen botánico, encontraron correlaciones significativas entre el biomarcador excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz y los parámetros almidón resistente total y magnitud final de hidrólisis. No obstante, Martín (2010) en un estudio de la digestibilidad de cinco clones de almidón de banano, no obtuvo correlación alguna entre este biomarcador y los parámetros de digestibilidad *in vitro*.

Los biomarcadores actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico resultaron ser buenos parámetros para comparar la calidad nutricional y el aporte de nutrientes en dietas de almidones nativos de diferente composición y digestibilidad. Ambos

biomarcadores correlacionaron entre sí de manera positiva ($r = 0,924$; $p < 0,05$; $n = 24$) y en los dos biomarcadores se obtuvo un mismo ordenamiento de los almidones de acuerdo a su digestibilidad *in vivo*, con la excepción de los almidones de apio y maíz ceroso. En este caso, el biomarcador excreción de ácido úrico ubicó al almidón de apio como de menor digestibilidad que la referencia y al maíz ceroso como de igual digestibilidad que la referencia, en comparación con el biomarcador actividad similar a α -amilasa, que ubicó a los almidones de apio y maíz ceroso como de igual y mayor digestibilidad que la referencia, respectivamente.

Estos biomarcadores también presentaron una correlación negativa con la supervivencia ($r_{ASA} = -0,895$; $r_{EAU} = -0,873$; $p < 0,05$; $n = 24$) y la variación de peso ($r_{ASA} = -0,891$; $r_{EAU} = -0,877$; $p < 0,05$; $n = 24$) en el insecto, de allí su importancia en ser utilizados en estudios de digestibilidad *in vivo* como indicadores del aprovechamiento biológico de dietas amiláceas, sobretodo de almidones que presentan contenidos muy altos de almidón resistente total y bajos de almidón disponible, como el almidón de papa.

La combinación de estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la digestibilidad de almidones provenientes de distintas fuentes botánicas, resulta en una mejor comprensión de su calidad nutricional. Tomando en cuenta las limitantes que cada uno de estos ensayos tiene, así como los diversos factores intrínsecos y extrínsecos al alimento, que pueden afectar su digestibilidad, es posible agrupar los distintos almidones estudiados de acuerdo a su biodisponibilidad e identificar materias primas con excelentes propiedades nutricionales, que podrían ser utilizadas para la formulación de productos alimenticios que posean un valor agregado, como por ejemplo, un elevado contenido de almidón resistente total y con ello, ofrecer al consumidor importantes beneficios fisiológicos.

Formulación y caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles

Los plastificantes empleados en la formulación de películas comestibles a base de almidón influyen de manera notable sus propiedades mecánicas. Por ejemplo, se ha reportado que a medida que aumenta la concentración de glicerol en la solución formadora de película, se obtienen películas más firmes y elásticas (Rojas, 2007). Además, la interacción del almidón con otros componentes como proteínas y lípidos, puede afectar las propiedades de textura de las películas y las coberturas comestibles, ya que estos compuestos interactúan entre sí formando estructuras complejas. Por lo tanto, las propiedades intrínsecas del material polimérico y su disposición estructural en relación a los demás componentes presentes en la matriz, son factores clave en la comprensión de las propiedades mecánicas globales de los alimentos (Rosenthal, 2001) y, en este caso, de las películas comestibles.

Uno de los ensayos más comúnmente aplicados en la industria de alimentos para medir las propiedades mecánicas, es el ensayo tipo punción, en el que una sonda penetra en el material alimentario y se mide la profundidad o la fuerza de penetración. Aunque es muy importante determinar la fuerza necesaria para penetrar la película comestible, muy pocos estudios con almidones han reportado este parámetro (Ortiz, 2010). La fuerza y la dureza a menudo se confunden y es importante diferenciar entre ellas. La fuerza se define como el esfuerzo máximo que un objeto soportará antes de que se rompa, mientras que la dureza, es la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares, también definida como

la resistencia del alimento a la rotura (Rosenthal, 2001). Por consiguiente, un material fuerte no necesariamente necesita ser duro.

Pérez y col. (2012) reportaron una fuerza de punción o dureza de 1,1 N en películas de almidón de mapuey al 5% y 1,5% de glicerol, mientras que Ortiz (2010) reportó una dureza de 1,25 N para películas a base de almidón de plátano al 5% con 2% (v/v) de glicerol, similar a lo encontrado para las películas de almidón de mapuey y de yuca (Tabla 11). Sin embargo, Romero-Bastidas y col. (2005) en películas de almidón de plátano al 3% con 1,5% de glicerol, obtuvieron una dureza de aproximadamente 4,1 N, superior a lo encontrado en las películas de almidón estudiadas. Posiblemente, la diferencia se deba al origen botánico de los almidones utilizados y también, a que en el presente estudio se empleó una concentración mayor de glicerol. Gontard y col. (1992) y Mali y col. (2004a) al investigar películas de gluten y almidón de ñame respectivamente, señalan que al aumentar la concentración de glicerol disminuye la fuerza de punción de manera significativa.

La acción sinérgica entre el agua y el glicerol (como también la de otros polioles), le confiere plasticidad al almidón (Psomiadou y col., 1996). El glicerol por ser una molécula pequeña, se alinea espacialmente entre las cadenas del almidón, haciendo una red más intrincada, capaz de resistir a fuerzas de estiramiento. Además, disminuye las atracciones intermoleculares entre las cadenas del polímero, lo cual reduce los puentes de hidrógenos internos y produce regiones de alta movilidad, debido a la incorporación de humedad. Como consecuencia, aumenta la flexibilidad y la elasticidad de las películas y se reduce la fuerza ténsil (Psomiadou y col., 1996). Rosenthal (2001) define a un material elástico como aquel que se deforma inmediatamente en cierta extensión cuando se aplica un

esfuerzo y recuperan su forma original una vez que el esfuerzo se ha eliminado. Este autor define el esfuerzo como la fuerza ejercida sobre el material, la cual ocasiona el estiramiento de los enlaces interatómicos que sujetan el material junto.

Mali y col. (2004b) estudiaron las propiedades mecánicas de las películas a base de almidón de ñame, yuca y maíz. Estos autores encontraron que todas las películas que contenían agentes plastificantes eran más flexibles y tendían a romperse menos a medida que el contenido de glicerol incrementaba en estas preparaciones. El efecto del plastificante sobre las propiedades mecánicas de las películas comestibles ha sido previamente reportado por diferentes investigadores (Myllärinen y col., 2002a; Parra y col., 2004; Jansson y Thuvander, 2004; Mali y col. 2004a; Chillo y col., 2008; Cao y col., 2008; Bourtoom, 2008; López y col., 2008), tanto en películas a base de carbohidratos como de proteínas.

A simple vista, las películas de almidón de apio y yuca resultaron ser las más flexibles y elásticas de las formulaciones seleccionadas (Tabla 8). Sin embargo, la prueba de punción no reflejó diferencias significativas en el parámetro de elasticidad, pero si en cuanto a los parámetros de dureza, fracturabilidad y adhesividad de las mismas (Tabla 11).

Los alimentos basados en almidón son sistemas complejos de multicomponentes, conteniendo almidón, proteínas, lípidos, azúcares, solutos y agua (Rosenthal, 2001). Estos componentes interactúan entre sí lo que puede modificar las propiedades estructurales y mecánicas finales de la matriz alimenticia. Por esta razón, la composición proximal de los almidones estudiados puede tener un efecto sobre las propiedades mecánicas de las películas comestibles. Por ejemplo, en este estudio se encontró una correlación positiva

($r = 0,588$; $p < 0,05$; $n = 21$) entre la elasticidad de las películas y el contenido de proteína de los almidones extraídos, así como una correlación positiva entre el contenido de humedad y la fracturabilidad de la películas ($r = 0,525$; $p < 0,05$; $n = 20$), contraria a la encontrada con el parámetro de adhesividad ($r = -0,738$; $p < 0,05$; $n = 20$). La fracturabilidad o fragilidad es la fuerza a la que un material se fractura y la adhesividad es definida como el trabajo requerido para retirar el alimento de la superficie. Los alimentos frágiles nunca son adhesivos (Rosenthal, 2001), de allí la correlación inversa entre estos dos parámetros de textura ($r = -0,541$; $p < 0,05$; $n = 21$).

El estudio morfológico por microscopía electrónica de barrido demostró que la película de almidón de yuca era laxa y presentaba una matriz interna homogénea y compacta, con superficies lisas no diferenciadas del resto de la película (Figura 8D). Otros autores estudiaron la microestructura de las películas a base de diferentes carbohidratos (almidón de yuca, agar y arabinosilano) y encontraron que la película de almidón de yuca era irregular y presentaba una estructura heterogénea (Phan The y col., 2009). Estos autores describieron a las capas que se encuentran en contacto con el medio externo, como las superficies de evaporación durante el proceso de secado. Estas superficies se caracterizan por presentar una estructura granular y porosa, características no observadas en el presente estudio para las películas de almidón de yuca (Figura 8D). Por su parte, Phan The y col. (2009) consideraron homogéneas y densas a las películas de agar y arabinosilano, porque en el corte transversal se evidenciaba una sección continua que no presentaba poros ni grietas y las dos caras superficiales eran igualmente compactas y densas, similar a lo obtenido en el presente estudio para la película de almidón de yuca y de papa (Figura 8D y G).

Alanis-López y col. (2010) estudiaron por microscopía electrónica de barrido la superficie y el corte transversal de películas de almidón de plátano. Estos autores encontraron zonas lisas debido a la estructura compacta de las películas, lo que atribuyeron al efecto de la combinación de dos agentes plastificantes (glicerol y sorbitol, 50:50 p/p) y también, observaron algunas rugosidades y pliegues en las películas. Sin embargo, las películas en presencia de los plastificantes resultaron más homogéneas y no se observaron poros ni fracturas. Resultados similares fueron reportados por López y col. (2008), quienes realizaron micrografías a películas elaboradas con almidón de maíz acetilado y hechas por vaciado en placa. Las películas que no contenían plastificantes, presentaban fracturas y poros, tanto en el corte transversal como en la toma superficial de la película. Las zonas lisas (Figura 8A, D, E y G) y la presencia de rugosidades en algunas películas (Figura 8C y F), fue similar a lo encontrado en el presente estudio. No obstante, a diferencia de Alanis-López y col. (2010), no se observaron gránulos sin gelatinizar en dichas rugosidades. Sin embargo, la presencia de grietas (Figura 8A, B, C, E y F) y líneas de fracturas en algunas de las películas (Figura 8B, C, E y F), sugiere una estructura menos homogénea o un efecto del tiempo de almacenamiento.

En la Figura 12 se muestra el efecto del tiempo de almacenamiento de la película comestible de almidón de maíz *waxy* sobre la morfología de la misma. Se puede observar claramente cómo las películas que presentaban una semana de almacenamiento para el momento en que fue realizado el estudio morfológico, carecen de líneas de fractura y grietas, la superficie es totalmente lisa y el interior de la película se evidencia más laxo y homogéneo que aquella película que tenía 9 meses de almacenamiento. Este efecto también fue observado en la película de almidón de yuca (resultados no mostrados).

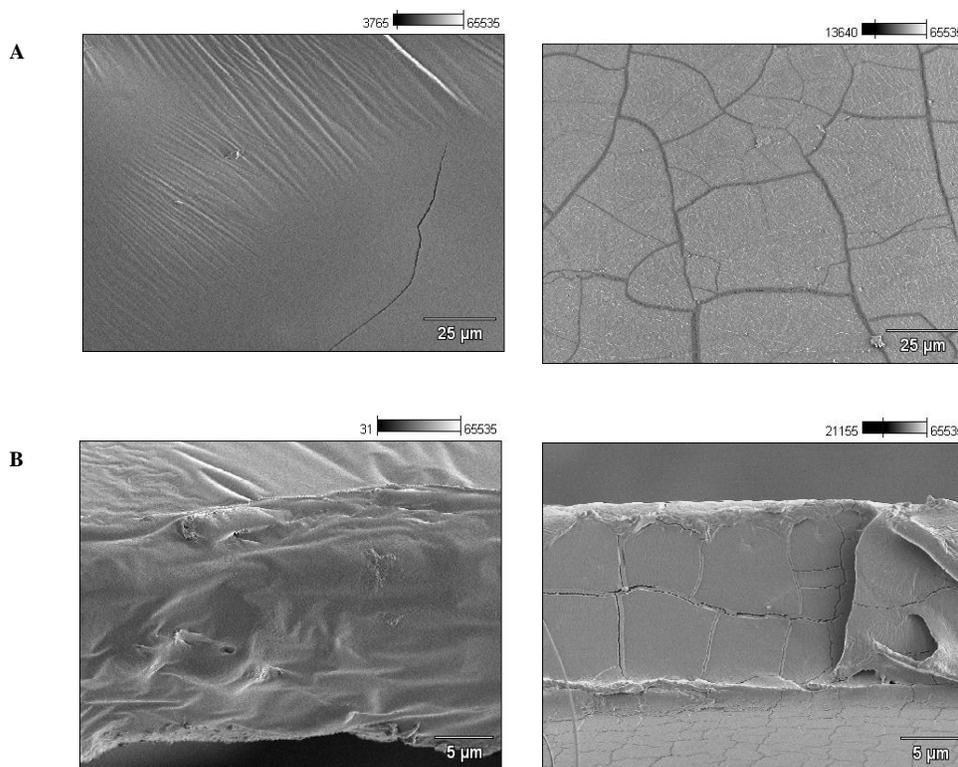


Figura 12. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la morfología de las películas comestibles a base de almidón de maíz *waxy*.

Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido. A) Vista de la superficie y B) Vista de perfil. La columna de la izquierda y de la derecha son películas con una semana y 9 meses de almacenamiento, respectivamente.

Otros estudios de microscopía electrónica de barrido también demuestran que las películas de almidón presentan una estructura homogénea (Romero-Bastida y col., 2005; Mathew y Abraham, 2008; Ortiz, 2010). Una matriz homogénea es un buen indicador de la integridad estructural de la película, y consecuentemente, de buenas propiedades mecánicas (Mali y col., 2002).

La forma como interactúan entre sí los componentes de la mezcla formadora de película, influye sobre las características morfológicas y propiedades mecánicas de las mismas. Por ejemplo, se ha reportado que cuando se formulan películas haciendo mezclas

de carbohidratos, se observan cambios morfológicos que se deben a las diferencias existentes en la interacción intramolecular durante la formación de la matriz tridimensional de la película y a la aparición de fases de separación, en el caso de mezclas de polímeros incompatibles (Phan The y col., 2009).

En el presente estudio las películas presentaron diferencias en sus parámetros de dureza, fracturabilidad y adhesividad (Tabla 11), lo que sugiere además, un efecto de la fuente de almidón sobre la cohesividad de las películas formuladas. Las diferencias morfológicas y mecánicas encontradas entre las películas estudiadas, podrían estar relacionadas con las características intrínsecas de los almidones empleados para su formulación y a la capacidad de estos, para formar una matriz polimérica con suficiente cohesión que le confiera una alta resistencia a la ruptura luego del estiramiento.

López y col. (2010) utilizaron un almidón de maíz modificado con bajo contenido de amilosa (entre 12–14% en comparación con un 24% en el almidón nativo) y encontraron que este almidón presentaba las mejores características para formar películas, ya que eran más transparentes y se podían remover fácilmente de la cápsula. Los autores explican que a pesar de que tenía un bajo contenido de amilosa (polímero principalmente responsable de la capacidad formadora de película de los almidones), sus cadenas probablemente presentaban un elevado grado de polimerización, reforzando su habilidad para formar una matriz continua. Esto último, se favorece además por el tipo de modificación química que los autores realizaron al almidón (acetilado y entrecruzado). López y col. (2008) también reportaron que las películas preparadas con este almidón exhibían una muy buena flexibilidad y adecuadas propiedades de barrera, además de la ventaja de ser biodegradables.

Con el presente estudio se comprueba que la capacidad de formar películas de los almidones no solo viene dada por el contenido de amilosa como Mali y col. (2004a) lo afirman, pues un almidón *waxy* presentó esta capacidad. De manera que, la amilopectina debe conferir esta propiedad como fue demostrado por Myllärinen y col. (2002a), quienes también señalan que este polímero parece ser más sensible que la amilosa, a la plastificación causada por el glicerol. A pesar de que las películas de amilosa y amilopectina difieren en sus propiedades mecánicas, el glicerol afecta de manera similar el comportamiento de ambas películas (Myllärinen y col. (2002a). Además, el grado de polimerización puede jugar un papel importante en el desarrollo de una matriz polimérica cohesiva, pues se conoce que la amilopectina puede presentar cadenas cortas, medianas y largas, que se encuentran interaccionando y creando la estructura polimérica. El contenido de amilopectina en un almidón parece estar relacionado con las propiedades extensivas de las películas, es decir, flexibilidad y elasticidad principalmente, lo cual es una consecuencia directa del grado de compactación de la matriz polimérica. En este sentido, una matriz más laxa es indicio de una matriz menos fuerte y de menor cohesividad, lo que se traduce en una mayor flexibilidad y elasticidad de la película. Esto fue observado con la película de yuca (Tabla 8 y Figura 8D). Este tipo de película, al contrario de aquellas más compactas como la de almidón de mapuey (Figura 8C), tendrá propiedades de barrera diferentes así como también, un comportamiento característico en soluciones acuosas (solubilidad y retención de agua; Tabla 9).

En general, todas las películas seleccionadas presentaron buena manejabilidad, por lo que se infiere su potencial como matrices poliméricas de soporte, adecuadas para añadir

componentes funcionales e ingredientes diversos con la finalidad de diseñar propiedades particulares para aplicaciones específicas.

El grosor es un parámetro que influye sobre las propiedades mecánicas de las películas comestibles a base de almidón (Jansson y Thuvander, 2004). En el presente estudio, la película de almidón de mapuey presentó tanto el mayor grosor (Tabla 9) como la mayor dureza y fracturabilidad entre las películas estudiadas (Tabla 11). Mali y col. (2004a) reportaron que a medida que el grosor aumenta también lo hace la resistencia a la fuerza de punción, es decir, las películas se hacen más duras. Estos autores encontraron la mayor fuerza de punción para la película de almidón de ñame al 4% (p/p) con 1,3% (p/p) de glicerol, la cual tenía un grosor de 0,11 mm. No obstante, en el presente estudio no se encontraron correlaciones algunas entre los parámetros de textura y el grosor de las películas. Sin embargo, el estudio por microscopía electrónica de barrido corroboró la capacidad de ruptura de la película de almidón de mapuey, al observarse líneas de fractura en la superficie de la misma (Figura 8C). Esto parece indicar un posible deterioro de la película de almidón de mapuey con el tiempo de almacenamiento (7 meses), como ha sido señalado para la película de almidón de maíz *waxy* (Figura 12). Las líneas de fractura podrían ser consecuencia de una posible pérdida de humedad en la película y una retrogradación del almidón.

Famá y col. (2007) evaluaron el efecto del tiempo de almacenamiento a temperatura controlada (a 25 °C en una solución saturada de NaBr, con una a_w de 0,575), en películas de almidón de yuca al 5% (p/p) con 2,5% (p/p) de glicerol y 0,2% (p/p) de sorbato de potasio como agente antimicrobiano. Estos investigadores encontraron entre la segunda y la octava semana de almacenamiento, una disminución del contenido de humedad y un

incremento en el grado de cristalinidad, independientemente del pH de la solución formadora de película utilizado (5,0 o 6,7). Sin embargo, estos autores concluyeron que en general, el almacenamiento no afectaba notablemente las características mecánicas de las películas y que el envejecimiento del almidón, por efecto del proceso de retrogradación primeramente de la amilosa y luego de la amilopectina, es principalmente lo que produce los cambios observados en las propiedades mecánicas de las películas comestibles estudiadas.

El grosor es un parámetro que puede variar por efecto de la concentración del almidón y del glicerol empleada, por el volumen de la solución formadora de película añadido a la cápsula y por las condiciones de secado de las películas.

En el presente estudio los valores de grosor estuvieron entre 0,11–0,15 mm, en películas formuladas con 5% o 6% de almidón y 2% (v/v) de glicerol (Tabla 9). Mali y col. (2004a) empleando películas de almidón de ñame (*Dioscorea alata*) formuladas con tres concentraciones diferentes de almidón (3,30, 3,65 y 4,00% p/p) y glicerol (1,30, 1,65 y 2,00% p/p), reportaron valores de grosor entre 0,07–0,11 mm, al variar tanto la concentración de glicerol como la del almidón. El glicerol interactúa con las cadenas del almidón, haciendo una red más intrincada y más hidrofílica, que impide la salida del agua en el proceso de secado de la película. Por esta razón, el grosor de las películas aumenta con el incremento de la concentración de glicerol, como ha sido reportado por Rojas (2007) en películas de almidón de papa empleando diferentes concentraciones de glicerol (1,5; 2; 2,5 y 3%).

La composición química de la matriz polimérica también puede afectar el grosor de las películas comestibles. Bertuzzi y col. (2007) obtuvieron valores de grosor entre 0,05-0,15 mm utilizando como matriz polimérica almidón de maíz con un alto contenido de amilosa, similar a lo encontrado en el presente estudio (Tabla 9). Por su parte, Pérez y col. (2012) obtuvieron un grosor de 0,13 mm en películas de almidón de mapuey y Phan The y col. (2009) reportaron un grosor de 0,047 mm para películas de almidón de yuca, en ambos casos, valores menores a lo obtenido en el presente estudio. Tapia (2007) obtuvo películas igual de delgadas, con valores que oscilaban entre 0,047 a 0,048 mm en películas de goma gelano y de 0,050 a 0,052 mm para las de alginato, otros carbohidratos utilizados para la formulación de películas comestibles. Es importante señalar que las diferencias existentes pueden ser atribuidas tanto al componente base, como al procedimiento utilizado para su elaboración.

Las condiciones de secado de las películas comestibles varían ampliamente entre los diferentes estudios (Jiménez y col., 2012). El secado de las películas se puede realizar principalmente por tres maneras diferentes: 1) secado con calor utilizando estufas con temperaturas que van de 45–65 °C por 24 horas (Tapia, 2007; Rojas; 2007; Ortiz, 2010; Tapia y col., 2012; Pérez y col., 2012), 2) secado al frío (en nevera) con temperaturas de 4 °C por 10 días o más (Hernández, 2006) y 3) secado a temperatura ambiente (23–25 °C) y 50% de humedad relativa por 27–100 horas según Jansson y Thuvander (2004). Este proceso de secado va a influenciar drásticamente ciertas características de las películas, entre ellas el grosor y por lo tanto, las propiedades mecánicas y de barrera de estas preparaciones.

De acuerdo a Paes y col. (2008), no existe un método estándar para la preparación de películas comestibles a base de almidón, que permita obtener películas con las características funcionales y fisicoquímicas requeridas. La preparación de las películas de almidón es un proceso que depende de varios factores, tales como el tipo de almidón y del plastificante, y debe ser optimizado para obtener películas que presenten propiedades adecuadas (Jiménez y col., 2012).

Rojas (2007) reportó un grosor de 0,14 mm para películas de almidón de papa al 4% y 1,5% (v/v) de glicerol, secadas a 60 °C por 24 horas, similar al reportado en este estudio. Por su parte, Jansson y Thuvander (2004) en películas de almidón de papa hidroxipropilado (18% de almidón y 30% de glicerol), reportaron valores de espesor desde 0,3–2,6 mm. Estas películas fueron secadas en un clima constante con 50% de humedad relativa y 23 °C, pero variando el tiempo de secado. Las películas gruesas fueron secadas lentamente por varios días y estabilizadas en humedad durante 100 horas, mientras que las películas delgadas fueron secadas en un día y estabilizadas en humedad durante 27 horas. En las películas delgadas (como en este estudio), el agua se evapora rápido y la velocidad de movimiento de las moléculas en la matriz es limitado cuando son secadas bajo temperatura controlada, por lo que, las moléculas no tienen tiempo de responder al encogimiento de la película. En las películas gruesas, el agua se evapora lentamente y las moléculas tienen suficiente tiempo para relajarse. Estas películas están expuestas a un medio acuoso por más tiempo, por lo que, la cristalinidad en las películas gruesas se espera que sea mayor que en las películas delgadas, lo que resulta en una mayor orientación de las moléculas dentro de la matriz polimérica. La misma respuesta es observada cuando las películas son secadas a diferentes contenidos de humedad (Jansson y Thuvander, 2004). La

cristalinidad relativa de las películas de almidón con plastificantes, incrementa a medida que aumenta la humedad del aire durante la formación de la película (Rindlav-Westling y col., 1998 citado por Janson y Thuvander, 2004). Por esta razón, las condiciones de secado de las películas es un parámetro que hay que tener en cuenta cuando se evalúan las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de las películas comestibles.

Segovia (2010) reportó un grosor para películas de almidón de mapuey de 0,13 mm, menor a lo obtenido en este trabajo. En este estudio, todas las películas fueron secadas por calor a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Sin embargo, se encontraron diferencias de grosor entre las películas estudiadas (Tabla 9), las cuales pueden ser atribuidas a las características propias de cada uno de los almidones empleados para su formulación y a cómo las moléculas interactúan entre sí y con el agua, para finalmente orientarse y formar una matriz homogénea.

Otro aspecto que puede afectar el grosor de la película es el volumen de la solución formadora de película que se siembra en cada cápsula y el modo en que ésta se vierte en ella. En este estudio se utilizaron 8 mL en cápsulas de 5 cm de diámetro, a diferencia de Rojas (2007) y Hernández (2006) quienes usaron 12 mL y 5 mL, respectivamente. Romero-Bastidas y col. (2005) empleó un mayor volumen de solución formadora de película (20 mL) en cápsulas de 8 cm de diámetro. Cambios en el volumen de la solución formadora de película requieren ajustes en las condiciones de secado para garantizar que las películas sean deshidratadas correctamente, es decir, eliminar el exceso de agua presente en ellas y así, poder obtener las características deseables en cuanto a

manejabilidad. Además, se reportado que las películas que se preparan vertiendo la solución formadora de película sobre la cápsula de Petri (vaciado en placa), pueden presentar irregularidades en el grosor, como fue demostrado por Pareta y Edirisinghe (2006), quienes compararon micrografías de secciones transversales de estas películas, con aquellas obtenidas por la técnica del atomizador electrohidrodinámico, siendo ésta última, una técnica de preparación de películas a base de almidón, que garantiza un mayor control del grosor de las películas.

Las propiedades físicas, moleculares y funcionales de los almidones están relacionadas con la capacidad formadora de película de los mismos. Mali y col. (2004b) estudiaron estas propiedades en los almidones de maíz, yuca y ñame, los cuales contenían 25%, 19% y 30% de amilosa, respectivamente. Estos autores encontraron que el almidón de yuca, el cual presentaba un elevado contenido de amilopectina, originaba geles y películas menos fuertes, más transparentes y flexibles que las películas de almidón de maíz y de ñame con menor proporción de amilopectina. Esto también se evidenció en el presente estudio con la película a base de almidón de maíz *waxy* (Tabla 8). Esta película presentó una flexibilidad intermedia y fue translúcida a simple vista, lo que hace posible que puedan ser empleadas como coberturas de frutas y hortalizas frescas sin que se afecte las propiedades naturales de estos alimentos. Esto último, se vio reflejado en un cambio total de color elevado y en un bajo índice de blanco (Tabla 10). Myllärinen y col. (2002a) reportaron que las películas preparadas con almidón de maíz *waxy* eran transparentes y más frágiles en estructura que las películas de amilosa, especialmente aquellas preparadas con 10% de glicerol, las cuales resultaban difíciles de manipular.

La transparencia de las películas provee información sobre el tamaño de las partículas que se encuentran dispersas en la matriz de almidón (Kampeerapappun y col, 2007). Las partículas más grandes obstruirán el paso de la luz a través de la película, produciendo películas opacas. Sin embargo, la transparencia puede verse afectada por varios factores incluyendo el grosor de las películas (Mali y col., 2004a; Kampeerapappun y col, 2007), la concentración del plastificante utilizado (López y col., 2008; Bourtoom, 2008) y su interacción con la concentración de almidón (Mali y col., 2004a), así como por la presencia de pigmentos naturales (posiblemente antocianinas y carotenoides), en los almidones empleados para la formulación de las películas comestibles.

En la película de almidón de ocumo chino se observó la presencia de material particulado visible a simple vista, lo que le confirió una coloración marrón, a diferencia de las demás películas que presentaron una coloración entre blanca y amarillo claro. Los tubérculos y raíces pueden presentar pigmentos naturales en la parte comestible y en la cáscara, lo que le confiere valores positivos a los parámetros a y b , en los almidones que se extraen de ellos, como ha sido reportado para el almidón de ocumo chino (Palomino y col. 2010) y en la película formulada a base de este almidón (Tabla 10).

Rojas (2007) reportó para películas de almidón de papa valores de luminosidad, matiz e intensidad de 23,31, -0,27 y -1,81 respectivamente, y Segovia (2010) obtuvo para películas de almidón de mapuey 19,39 de luminosidad, -0,12 de matiz y -7,60 de intensidad, similares a los reportados en este estudio (Tabla 10). En el presente trabajo, se encontró una correlación positiva entre el grosor de las películas y los parámetros luminosidad ($r = 0,644$; $p < 0,05$; $n = 20$) y el índice de blanco ($r = 0,643$; $p < 0,05$; $n = 20$), y una correlación negativa con el cambio total del color ($r = -0,644$; $p < 0,05$;

$n = 20$), lo que apoya el efecto del grosor sobre las propiedades de color de las películas comestibles a base de almidón.

La permeabilidad al vapor de agua es una de las propiedades de barrera más importantes y estudiadas en las películas comestibles, ya que una de las principales funciones de un empaque de alimentos es evitar o disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y el medio circundante. Por lo tanto, en un empaque, es ideal que el valor de permeabilidad al vapor de agua sea lo más bajo posible (Segovia, 2010). Los resultados de la permeabilidad al vapor de agua pueden ser útiles para comprender los posibles mecanismos de transferencia de masa y la interacción de solutos y polímeros en las películas comestibles (Bertuzzi y col., 2007). De acuerdo a la termodinámica de los procesos irreversibles, las diferencias en el potencial químico del agua es la fuerza impulsora de la transferencia de agua a través de la película. Cuando este proceso ocurre en condiciones de temperatura y presión constante, la diferencia en el potencial químico del agua resulta proporcional a la concentración de vapor de agua entre las dos superficies de la película (Morillon y col., 2000).

La permeabilidad puede ser definida como el producto de la difusibilidad y la solubilidad solo cuando las leyes de Fick y Henry aplican totalmente (Bertuzzi y col., 2007). La ley de Fick enuncia que el flujo de partículas o calor ocurre desde una región de mayor concentración a una de menor concentración o temperatura. Por su parte, la ley de Henry dice que a una temperatura constante, la cantidad de gas disuelta en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ejerce ese gas sobre el líquido (Robertson, 2012). Para la mayoría de las películas comestibles el vapor de agua interactúa fuertemente con la estructura polimérica, lo que ocasiona que los coeficientes de difusión y

solubilización sean dependiente de la fuerza impulsora (Gennadios y col., 2004). En este sentido, uno de los mayores problemas que presentan las coberturas y películas comestibles a base de almidón y glicerol es su alta permeabilidad al vapor de agua debido a la naturaleza hidrofílica de dichas moléculas (Romero-Bastidas y col., 2005). En estos casos, la barrera energética del fenómeno de permeabilidad al vapor de agua es menor que la barrera energética de las películas hidrofóbicas (Bertuzzi y col., 2007).

Pérez y col. (2012) obtuvieron una permeabilidad al vapor de agua de $1,84 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa en películas de almidón de mapuey y Hernández (2006) en películas de almidón de maíz y de papa reportó valores de $0,93 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa y $1,11 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa, respectivamente, similares a los encontrados por Mali y col. (2002) utilizando almidón de ocumo y por Arvanitoyannis y col. (1997) en películas hechas a base de gelatina, almidón soluble y glicerol. Otros estudios en películas a base de almidones han reportado valores de permeabilidad al vapor de agua entre $0,20\text{--}0,25 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa (Romero-Bastidas, 2005); $0,15\text{--}0,50 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa (Rodríguez y col., 2006) y $0,29 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa (Rojas, 2007). Estos resultados de permeabilidad al vapor de agua fueron menores a los reportados en este trabajo (Tabla 9). Diversos factores pueden afectar este parámetro, entre ellos se encuentran: el espesor de la película (McHugh y col., 1993; Mali y col. 2004a); la concentración y el tipo de plastificante (Mali y col. 2004a; Parra y col., 2004; Bertuzzi y col., 2007; López y col., 2008; Chillo y col., 2008); la concentración de almidón (Mali y col. 2004a); los cambios en el patrón de cristalinidad de las películas luego del proceso de gelatinización y secado (Myllärinen y col. 2002b; Xu y col., 2005, Tapia y col., 2012); la temperatura y la humedad relativa (Bertuzzi y col., 2007) y la adición de otros compuestos a la solución formadora de película, como por ejemplo:

aditivos, carbohidratos prebióticos y bacterias probióticas (Tapia y col., 2007; Rojas, 2007; Phan The y col., 2008; Ortiz, 2010).

Por lo general, en las películas hidrofílicas como aquellas elaboradas a base de almidón, los valores de permeabilidad al vapor de agua se ven afectados por el espesor de las mismas (McHugh y col., 1993). En este estudio, el grosor de las películas correlacionó positivamente con el parámetro de permeabilidad al vapor de agua ($r = 0,713$; $p < 0,05$; $n = 20$), lo que sugiere que a medida que aumenta el grosor de las películas también lo hace la permeabilidad al vapor de agua. Esto fue observado con la película de almidón de mapuey, que presentó el mayor grosor y por lo tanto, la permeabilidad al vapor de agua más alta entre las películas estudiadas (Tabla 9). Bertuzzi y col. (2007) observaron que la permeabilidad al vapor de agua de las películas de almidón de maíz con un elevado contenido de amilosa (70%), incrementaba linealmente con el espesor de la película en el rango de grosor estudiado por estos autores (aproximadamente entre 0,05–0,15 mm).

McHugh y col. (1993) en un estudio del efecto del grosor en la determinación de la permeabilidad al vapor de agua en películas hidrofílicas, determinaron que a un mayor grosor de la película, aumenta la resistencia a la transferencia de masa y en consecuencia, la presión parcial de agua en equilibrio con la superficie interna de la película, también incrementa. De esta forma, las películas hidrofílicas exhiben un incremento en la permeabilidad al vapor de agua a medida que aumenta su grosor, debido a la modificación de las condiciones de presión parcial de vapor de agua a que está expuesta la superficie interna de las películas.

Otros autores atribuyen el efecto del grosor al hinchamiento de la película como un resultado de las fuerzas de atracción entre el polímero y el agua (Park y col., 1993). En este caso, el hinchamiento de la película podría resultar en la variación de la estructura de las mismas (Bertuzzi y col., 2007).

La adición de compuestos hidrofílicos como el glicerol puede contribuir a aumentar la permeabilidad al vapor de agua. Bertuzzi y col. (2007) evaluaron el efecto de la concentración de glicerol sobre la permeabilidad al vapor de agua en películas de almidón de maíz con un elevado contenido de amilosa. Estos autores encontraron un aumento lineal de la permeabilidad a medida que la concentración de glicerol incrementaba. Estos resultados podrían estar relacionados con modificaciones estructurales de la red polimérica menos densa que forma el almidón, en combinación con el carácter hidrofílico del glicerol, que favorece la absorción y desorción de moléculas de agua, como ha sido reportado por Mali y col. (2004a). Los plastificantes provocan una mayor flexibilidad en la estructura polimérica, lo que aumenta la movilidad del agua absorbida dentro de la matriz polimérica (Bertuzzi y col., 2007).

Mali y col. (2004b) estudiaron las propiedades de barrera en películas de almidón de maíz, yuca y ñame, y encontraron que estas películas tenían valores de permeabilidad al vapor de agua entre $6,8-8,3 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa. Estos valores disminuían cuando el contenido de glicerol era de 20% (p/p), debido a la formación de una estructura compacta. Por su parte, cuando el contenido de glicerol era de 40% (p/p), la permeabilidad al vapor de agua incrementaba porque la matriz de la película era menos densa. Los valores reportados por estos autores fueron similares a los encontrados en el presente estudio, al igual a lo obtenido por Ortiz (2010) para películas de almidón de plátano. Por su parte, Bertuzzi y

col. (2007) reportaron valores de permeabilidad al vapor de agua en películas de almidón de maíz rico en amilosa, entre $2-10 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa y García y col. (2009) reportaron valores de $3,8$ y $4,5 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa para almidones de maíz *waxy* y de yuca, respectivamente, similar a lo obtenido en el presente estudio (Tabla 9). Tapia y col. (2012) obtuvieron valores de permeabilidad al vapor de agua mayores a los señalados, para películas de mapuey, ocumo blanco, ocumo chino, batata y apio. Estos resultados juntos con los encontrados en el presente trabajo refuerzan el carácter de alta permeabilidad al vapor de agua en las películas formuladas con almidones.

Mali y col. (2004a) encontraron un incremento de la permeabilidad al vapor de agua en películas de almidón de ñame, a medida que aumentaba la concentración de almidón, lo que podía estar relacionado con un mayor número de grupos hidroxilos libres, que incrementarían la interacción con las moléculas de agua, favoreciendo la transferencia de vapor de agua a través de la película. Por su parte, Xu y col. (2005) en películas de almidón de maíz normal y ceroso con glicerol y quitosano, reportaron una disminución de la velocidad de transmisión de vapor de agua a medida que incrementaba la proporción de almidón en la mezcla, siendo menor para la película de almidón de maíz normal. Las diferencias encontradas se deben a la composición química de los dos almidones de maíz utilizados y a la diferente intensidad en la interacción entre el almidón y el quitosano. En este estudio, la velocidad de transmisión de vapor de agua fue mayor para la película de almidón de maíz normal (Figura 7).

Se ha reportado que las películas de almidón presentan cambios en sus estructuras cristalinas luego del proceso de gelatinización y secado (Myllärinen y col. 2002b; Xu y col., 2005, Tapia y col., 2012). La estructura cristalina tipo A, característica de los

almidones de cereales como el de maíz, sigue existiendo en la película de almidón de maíz normal, mientras que en la de maíz *waxy*, se ha reportado una estructura amorfa (Xu y col., 2005). Una disminución en la cristalinidad en las películas de almidón de maíz *waxy*, ocasionaría un incremento de la velocidad de transmisión de vapor de agua, sin embargo, esto no fue lo obtenido en el presente estudio. Posiblemente, una mayor concentración de almidón y de glicerol empleada en este estudio (Tabla 8), pudieron haber influido sobre este parámetro.

Myllärinen y col. (2002b) señalaron que la cristalinidad de las películas de amilosa con y sin glicerol, eran más estables y que los posibles cambios encontrados a la forma cristalina tipo B, debido a un aumento en la humedad ambiental, ocurrían rápido luego de su preparación. En contraste, las películas de amilopectina altamente plastificadas (con 30% de glicerol y mantenidas a 91% humedad relativa) eran inestables y la estructura cristalina cambiaba de la forma amorfa a la estructura cristalina tipo B, durante el primer mes de almacenamiento. Este aumento de la cristalinidad en las películas de almidón de maíz *waxy* podría explicar la disminución de la velocidad de transmisión de vapor de agua encontrada en este estudio (Figura 7), en comparación a la película de almidón normal. Tapia y col. (2012) reportaron para las películas de ocumo chino, mapuey y apio, patrones de difracción tipo B, similar a lo obtenido por Romero-Bastidas y col. (2005) en películas a base de almidón de plátano, okenia y mango. También se ha reportado este patrón de cristalinidad en películas de almidón de papa (Rindlav y col. 1997 citado por Tapia y col., 2012). Otros investigadores han obtenido para la película de almidón de yuca una estructura altamente amorfa o con un patrón de difracción de tipo B-V (Famá y col., 2005; Flores y col., 2007), en la que se forman complejos de amilosa con lípidos (Rosenthal,

2001). Dado que la amilosa es un polímero principalmente lineal, mientras que la amilopectina es altamente ramificada, la cristalinidad de las películas de almidón está fundamentalmente asociada con la amilosa, incluso si se considera el contenido de amilopectina en las regiones cristalinas de los gránulos nativos del almidón (García y col. 2009).

La actividad de agua también es un parámetro importante cuando se estudian las propiedades de las películas comestibles. Se define como la relación entre la presión de vapor del agua contenida en un producto y la presión de vapor del agua de una atmósfera saturada de humedad ($a_w = p/p_0$). Este parámetro permite inferir sobre la estabilidad del alimento en condiciones de almacenamiento con relación a los cambios físicos, bioquímicos, enzimáticos y de crecimiento de microorganismos, siendo un valor de $a_w < 0,6$ una condición de equilibrio del producto en anaquel (García y Pacheco-Delahaye, 2007). En base a lo señalado, todas las películas estudiadas fueron preparaciones estables en el tiempo en que fueron almacenadas (Tabla 9), similar a lo reportado por Rojas (2007) para la película de almidón de papa. Pérez y col. (2012) reportó una a_w de 0,43 en películas de almidón de mapuey, menor a lo obtenido en este estudio. Sin embargo, estos valores de $a_w < 0,6$ unido a una pobre actividad como barrera al vapor de agua (altos valores de permeabilidad al vapor de agua), constituyen ventajas al permitir el movimiento del agua a través de la película, evitando de esta forma la condensación, que es una fuente potencial de deterioro microbiano, como ha sido señalado por Tapia (2007).

Además, un pH ligeramente ácido en las películas comestibles (Tabla 9), confiere también cierta protección microbiológica. El pH de la solución formadora de película viene dado por la acidez de los ingredientes que forman la mezcla que va a dar origen a ésta

solución. El valor de pH es característico de cada película, depende de la matriz y de los polioles utilizados y sus cantidades, además del proceso empleado para su elaboración (Segovia, 2010). El pH y la acidez titulable del almidón pueden variar dependiendo de la fuente botánica de donde provenga y, por lo tanto, de su composición proximal. En este trabajo, el pH de la solución formadora de película correlacionó positivamente ($r = 0,582$; $p < 0,05$; $n=21$) con el contenido de proteína de los almidones utilizados para su formulación.

En general, el valor de pH no es un parámetro reportado en la mayoría de los trabajos sobre películas comestibles. Sin embargo, dado que es un producto comestible debe ser cuidadosamente controlado, ya que podría afectar la palatabilidad del producto sobre la que se desea emplear la solución formadora de película y su estabilidad microbiológica. Rojas (2007) reportó un pH de 5,41 en la solución formadora de película de almidón de papa, similar a lo encontrado para las películas comestibles estudiadas y Segovia (2010) reportó un pH de 6,55 para películas de almidón de mapuey, superior a lo encontrado en este estudio.

La solubilidad en agua en películas comestibles es un indicio de su integridad en un ambiente acuoso, una solubilidad elevada indica baja resistencia al agua (Romero-Bastidas y col., 2005; Maizura y col., 2007). Tal como lo señalan Lee y col. (2004), cuando se emplean películas como materiales de recubrimiento con la finalidad de inhibir la exudación en alimentos congelados, mientras la solubilidad en agua sea mayor, menor será la estabilidad y funcionalidad de la película. Aunque se requiere una baja solubilidad en agua durante el almacenamiento, una alta solubilidad en las películas comestibles sería ventajoso durante la cocción de productos alimenticios en los que se emplea como

coberturas (Laohakunjit y Noomhorm, 2004 citado por Maizura y col., 2007). Por esta razón, la solubilidad en agua es un parámetro importante cuando se estudian las propiedades de barrera en las películas comestibles.

Romero-Bastidas y col. (2005) encontraron un valor de solubilidad de 0,23 g sólidos solubles/g sólidos totales para películas al 3% de almidón de plátano y 1,5% (v/v) de glicerol, valores comparables a los reportados por Ortiz (2010), con 0,18 g/g en películas a base de este mismo almidón. Tapia (2007) reportó valores de solubilidad a 25 °C para películas de goma gelano de 0,47–0,59 g/g y de alginato entre 0,74–0,79 g/g. Mientras que Lee y col. (2004) obtuvieron un valor de solubilidad de 0,52 g/g para películas de goma gelano al 2% con 1% de glicerol. Lee (1999) al trabajar con películas comestibles a base de otros tipos de biopolímeros tales como celulosa o carragenano, publicaron valores de solubilidad en el orden de 0,55–0,84 g/g y de 0,41 g/g, respectivamente. Los resultados obtenidos con películas a base de almidones (Tabla 9) fueron comparables a los obtenidos con películas comestibles a base de otros carbohidratos (celulosa, gelano, alginato y carragenano).

La solubilidad en agua en películas a base de almidón muestra que, dependiendo de la fuente botánica de donde provenga el almidón y de su composición proximal, se pueden obtener películas que presenten diferentes niveles de resistencia al agua (Tabla 9). En este estudio, el parámetro de solubilidad en agua de las películas correlacionó negativamente con el contenido de proteína ($r = -0,479$; $p < 0,05$; $n = 21$) y de grasa ($r = -0,573$; $p < 0,05$; $n = 20$) de los almidones utilizados para su formulación. Por ejemplo, las películas de almidón de maíz *waxy* y yuca presentaron una baja resistencia al agua, muy similar a los resultados obtenidos por Tapia (2007) con películas de alginato. En el caso de la película

de almidón de yuca, la estructura polimérica menos compacta (Figura 8D) y un menor contenido de grasa en el almidón (Tabla 2), pudiera permitir la entrada de más agua y la consecuente disolución de sus componentes. Por su parte, las películas de almidones de apio, ocumo chino y maíz presentaron una resistencia intermedia al agua, resultados similares a los obtenidos en películas de carragenato (Lee, 1999), mientras que las películas de mapuey y papa resultaron ser las más resistentes a disolverse en agua (bajos valores de solubilidad en agua), similar a lo obtenido por Pérez y col. (2012), quienes reportaron un valor de solubilidad en agua a 25 °C de 0,30 g/g en películas de almidón de mapuey. Estos resultados fueron similares a los reportados por Rhim (2004) en películas de alginato (0,16 g/g) y en películas de almidón de plátano (Romero-Bastidas y col., 2005 y Ortiz, 2010).

La solubilidad en agua de los almidones puede variar dependiendo del contenido de amilosa y del tipo de estructura cristalina del gránulo (Bello-Pérez, 2002). Además, la temperatura tiene una función importante en la solubilidad (Bertuzzi y col., 2007; López y col., 2008), causando que aumente este parámetro. También se ha reportado valores de solubilidad en agua mayores para las películas con plastificantes (Maizura y col., 2007; Bourtoom, 2008). La incorporación de glicerol a la solución formadora de película contribuye con una menor retrogradación del almidón en la película y por lo tanto, disminuye la formación de agregados cristalinos en los geles de almidón. La cristalinidad en un polímero es dependiente de la habilidad de las cadenas para formar cristales así como también de la movilidad de las cadenas durante el proceso de cristalinización (Rindlav-Westling y col., 1998 citado por Maizura y col., 2007). Una menor formación de cristales en las películas hace que aumente el agua fácilmente, la película se hinche y se

desintegre. Por lo tanto, la solubilidad en agua será mayor (Maizura y col., 2007). Una estructura amorfa en las películas de almidón de maíz *waxy* como ha sido reportado por varios investigadores (Myllärinen y col. 2002b; Xu y col., 2005), podría explicar la mayor solubilidad en agua encontrada para esta película, en comparación con la de almidón de maíz normal. Además se ha reportado que las películas frescas de amilosa se dispersan muy lentamente en agua, a diferencia de las películas de amilopectina, las cuales se fragmentan rápidamente en un ambiente acuoso (Myllärinen y col. 2002b), resultados similares fueron obtenidos en este estudio para las películas de almidón de maíz normal y ceroso, respectivamente. Además, la incorporación de glicerol a la película también incrementa la solubilidad en agua debido a su carácter altamente hidrofílico capaz de interactuar con las moléculas de agua e incorporarla a la matriz, como ha sido reportado por López y col. (2008). Como se señaló anteriormente, el plastificante afecta el grosor de las películas y en el presente estudio, se encontró una correlación negativa ($r = -0,785$; $p < 0,05$; $n = 20$) entre el grosor de las películas y el parámetro de solubilidad en agua.

La capacidad de retención de agua es una de las propiedades de las películas comestibles más importante, que se estudia en aplicaciones farmacéuticas y de alimentos, y a diferencia de la permeabilidad al agua, está determinada por la estructura química del polímero (Tapia, 2007). Este parámetro define la resistencia o tolerancia del material al agua, por lo tanto, un valor bajo de retención de agua indica una alta tolerancia al agua. En el caso de frutas frescas cortadas, la resistencia de las coberturas a disolverse en agua es relevante, por esta razón, el estudio de la retención de agua es un requisito para una aplicación eficiente de películas de biopolímeros (Tapia, 2007).

En el caso de las películas de alta y muy alta capacidad de retención de agua (apio, maíz *waxy* y yuca), la metodología planteada por Lee y col. (2004) y Rhim (2004) para su determinación, presentó ciertos inconvenientes. Durante el tiempo que las películas permanecieron sumergidas en agua (10 minutos), aumentaron su tamaño de manera considerable en comparación con las películas de baja e intermedia retención de agua. El aumento de tamaño de las películas se debió a la absorción de agua desde el medio externo al interior de la matriz, lo que causó un hinchamiento y extensión de la película. La capacidad de retención de agua define la cantidad de agua absorbida por las películas y refleja una importante propiedad de las películas de carbohidratos y de proteínas, ya que estos biopolímeros se hinchan inicialmente cuando se suspenden en agua, con cambios resultantes en su estructura (Tapia, 2007). El agua que entra a la película interactúa con los componentes de la matriz, haciendo que las fuerzas intermoleculares (que le confieren cohesividad a la película) se rompan y como consecuencia de esto, la película se vuelva frágil y por lo tanto, poco manejable. Además, cuando la película de almidón de yuca entró en contacto con el agua adquirió una consistencia tipo gel, lo que imposibilitó la medición de la retención de agua.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se realizó una modificación en el método con el motivo de obtener una medición aproximada de este parámetro. Sin embargo, los valores obtenidos para las películas de almidón de apio y yuca, aún cuando dan un indicio de la capacidad de retención de agua elevada que presentan estas películas, posiblemente estén sobreestimados, ya que, debido a la consistencia y fragilidad de estas películas, no fue posible eliminar el agua superficial de las películas con un papel de filtro. Por lo tanto, los valores de retención de agua reportados para estas dos películas (Tabla 9), corresponden no

solo al agua retenida en el interior de la matriz, sino también, al agua que permaneció en la superficie de la película y que no interactuó directamente con los componentes de la misma.

Tapia (2007) reportó valores de retención de agua entre 1,6–2,0 g agua ganada/g sólidos secos en películas de goma gelano y alginato, similares a los encontrados con las películas de almidón de mapuey y maíz. Lee y col. (2004) encontraron un valor alrededor de 6,0 g/g, para películas hechas con 2% de goma gelano y 1% de glicerol, similar a lo obtenido con las películas de almidón de apio, maíz *waxy* y ocumo chino. Por otro lado, Rhim (2004) encontró para películas de alginato al 2% con 1% de glicerol, un valor de retención de agua de 0,8 g/g, resultados similares a los encontrados para las películas de almidón de papa (Tabla 9).

En estudios realizados con películas a base de almidones, Ortiz (2010) reportó valores de retención de agua entre 0,84–1,65 g/g en la película almidón de plátano, resultados similares a los encontrados para las películas de almidón de mapuey, maíz y papa. Pérez y col. (2012) encontró para películas de almidón de mapuey al 5% y 1,5% de glicerol un valor de retención de agua de 1,04 g/g, muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 9).

En este estudio, el parámetro de capacidad de retención de agua de las películas correlacionó negativamente ($r = -0,624$; $p < 0,05$; $n = 20$) con el contenido de grasa de los almidones utilizados para su formulación y con el grosor de las películas ($r = -0,781$; $p < 0,05$; $n = 20$), mientras que se encontró una correlación positiva con el parámetro de solubilidad en agua ($r = 0,888$; $p < 0,05$; $n = 21$). En base a los resultados, es posible inferir

una elevada tolerancia al agua de las películas comestibles a base de almidón de yuca, apio y maíz *waxy*. En estos casos, una elevada retención de agua por parte de las películas no sería lo más conveniente si se quieren utilizar como coberturas, pues disminuiría la estabilidad del producto que recubren. Las películas de almidón de ocumo chino, mapuey, maíz y papa resultaron ser más resistentes al agua, lo que refleja el potencial de estas formulaciones para ser usadas como coberturas sobre frutas frescas cortadas. Estos resultados con películas comestibles a base de almidones, comprueban la utilidad de los carbohidratos en la formación de matrices poliméricas con buenas propiedades de barrera.

Caracterización nutricional de las películas comestibles

Escasos son los estudios en donde se caracteriza desde el punto de vista nutricional las películas comestibles a base de almidón y de glicerol. Por esta razón, resulta novedoso evaluar la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de estas preparaciones, teniendo en cuenta las posibles aplicaciones de las películas comestibles como vehículo de ingredientes funcionales, orientadas a aumentar las propiedades de los alimentos en los que se utilizan como coberturas y los efectos fisiológicos de estas sobre el consumidor.

El contenido de almidón disponible de las películas formuladas a base de almidón de papa y de maíz (Tabla 12), fue similar a lo reportado por Hernández y col. (2008). Estos investigadores tampoco encontraron diferencias significativas en el contenido de almidón disponible entre estas dos películas comestibles. Las diferencias en cuanto a las condiciones de preparación de estas películas y la concentración de almidón y glicerol utilizadas en ambos estudios, no ocasionaron cambios en este parámetro.

Las películas de almidón de yuca y maíz *waxy* presentaron un elevado contenido de almidón disponible, lo que sugiere a su vez un bajo contenido de la fracción resistente total en estas preparaciones (Tabla 12). En este trabajo, el contenido de almidón disponible de las películas correlacionó negativamente ($r = -0,535$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón resistente total, similar a lo encontrado en la digestibilidad *in vitro* de los almidones nativos empleados para su formulación. Hernández y col. (2008) reportaron valores de almidón disponible menores en las películas de almidón de plátano (56%) y de sagú (58%), siendo películas con un alto contenido de almidón resistente total.

El elevado tenor de almidón resistente total encontrado para las películas preparadas a base de almidón de papa y mapuey, puede deberse principalmente, a la presencia de gránulos sin gelatinizar luego del tratamiento térmico para la elaboración de las películas, como ha sido encontrado por Hernández (2006), para las películas de almidón de papa, plátano y sagú. Este autor sugiere que la formación de dicho almidón resistente se debe a la generación de almidón resistente por retrogradación; sin excluir la posible contribución de fracciones inaccesibles físicamente.

El contenido de almidón resistente total en la película de almidón de maíz fue menor a lo reportado por Hernández y col. (2008) (4,3% en comparación con un 5,3%). Esta diferencia puede deberse a que se utilizaron condiciones de secado distintas en ambos estudios. Hernández y col. (2008) emplearon un secado al frío (4 °C) por 10 días, lo que posiblemente, ocasionó un aumento del contenido de almidón resistente total en estas preparaciones y más específicamente un incremento en el almidón resistente retrogradado, a diferencia del secado con calor por 24 horas, que es mucho más rápido y las moléculas

que forman la matriz polimérica tienen menos tiempo para orientarse y formar estructuras mucho más cristalinas.

A diferencia del bajo contenido de almidón resistente por retrogradación reportado para los almidones nativos, se ha señalado que el almidón retrogradado en las películas comestibles realiza una importante contribución al contenido de almidón resistente total encontrado para estas muestras (Hernández y col., 2008). Esto se debe a que una vez ocurrido el proceso de preparación de la película mediante un tratamiento térmico, el enfriamiento de la solución formadora de película pudiera entonces promover la retrogradación de la amilosa.

Una mayor cantidad del plastificante evitaría la reasociación de las cadenas poliméricas del almidón, luego de la dispersión térmica de las soluciones formadoras de película (García y col., 1998; Mali y col., 2006), trayendo como consecuencia una disminución en el contenido de almidón resistente por retrogradación, lo que se evidenciaría en un contenido de almidón resistente total más bajo.

El contenido de amilosa y amilopectina puede también afectar la estabilidad de estas preparaciones en el tiempo. En el caso de la película de almidón de maíz *waxy*, un mayor contenido de amilopectina, hace que exista una menor retrogradación luego de la gelatinización del almidón, aspecto que se ve reflejado en un contenido de almidón resistente total bajo, menor al obtenido en la película de almidón de maíz normal que presenta entre 70–80% de amilopectina. Sin embargo, esto no fue observado para la película de almidón de mapuey, que siendo un almidón naturalmente *waxy* (96,2% de

amilopectina, Tapia y col. 2012), la película presentó un elevado contenido de almidón resistente total (Tabla 12).

Posiblemente, la presencia de fracciones cristalinas que no se disociaron durante el tratamiento térmico en la preparación de las películas de almidón de papa y de mapuey, estén contribuyendo a los mayores valores de almidón resistente total de estas en comparación con la película de maíz, como fue señalado por Hernández (2006) para las películas de sagú, papa y plátano. El alto contenido de almidón resistente total presente en estos almidones nativos (Tabla 3), hace que las películas comestibles también presenten un elevado contenido de fracciones resistentes a la digestión.

La solubilidad en agua y la capacidad de retención de agua de las películas comestibles son dos parámetros que podrían influir notablemente en el contenido de almidón resistente total encontrado en estas preparaciones. En este sentido, Hernández (2006) refiere que la menor solubilidad de las películas sin glicerol (Romero-Bastidas y col, 2005), limitan su digestibilidad al tener menor superficie expuesta a la hidrólisis enzimática; es decir, la menor solubilidad puede ocasionar un aumento en la inaccesibilidad física del almidón presente en las películas elaboradas sin glicerol.

En el caso de las películas de almidón de yuca, una estructura polimérica más laxa pudiera permitir la entrada de agua (elevada solubilidad en agua) y la consecuente disolución de sus componentes, lo que conduciría a un aumento del acceso de las enzimas digestivas a su respectivos sustratos y por lo tanto, a un incremento de la digestibilidad del almidón. Esto se vió reflejado tanto en un aumento del contenido de almidón disponible como en una disminución de la fracción resistente total (Tabla 12). Por el contrario, la

película de almidón de papa presentó la menor solubilidad en agua (Tabla 9), lo que se tradujo en un contenido de almidón disponible bajo y un elevado contenido de almidón resistente total, resultados similares se observaron con la película de almidón de mapuey (Tabla 12). Como se mencionó anteriormente, la solubilidad en agua de los almidones puede variar dependiendo del contenido de amilosa y del tipo de estructura cristalina del gránulo (Bello-Pérez, 2002), lo que explicaría la diferencia encontrada en las distintas películas comestibles estudiadas.

En las películas más laxas como las formuladas con almidón de yuca y de apio (Tabla 8; Figura 8), el agua podría entrar a la película de forma más rápida y en mayor proporción (muy alta capacidad de retención de agua; Tabla 9), en comparación con aquellas películas más compactas como las de almidón de papa y mapuey (baja retención de agua), favoreciendo de este modo su hidrólisis por las enzimas digestivas, similar a lo obtenido con el parámetro de solubilidad de la película en agua.

Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Hernández y col. (2008), referida a que la solubilidad en agua de las películas, puede limitar su digestibilidad *in vitro*. Este aspecto se vio reflejado tanto en el contenido de almidón resistente total como el almidón disponible y guarda una notable relación no solo con la solubilidad en agua sino también con la capacidad de retención de agua de las películas, propiedades que dependen directamente de las características intrínsecas del almidón utilizado para la preparación de cada una de las películas comestibles. En el presente estudio, los parámetros de solubilidad en agua y la capacidad de retención de agua de las películas, correlacionaron positivamente con el contenido de almidón disponible ($r_{SA} = 0,810$; $r_{RA} = 0,779$; $p < 0,05$; $n = 21$) y

negativamente con el contenido de almidón resistente total ($r_{SA} = -0,725$; $r_{RA} = -0,700$; $p < 0,05$; $n = 21$), lo que apoya lo antes descrito.

La cinética de hidrólisis encontrada en las películas comestibles que no fueron sometidas a ebullición previa al ensayo enzimático (películas crudas) (Tabla 13, Figura 9), es un indicativo de la destrucción de la estructura granular durante el tratamiento térmico implícito en la elaboración de las películas (Hernández y col., 2008). Al comparar la cinética de hidrólisis de estas películas con la exhibida por las mismas preparaciones sometidas a ebullición antes del ensayo enzimático (películas gelatinizadas), se evidenció una diferencia entre ambos tratamientos, siendo mayor la cinética de amilólisis para la mayoría de películas gelatinizadas. Estas diferencias entre películas gelatinizadas y no gelatinizadas sugieren la posible presencia de fracciones cristalinas que no fueron dispersadas/disociadas durante el tratamiento térmico para la elaboración de las películas (Hernández y col., 2008), es decir, que la disociación de la estructura cristalina del almidón nativo, no se completó totalmente durante este procedimiento, lo que también se observó en el elevado contenido de almidón resistente total en algunas de estas preparaciones (Tabla 12). En este sentido, la velocidad inicial de hidrólisis de las películas crudas correlacionó negativamente ($r = -0,732$; $p < 0,05$; $n = 14$) con el contenido de almidón resistente total obtenido en las películas comestibles.

La cinética de hidrólisis obtenida con la película de almidón de maíz gelatinizado (Figura 9A) fue similar a lo reportado por Hernández y col. (2008). Estos autores obtuvieron una magnitud final de hidrólisis de 74% (Tabla 13). En comparación con la película de almidón de maíz regular, la tasa de α -amilólisis de la película de almidón de maíz *waxy* fue ligeramente mayor (Figura 9B; Tabla 13). Los gránulos de almidón *waxy*

son hidrolizados más rápidamente que los gránulos que contienen cantidades significativas de amilosa (Jane, 2007 citado por Copeland y col., 2009). La absorción de agua y presumiblemente el acceso de las enzimas al gránulo, ocurre primeramente en las regiones amorfas. Por lo tanto, en los almidones *waxy* la absorción de agua puede estar menos impedida que en los almidones que tienen amilosa en sus capas amorfas (Copeland y col., 2009). Este aumento de la digestibilidad de los almidones *waxy* producto de una mayor absorción de agua, se evidenció también en las propiedades de barrera de la película de almidón de maíz *waxy* (Tabla 9), las cuales presentaron una elevada solubilidad y retención de agua, lo que aumentó su digestibilidad con respecto a la película de almidón de maíz normal. En este sentido, los parámetros de solubilidad en agua y la capacidad de retención de agua de las películas comestibles, correlacionaron positivamente con la velocidad inicial ($r_{SA} = 0,759$; $r_{RA} = 0,871$; $p < 0,05$; $n = 14$) y la magnitud final ($r_{SA} = 0,650$; $r_{RA} = 0,655$; $p < 0,05$; $n = 14$) de hidrólisis de las películas crudas. Además, Xu y col. (2005) reportaron una disminución de la cristalinidad en las películas a base de almidón de maíz *waxy*, lo que pudiera contribuir a la mayor digestibilidad encontrada en estas películas, en relación a las de almidón de maíz regular.

Las propiedades de barrera y mecánicas de las películas comestibles pueden tener un efecto sobre su digestibilidad *in vitro*. Como se señaló anteriormente, la solubilidad y la capacidad de retención de agua de las películas afectan notablemente el contenido de almidón disponible, almidón resistente total y la tasa de α -amilólisis de las mismas. Además de estos parámetros, la dureza de las películas también correlacionó positivamente con el contenido de almidón resistente ($r = 0,535$; $p < 0,05$; $n = 21$) y negativamente con la magnitud final ($r = -0,590$; $p < 0,05$; $n = 14$) de hidrólisis de las películas crudas. En este

sentido, las condiciones de secado de las películas y el tiempo de almacenamiento de las mismas (Jiménez y col., 2012), son aspectos a considerar para evitar cambiar sus propiedades mecánicas y por lo tanto, su digestibilidad.

Los parámetros de digestibilidad *in vitro* de las películas comestibles a base de almidón y glicerol, podrían afectar su digestibilidad *in vivo*. En este sentido, se empleó el bioensayo de gorgojo de arroz *S. oryzae* para realizar el estudio nutricional *in vivo* de estas preparaciones comestibles.

La supervivencia de los insectos alimentados con las películas a base de almidón y glicerol fue similar a la obtenida en la condición alimentada y en la referencia (Figura 10), indicando que pueden ser ingeridas sin generar toxicidad en el modelo animal utilizado. Resultados similares fueron reportados por Rojas (2007) para películas de almidón de papa y por Ortiz (2010) para películas de almidón de batata, plátano y yuca, en estudios realizados con este mismo modelo biológico. Sin embargo, Ortiz (2010) reportó una supervivencia menor en los insectos alimentados con la película de almidón de yuca (93% al día 8).

La ganancia de peso encontrada con todas las dietas de películas a base de almidón (Figura 11, Tabla 14), coincidió con lo reportado por varios investigadores en estudios previos. Por ejemplo, se ha obtenido un aumento de peso de 8% y 10% en insectos alimentados con películas de almidón de plátano (Ortiz, 2010) y de almidón de papa (Rojas, 2007), respectivamente. Sin embargo, Ortiz (2010) reportó una disminución del peso en los insectos mantenidos con una dieta de película de almidón de batata y de almidón de yuca. Las diferencias encontradas con estos estudios, pudieran deberse a la

composición proximal y a las diferencias en la digestibilidad de los almidones utilizados, no obstante, estos investigadores no evaluaron la digestibilidad *in vitro* de las películas formuladas.

La supervivencia fue un parámetro que correlacionó positivamente con la dureza ($r = 0,540$; $p < 0,05$; $n = 21$) y la fracturabilidad ($r = 0,448$; $p < 0,05$; $n = 21$) de las películas, mientras que la variación de peso sólo correlacionó con la dureza pero de manera negativa ($r = -0,610$; $p < 0,05$; $n = 21$). El gorgojo de arroz es un insecto que presenta un aparato bucal masticador, adaptado para morder y triturar el alimento (Hickman y col., 1998), por esta razón, los alimentos típicos de estos insectos plaga, presentan una textura dura como los granos sanos de cereales y leguminosas y otros productos almacenados, que les permiten además de alimentarse, horadar y depositar sus huevos en el interior. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las películas comestibles presentan una textura ideal para que los insectos se alimenten y que esta forma de presentación no interfiere con la ingesta.

El modelo del gorgojo de arroz permitió conocer que las dietas de películas comestibles a base de diferentes fuentes de almidón y glicerol no son tóxicas y todas promueven una ganancia de peso en el insecto. Sin embargo, los biomarcadores supervivencia y variación de peso, no permitieron observar diferencias entre las películas comestibles estudiadas, teniendo en cuenta que estas preparaciones presentan diferencias notables en su digestibilidad *in vitro*.

La película de almidón de maíz *waxy* presentó la menor digestibilidad entre las películas estudiadas (Tabla 15), dado que en los insectos alimentados con estas películas se

promovió una mayor actividad α -amilolítica, en comparación con la obtenida con la referencia y la película de almidón de maíz normal. Se ha reportado que las películas de amilopectina son inestables y la estructura cristalina cambia de la forma amorfa a la estructura cristalina tipo B, durante el primer mes de almacenamiento (Myllärinen y col., 2002b). En el presente estudio, el tiempo de almacenamiento de las películas fue diferente en los dos ensayos de digestibilidad (*in vitro* e *in vivo*). Por ejemplo, las películas de almidón de maíz *waxy* empleadas para evaluar la digestibilidad *in vivo* presentaban siete meses de almacenamiento, lo que posiblemente contribuyó a la menor digestibilidad *in vivo* encontrada en estas películas, a pesar de que en los estudios de digestibilidad *in vitro*, con aproximadamente dos meses de almacenamiento, resultaron ser más digeribles que las películas de almidón de maíz normal. Sin embargo, este efecto no fue evidente en el caso de las películas con un alto contenido de almidón resistente (Tabla 12) como la de almidón de papa y de mapuey (con cuatro y siete meses de almacenamiento respectivamente), ya que la actividad α -amilolítica en los insectos fue similar a la obtenida con la película de almidón de maíz normal, lo que no sugiere un posible incremento de la cristalinidad en la películas y como consecuencia una disminución de su digestibilidad con el transcurso del tiempo. Estas diferencias encontradas se deben a las características intrínsecas de los diferentes almidones empleados.

En comparación con la referencia, las películas comestibles pueden ser ordenadas de menor a mayor digestibilidad tomando en cuenta este parámetro: 1) película de menor digestibilidad que la referencia (maíz *waxy*), 2) películas que presentan una digestibilidad similar a la referencia (papa y mapuey) y 3) películas de mayor digestibilidad que la referencia (apio, ocumo chino, yuca y maíz). Dado que la película de almidón de maíz

regular fue más digerible que la referencia, podría considerarse en los estudios de digestibilidad *in vivo* de películas comestibles a base de almidón y glicerol, como la película de referencia. Tomando en cuenta esto, las películas de almidón de mapuey, apio, ocumo chino y yuca presentaron una digestibilidad similar a la película de referencia propuesta (Tabla 15). Solamente las películas de almidón de papa y maíz *waxy* resultaron ser menos digeribles. El aumento de la cristalinidad en estas preparaciones producto de su almacenamiento, podría influir notablemente sobre su digestibilidad *in vivo*.

La mayor excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con las películas a base de almidón en comparación a la obtenida con la dieta de referencia (Tabla 16), podría deberse a un efecto de dilución de los nutrientes (carbohidrato y proteínas principalmente), en la mezcla que constituye la solución formadora de película. Esta dilución tiene dos efectos: primero atenúa el efecto protector de los carbohidratos (Munro, 1951) sobre las proteínas corporales en el insecto, por lo que, las proteínas se degradan para suplir las necesidades de aminoácidos para la síntesis de novo y segundo, al disminuir mucho más la concentración de proteína en la dieta, en relación al óptimo de proteína del insecto (0,5–0,7%, según López, 1999), la deficiencia en los requerimientos proteicos se pronuncia, por lo tanto, existe una mayor degradación de las proteínas corporales y con ello, un aumento en la excreción de ácido úrico.

Al igual que el parámetro de actividad similar a α -amilasa, se podría tomar como dieta de referencia a la película de almidón de maíz normal. Teniendo esto en cuenta, el parámetro excreción de ácido úrico, no permitió observar diferencias entre las películas estudiadas. Todas las películas presentaron una digestibilidad similar a la obtenida con la

película de almidón de maíz, con la excepción de aquella formulada con almidón de apio que fue de menor digestibilidad (Tabla 16).

A pesar de no encontrar diferencias entre la mayoría de las películas ($p > 0,05$), en general, se observó un aumento de la excreción de este metabolito y de la actividad α -amilolítica en los insectos alimentados con estas dietas, lo que indicaría una disminución de la digestibilidad de estas películas comestibles, en comparación con la película de almidón de maíz regular.

A diferencia de los almidones nativos, con las películas comestibles no se encontraron correlaciones entre los parámetros de digestibilidad *in vivo* como la actividad similar α -amilasa y la excreción de ácido úrico, y los parámetros de digestibilidad *in vitro* (almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis). Hay que tener en cuenta, que el proceso de secado de las películas fue diferente para ambos ensayos. Las películas comestibles empleadas para la determinación de la digestibilidad *in vitro* fueron pasadas por un segundo proceso de secado en estufa (ver sección 4.4.2). Las diferencias tanto el proceso de secado como en el tiempo de almacenamiento de las películas son factores que afectan la digestibilidad de las mismas, lo que pudo influir en que no se encontraran correlaciones entre los parámetros *in vitro* e *in vivo*, similares a las obtenidas para los almidones nativos.

VIII. Conclusiones

1. Tomando en consideración la composición química, especialmente su bajo contenido de proteínas y lípidos, todos los almidones aislados presentaron una muy alta pureza, entre 99–100%.
2. Todos los almidones estudiados presentaron contenidos de almidón disponible mayores al 91%, con la excepción del almidón de papa (86%). Los almidones de ocumo chino, apio, papa y mapuey, contienen una alta y muy alta proporción de almidón resistente total, con valores entre 14–56%. Las tasas de α -amilólisis *in vitro* de los almidones crudos fueron muy bajas (2,6–11%), las cuales aumentaron con el proceso de gelatinización (67–91%).
3. El almidón de maíz *waxy* resultó ser más digerible que el almidón de maíz regular. A pesar de tener un menor contenido de almidón disponible e igual contenido de almidón resistente total, fue hidrolizado más rápidamente en su estado crudo (mayor velocidad inicial y magnitud final), pero de manera similar al ser gelatinizados.
4. Los almidones de mayor digestibilidad y, por tanto, de mayor calidad de acuerdo a los parámetros *in vitro* e *in vivo*, fueron el almidón de maíz *waxy* y el de yuca. En contraste, los almidones de papa y de mapuey presentaron la menor digestibilidad, principalmente asociada al muy elevado contenido de almidón resistente total. La baja supervivencia (76%) y la pérdida de peso (-13%) encontrada en los insectos alimentados con la dieta de almidón de papa, sugiere una toxicidad moderada sobre los insectos producto de una baja biodisponibilidad de este almidón nativo.
5. Se formularon satisfactoriamente películas comestibles a base de almidón de maíz, maíz *waxy*, mapuey, apio y papa al 5% (p/v) y de ocumo chino y yuca al 6% (p/v),

con la incorporación de 2% (v/v) de glicerol; resultando en películas fácilmente manejables y flexibles.

6. El grosor de las películas es un factor que influyó directamente sobre la permeabilidad al vapor de agua, la solubilidad y la capacidad de retención de agua. Las películas de almidón de yuca y maíz *waxy* presentaron las mejores propiedades de barrera al vapor de agua, sin embargo, fueron altamente solubles y tolerantes al agua. Lo contrario ocurrió con las películas de almidón de papa y mapuey. Estas últimas, presentan un potencial adecuado para recubrir productos de alta humedad como las frutas frescas cortadas.
7. Desde el punto de vista de la digestibilidad del almidón, con las películas comestible se originan cambios en los contenidos de almidón disponible, almidón resistente total, así como en la tasa de hidrólisis enzimática. Las películas presentaron contenidos de almidón disponible entre 58–70%, con contenidos altos de almidón resistente total, como en las películas de almidón de mapuey y de papa (10–12%) y una cinética de hidrólisis también elevada como consecuencia del tratamiento térmico empleado para la preparación de la película.
8. Las películas elaboradas con el almidón de maíz *waxy* fueron más digeribles que las preparadas con el almidón de maíz regular, presentando un mayor contenido de almidón disponible, un menor contenido de almidón resistente y una mayor cinética de hidrólisis, tanto en su estado crudo como gelatinizado. La solubilidad en agua y la capacidad de retención de agua son dos propiedades fisicoquímicas de las películas que influyen notablemente sobre los parámetros de digestibilidad *in vitro* de las películas comestibles a base de almidón y glicerol.

9. La supervivencia y la variación de peso no fueron biomarcadores apropiados para evidenciar diferencias entre las dietas de películas comestibles. Por su parte, la excreción de ácido úrico y la actividad similar a α -amilasa fueron biomarcadores que permitieron evaluar la calidad nutricional de los almidones aislados, pero no de las películas comestibles.
10. El procedimiento de secado y el tiempo de almacenamiento de las películas son factores que pudieron afectar la obtención de las correlaciones entre los biomarcadores y los parámetros de digestibilidad *in vitro*, a juzgar los cambios morfológicos observados en las micrografías de las vistas superficiales y transversales de algunas de las películas comestibles recién preparadas (una semana) y después de siete meses de almacenamiento. Por lo cual, es necesario formular películas, tomando las precauciones (por ejemplo, acondicionamiento de las mismas) para hacerlas totalmente comparables a las utilizadas en los estudios *in vitro* realizados.

IX. Recomendaciones

Se recomienda:

1. Evaluar la incorporación de ingredientes prebióticos en las películas comestibles con elevados contenidos de almidón resistente.
2. Estudiar las películas comestibles formuladas como vehículo de ingredientes probióticos, lo que contribuiría a ampliar los usos de estas preparaciones.
3. Evaluar el efecto del doble secado en las películas comestibles sobre la digestibilidad *in vitro*.
4. Evaluar el posible efecto del tiempo de almacenamiento de las películas sobre la digestibilidad de las mismas.

X. Bibliografía

- AACC. 2001. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, **46**: 112–126.
- AACC. 2003. **Approved method of the American Association of Cereal Chemist** (7.^a ed.). St. Paul, MN, EE.UU.
- Adeodato, M., Altenhofen, M., Oliveira, L. y Masumi, M. 2011. Natural-based plasticizer and biopolymer films: a review. *European Polymer Journal*, **47**: 254–263.
- Alanis-López, P., Solorza-Feria, J., López-González, C., Solano-Navarro, A. y Trujillo-Hernandez, C. 2010. Morfología de biopelículas elaboradas con almidón de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.) nativo y oxidado. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México.
- Alarcón, F. J., Peregrina, A., Martínez, T. F., Mayoral, J. G. y Barranco, P. 2004. La digestión de carbohidratos en las larvas del gorgojo rojo de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleóptera: Curculionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, **30**: 519–532.
- Alvis, A., Vélez, C., Villada, H. y Rada-Mendoza, M. 2008. Análisis físico-químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas. *Información Tecnológica*, **19**: 19–28.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S. y Yamamoto, N. 1997. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols: part 3. *Food Chemistry*, **60**: 593–604.
- Asp, N.-G. 1992. Resistant starch. *European Journal of Clinical Nutrition*, **46**: S1.
- ASTM. 1995. **Standard methods for water vapor transmission of materials (E96-95)**. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, American Society for Testing and Materials.
- Badui, S. 2006. **Química de los alimentos** (4.^a ed.). Prentice Hall. Logman de México Edición S.A. D.C. C.V. Naucapal de Juárez, Edo. de México. Págs, 80–92.
- 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.
- Baker, J. E. y Woo, S. M. 1992. Digestion of starch granules by α -amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage, and detergent treatment. *Insect Biochemistry of Molecular Biology*, **22**: 529–537.
- Banker, G. S., Gore, A. Y. y Swarbrick, J. 2000. Water vapor transmission properties of free polymer films. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **18**: 173–176.
- Bello, L., Meza, K., Contreras, S. y Paredes, O. 1999. Isolation and partial characterization of banana starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 854–857.
- Bello, L., Meza, K., Contreras, S. y Paredes, O. 2001. Functional properties of corn, banana and potato starches blends. *Acta Científica Venezolana*, **52**: 62–67.
- Bello, L. 2010. Extracción, purificación y caracterización del almidón de 21 clones del banco de germoplasma de musáceas del INIA. Elaboración de un producto tipo pudín. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Sáyago-Ayerdi, S. G. y Moreno-Damián, E. 2000. Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/Starkë*, **52**: 68–73.
- Bello-Pérez, L., Contreras-Ramos, S., Romero-Manilla, R., Solorza-Feria, J. y Jiménez-Aparicio, A. 2002. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (Var. Macho). *Agrociencia*, **36**: 169-180.
- Bello-Pérez, L., Sáyago-Ayardi, S., Méndez-Montealvo, G. y Tovar, J. 2004. *In vitro* digestibility of de banana starch cookies. *Plant Foods for Human Nutrition*, **59**: 79-83.
- Bertuzzi, M. A., Castro-Vidaurre, E. F., Armada, M. y Gottifredi, J. C. 2007. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, **80**: 972-978.
- Biró, G. 2006. How does the bioavailability of ingredients in functional foods influence the human biological efficiency? *Agro Food Industry Hi-Tech*, **17**: 24–27.
- Björck, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J. y Asp, N.-G. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*, **59**: 699S–705S.
- Boatella, J. y Codony, R. 2004. **Química y Bioquímica de los Alimentos II**. Edicions Universitat. Barcelona.
- Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, **15**: 237–248.
- Bourtoom, T. y Chinnan, M. 2008. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *Food Science and Technology*, **41**: 1633–1641.
- Brown, R. P., Creech, R. G. y Johnson, L. J. 1971. Genetic control of starch granule morphology and physical structure in developing maize endosperms. *Crop Science*, **11**: 297–302.
- Cao, N., Yang, X. y Fu, Y. 2009. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, **23**: 729–735.
- Caraballo, D. 2011. Modificación del almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por metilación para aplicaciones en alimentos y biomedicina. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Cárdenas, M., Pérez, E. y Tovar, J. 1998. Pirodextrinización de almidones de yuca y sorgo: un procedimiento para la obtención de material indigerible. Memorias del “Seminario Proyecto PIP XI.8: Obtención y caracterización de carbohidratos para aplicación en alimentos para regímenes especiales, CYTED”. Baños, Ecuador. pp. 255–264.
- Carmona, A. y Gómez-Sotillo, A. 1997. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales Venezolanos de Nutrición*, **10**: 20–26.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A. y Casotto, M. 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “artropocéntrico”. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **1**: 37–40.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A. y 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.

- Carrasco, E. U., Villarroel, M. y Cevallos, L. C. 2002. Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (*Capsicum annuum* L.) durante el almacenamiento. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **52**: 84–90.
- Charley, H. 2004. **Tecnología de Alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la Preparación de Alimentos**. Noriega Editores. México.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. y Del Nobile, M. A. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, **88**: 159–168.
- Chinnan, M., y Park, H. J. 1995. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *Journal of Food Process and Engineering*, **18**: 417–429.
- Chin-Lin, H., Wenlung, C., Yih-Ming, W., Chin-Yin, T. 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, **83**: 85–92.
- Colonna, P., Leloup, V., y Buleón, A. 1992. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, **46**: S17–S32.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. y Tang, M. C. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, **23**: 1527–1534.
- Daubioul, C. A., Taper, H. S., De Wispelaere, L. D. y Delzenne, N. M. 2000. Dietary oligofructose lessens hepatic steatosis, but does not prevent hypertriglyceridemia in obese Zucker rats. *Journal of Nutrition*, **130**: 1314–1319.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A. y Voilley, A. 1998. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Food Science and Nutrition*, **38**: 299–313.
- Delzenne, N. M. y Kok, N. 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**: 456S–458S.
- Dojnov, B., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J. y Vujčić, Z. 2008. Purification and properties of midgut α -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **149**: 153–160.
- Donhowe, I. G. y Fennema, O. R. 1993. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of methylcellulose films. *Journal of Food Processing and Preservation*, **17**: 247–257.
- Drewnowski, A. y Popkin, B. M. 1997. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nutritional Review*, **55**: 31–43.
- Edel León, A., Oliete, B., Moita, C., Collar, C., Rosell, C., Pérez, E., Pérez, G. T., Igrejas, G., Cortez, G., Quispe, L., Gómez, M., Arocha, M., Puppo, M. C., Añón, M. C., Ramos, M. I., María De Almeida, J., Haros, M., Ribotta, P., Ronayne, P., Montes, R., Repo-Carrasco, R. y Pedroza, R. 2007. **De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica**. Córdoba-Argentina. <http://www.agro.unc.edu.ar>. Acceso: 8 de junio de 2012.
- Englyst, H. N. y Cummings, 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. y Cummings, J. H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, **46**: S3–S50.

- Famá, L., Rojas, A., Goyanes, S. y Gerschenson, L. 2005. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **38**: 631–639.
- Famá, L., Goyanes, S. y Gerschenson, L. 2007. Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, **70**: 265-273.
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S. y Gerschenson, L. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, **40**: 257–265.
- Forsell, P., Lahtinen, R., Lahelin, M. y Myllärinen, P. 2002. Oxygen permeability of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, **37**: 125–129.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. y Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, **269**: 397–412.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E. y Pérez-Álvarez, J. A. 2010. Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International*, **43**: 931–942.
- 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.
- Gallaher, D. D. y Schneeman, B. O. 2003. Fibra alimentaria. Págs. 90-97 en: Bowman, B. A. y Russell, R. M (eds.). **Conocimientos actuales sobre nutrición** (8.^a ed.). No. 592. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D. C.
- Gallant, D. J., Bewa, M., Buy, Q. H., Bouchet, B., Szylit, O., y Sealy, L. 1982. On ultrastructural nutritional aspects of some tropical tuber starches. *Stärke*, **34**: 255-262.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., Buleón, A. y Pérez, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*, **46**: S3–S16.
- Gamero, M. 2009. Toxicidad *in vivo* y proteómica comparativa para el estudio de la expresión de proteínas con actividad insecticida presentes en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Ganong, W. F. 2003. **Review of Medical Physiology** (21.^a ed.). Lange Medical Books/McGraw-Hill. Nueva York. Págs, 511–515.
- García-Alonso, A., Jimenez-Escrig, A., Martín-Carrón, N., Bravo, L. y Saura-Calixto, F. 1999. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. *Food Chemistry*, **66**:181–187.
- García, M., Martino, M. y Zaritzky, N. 1998. Starch-based coatings: effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of Science Food and Agriculture*, **76**: 411–420.
- García, O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos, utilizando el bioensayo con el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- García, A. D. y Pacheco-Delahaye, E. 2007. Evaluación de galletas dulces tipo wafer a base de harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, **60**: 4195-4212.
- García, N. L., Famá, L., Dufresne, A., Aranguren, M. y Goyanes, S. 2009. A comparison between the physic-chemical properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, **42**: 976-982.
- Gennadios, A., Bradenburg, A. H., Park, J. W., Weller, C. L., y Testin, R. F. 2004. Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolates films. *Industrial Crops and Products*, **2**: 189-195.
- Gianibelli, M. C., Sissons, M. J. y Batey, I. L. 2005. Effect of source and proportion of waxy starches on pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, **82**: 321-327.
- Giese, J. 1995. Measuring physical properties of food. *Food Technology*, **49**: 54-63.
- Gimeno, R. E. y Klamann, L. D. 2005. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Current Opinion of Pharmacology*, **5**: 122-128.
- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, C. L. 1992. Edible wheat gluten film: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, **57**: 190-199.
- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J. L. 1993. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, **58**: 206-211.
- 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, Z. y Pérez, E. 2003. Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pregelatinizados y calentados con microondas. *Acta Científica Venezolana*, **54**: 127-137.
- Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E. y Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*, **56**: 445-449.
- Han, J. H. 2002. **Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents**. CRC-Press. Boca Ratón, Florida.
- Han, J. y Gennadios, A. 2005. Edible films and coatings: a review. *Innovations in Food Packaging*, **15**: 239-260.
- Haros, M., Tolaba, M. y Suárez, C. 2003. Influence of corn drying on its quality for the wetmilling process. *Journal of Food Engineering*, **60**: 177-184.
- Haros, M., Blaszcak, W., Pérez, O. E., Sadowska, J. y Rosell, C. M. 2006. Effect of ground corn steeping on starch properties. *European Food Research and Technology*, **222**: 194-200.
- 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, E. 1997. Digestibilidad *in vitro* de almidones de lenteja, apio, sorgo y maíz nativos y modificados. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Hernández, O. 2006. Películas y coberturas comestibles a base de diferentes almidones: digestibilidad *in vitro* de películas y caracterización física de coberturas sobre fresas

- (*Fragaria ananassa*). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Hernández, O., Emaldi, U. y Tovar, J. 2008. *In vitro* digestibility of edible films from various starch sources. *Carbohydrate Polymers*, **71**: 648–655.
- Hickey, D. A., Benkel, B. 1982. Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: Effects of dietary carbohydrate. *Biochemical Genetics*, **20**: 1117-1129.
- Hickman, C., Roberts, L. y Parson, A. 1998. **Principios integrales de zoología** (10^a ed.). Madrid: MacGraw-Hill/Interamericana. Págs, 415–419.
- Hizukuri, S. 1985. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, **141**: 295-306.
- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A.-C., Asp, N.-G., Larsson, K. y Lundquist, I. 1983. Digestibility of amylose-lipid complexes *in vitro* and *in vivo*. *Starch/Stärke*, **35**: 294–297.
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.-G., Sjöberg, L.-B. y 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. y Asp, N.G. 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch/Stärke*, **38**: 224–226.
- Hoover, R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, **45**: 253–267.
- Hostettler, F., Borel, E. y Deuel, H. 1951. Über die reduktion der 3,5 dinitrosalicylsäure durch Zucker. *Helvetica Chimica Acta*, **34**: 2132–2139.
- Huang, D. 2001. Selecting an optimum starch for snack development. *Cereal Food World*, **6**: 237–239
- Huang, C. C, Chen, W. C, Wang, C. C. R. 2007. Comparison of Taiwan paddy and upland cultivated taro (*Colocasia esculenta* L.) cultivars for nutritive values. *Food Chemistry*, **102**: 250–256.
- Jay, J. 1996. **Modern Food Microbiology** (5.^a ed.). Champan & Hall Pub. Nueva York.
- Jangchud, A., y Chinnan, M. S. 1999. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **32**: 89–94.
- Jansson, A. y Thuvander, F. 2004. Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. *Carbohydrate Polymers*, **56**: 499–503.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P. y Chiralt, A. 2012. Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, **5**: 2058–2076.
- Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 210–218.
- Kampeerappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D. y Srikulkit, K. 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*, **67**: 155-163.
- Kaya, S. y Kaya, A. 2000. Microwave drying effects on properties of whey protein isolate edible films. *Journal of Food Engineering*, **43**: 91–96.
- Kester, J. J. y Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, **40**: 47–59.

- Koskinen, M., Suortti, T., Autio, K., Myllärinen, P., y Poutanen, K. 1996. Effect of pretreatment on the film forming properties of potato and barley starch dispersions. *Industrial Crops and Products*, **5**: 23–34.
- Larotonda, F., Matsui, K., Soldi, V. y Laurindo, J. 2004. Biodegradable films made from raw and acetylated Cassava starch. *Brazilian Archives of Biology and Technology, an International Journal*, **47**: 477–484.
- Laurentin, A. 1999. Caracterización fisicoquímica y digestibilidad *in vitro* de almidones de maíz, ocumo y lenteja, irradiados con microondas y pirodextrinizados. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asistente, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Laurentin, A., Cárdenas, M., Ruales, J., Pérez, E., y Tovar, J. 2003. Preparation of indigestible pyrodextrins from different starch sources. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5510–5515.
- Laurentin, A. 2004. Starch pyrodextrins: *In vitro* fermentation and physiological effects. Tesis Doctoral, Universidad de Glasgow. Glasgow, Escocia.
- Laurentin, A., y Edwards, C. A. 2013. Fiber: Resistant starch and oligosaccharides. En: Caballero, B. (ed.) **Encyclopedia of Human Nutrition** (3.^a ed.), Págs, 246-253. Waltham, MA: Academic Press.
- Laurentin, A., Lovera, M., Rojas, C., Gamero, M., Edwards, C. A., Tapia, M. S., Diez, N., Bernal, C. y Carmona, A. 2008. Estudios nutricionales con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **5**: 57-60.
- Lee, J. T. 1999. Evaluation of the functional stability of microcrystalline cellulose (MCC): carrageenan conventional aqueous film coating. Annual Meeting, Nov. 14-18, AAPS Abstract No. 3459.
- Lee, J. Y., Shim, J. y Lee, H. G. 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, **56**: 251–254.
- Li, Y., Shoemaker, C., Ma, J., Shen, X. y Zhong, F. 2008. Paste viscosity of rice starches of different amylose content and carboxymethylcellulose formed by dry heating and the physical properties of their films. *Food Chemistry*, **109**: 616–623.
- Lim, S. T., Kasemsuwan, T. y Jane, J. L. 1994. Characterization of phosphorus in starch by ³¹P nuclear magnetic spectroscopy. *Cereal Chemistry*, **71**: 468–472.
- 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.
- López, H. W., Levrat-Verny, M. A, Coudray, C., Besson, C., Krespine, V., Messenger, A., Demigne, C. y Remesy, C. 2000. Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *Journal of Nutrition*, **131**: 1283–1286.
- López, O., García, M. y Zaritzky, N. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, **73**: 573–581.
- López, O., Zaritzky, N. y García, M. 2010. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, **100**: 160–168.

- 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.
- Lovera, M., Hernández, O., Tapia, M. S., Pérez, E., Emaldi, U., Laurentin, A. y Tovar, J. 2012. Digestibilidad *in vitro* de películas comestibles a base de diferentes almidones. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **6**: 113–116.
- 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.
- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M. H. y Karim, A. A. 2007. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science*, **72**: C324–30.
- Mali, S., Grossman, M., García, M., Martino, M. y Zaritzky, N. 2002. Microestructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, **50**: 379–386.
- Mali, S., Grossmann, M., García, M., Martino, M. y Zaritzky, N. 2004a. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, **56**: 129–135.
- Mali, S., Karam, L. B., Ramos, L. P. y Grossmann, M. V. 2004b. Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **52**: 7720–7725.
- Mali, S., Grossman, V., García, M., Martino, M y Zaritzky, N. 2006. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, **75**: 453–460.
- Mann, J. 2003. Carbohidratos. Págs. 64–77 en: Bowman, B. A. y Russell, R. M (eds.). **Conocimientos actuales sobre nutrición** (8.^a ed.). No. 592. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D. C.
- Marcano, O. 1975. Características físicas y químicas del almidón de apio (*Arracacias xanorrhiza*). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Marín, J. G. 2009. Estudio del almidón presente en el fruto de variedades de musáceas cultivadas en Venezuela. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Marti del Moral, A., Moreno-Aliaga, M. J. y Martínez-Hernández, J. A. 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria*, **4**: 181–188.
- 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.
- Martin-Polo, M., Mauguin, C. y Volley, A. 1992. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 1. Influence of the film preparation technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 407–412.
- Mataix, J. 2009. **Tratado de Nutrición y Alimentación**. Editorial Océano. España. Págs, 164–173; 537–539 y 563–571.
- Mathew, S., y Abraham, T. E. 2008. Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, **22**: 826–83.

- Mayes, P. A. y Bender, D. A. 2003. Carbohydrates of physiologic significance. Págs. 102-110 en: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. y Rodwell, V. W. (eds.), **Harper's Illustrated Biochemistry** (26.^a ed.). McGraw-Hill. Nueva York.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., y Krochta, J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, **58**: 899-903.
- Melito, C. 1998. Aislamiento, caracterización fisicoquímica, susceptibilidad a la hidrólisis enzimática y generación de almidones nativos, pregelatinizados y entrecruzados de arroz (*Orisa sativa*), apio (*Arracacia xanthorrhiza*) y haba criolla (*Canavalia ensiformis*). Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., y Voilley, A. 2000. Temperature influence on moisture transfer through synthetic films. *Journal of Membrane Science*, **168**: 223-231.
- Munro, H. N. 1951. Carbohydrate and fat as factors in protein utilization and metabolism. *Physiological Reviews*, **31**: 449-488.
- Myllärinen, P., Partanen, R., Seppälä, J., y Forsell, P. 2002a. Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, **50**: 355-361.
- Myllärinen, P., Buleon, A., Lahtinen, R., y Forsell, P. 2002b. The crystallinity of amylase and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, **48**: 41-48.
- Niba, L. L. 2002. Resistant starch: a potential functional food ingredient. *Nutrition and Food Science*, **32**: 62-67.
- Orthofer, F. T. 1991. Industrial modification of starch. *Cereal Foods World*, **29**: 507-514.
- Ortiz, S. 2010. Propiedades físicas, mecánicas y bioensayo con *Sitophilus oryzae* de películas comestibles de almidón con probióticos, prebióticos y omega-3. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Paes, S. S., Yakimets, I., y Mitchell, J. R. 2008. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, **22**: 788-797.
- Palomino, C., Molina, Y. y Pérez, E. 2010. Atributos físicos y composición química de harinas y almidones de los tubérculos de *Colocasia esculenta* (L.) y *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)*, **36**: 58-66.
- Pareta, R. y Edirisinghe, M. J. 2006. A novel method for the preparation of starch films and coatings. *Carbohydrate Polymers*, **63**: 425-431.
- Park, H. J., Weller, C. L., Vergano, P. J., y Testin, R. F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible materials. *Journal of Food Science*, **58**: 1361-1364.
- Park, H. J., Bunn, J. M., Weller, C. L., Vergano, P. J. y Testin, R. F. 1994. Water vapor permeability and mechanical properties of grain protein-based films as affected by mixtures of polyethylene glycol and glycerin plasticizers. *American Society of Agricultural Engineers*, **37**: 1281-1285.
- Parra, D. F., Tadini, C. C., Ponce, P. y Lugão, A. B. 2004. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, **58**: 475-481.
- Pérez, E., Bahnassey, Y. y Breene, W. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of amaranthus starch. *Starch*, **45**: 211-214.

- Pérez, E. 1994. Caracterización de las propiedades funcionales de almidones nativos y modificados. I. Métodos físicos de extrusión, deshidratación con doble tambor e irradiación gamma y microondas. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asociado, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pérez, E., Borneo, R., Melito, C. y Tovar, J. 1999. Chemical, physical, and morphometric properties of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B.) Starch. *Acta Científica Venezolana*, **50**: 240–244.
- Pérez, E., Schultz, F. y Pacheco de Delahaye, E. 2005. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro). *Carbohydrate Polymers*, **60**: 139–14.
- Pérez, E., Gibert, O., Rolland-Sabaté, A., Jiménez, Y., Sánchez, T., Giraldo, A., Pontoire, B., Guilois, S., Lahon, M.-C., Reynes, M. y Dufour, D. 2011. Physicochemical, functional and macromolecular properties of waxy yam starches discovered from “Mapuey” (*Dioscorea trifida*) genotypes in the Venezuelan Amazon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 263–273.
- Pérez, E., Segovia, X., Tapia, M. S. y Schroeder, M. 2012. Native and cross linked modified *Dioscorea trifida* (cush-cush yam) starches as bio-matrices for edible films. *Journal of Cellular Plastics*, **48**: 545–556.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A. y Luu, D. 2009. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, **90**: 548–558.
- Psomiadou, E., Arvanitoyannis, I. y Yamamoto, N. 1996. Edible films from natural resources microcrystalline cellulose, methylcellulose and corn starch and polyols – Part 2. *Carbohydrate Polymers*, **31**: 194–204.
- Rached, L., Vizcarrondo, C., Roncón, A. y Padilla, F. 2006. Evaluación de harinas y almidones de mapuey (*Dioscorea trifida*), variedades blanco y morado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **56**: 375–383.
- Rhim, J. W. 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37**: 323–330.
- Roa, V. y Tapia de Daza, M. 1991. Evaluation of water activity measurements with a dew point electronic humidity meter. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **24**: 208–213.
- Roberfroid, M. B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, **87**: S139–S143.
- Robertson, G. L. 2012. **Food Packaging: Principles and Practice** (3.^a ed.). CRC-Press. Boca Ratón, Florida. Págs, 99–103.
- Robutti, J. L. 2004. Calidad y usos del maíz. *IDIA XXI*, **6**: 100–104.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K. y Maté, J. 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research Internacional*, **39**: 840–846.
- Rodríguez, M. 2011. Elaboración de un producto tipo colado a partir de almidones modificados y harinas de *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S., Rodríguez, F.J., Carmona, A., y Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*. **21**: 118–127.

- Rojas, C. 2007. Evaluación nutricional de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Romero-Bastidas, C., Bello-Pérez, L., García, M., Martino, M., Solorza-Feria, J. y Zaritzky, N. 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*, **60**: 235–244.
- Rosenthal, A. 2001. **Textura de los alimentos: medida y percepción**. Editorial ACRIBIA S. A. Zaragoza-España. Págs, 99–114.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. 2006. Resistant starch – a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**: 1–17.
- Sangeetha, M.T.R. 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids*, **20**: 557–566.
- Santacruz, S., Koch, K., Svensson, E., Ruales, J. y Eliasson, A-C. 2002. Three underutilised sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part I. Physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, **49**: 63–70.
- Schoch, T. J. 1964. Fatty acids substances in starch, en: **Methods in Carbohydrates Chemistry**. Whistler R. L. (ed). Academic Press, Nueva York. Págs, 56–61.
- Segovia, X. 2010. Elaboración de películas y coberturas a partir de almidón de mapuey nativo y modificado. Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Seydim, A. C. y Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, **39**: 639–644.
- Shrestha, A., Arcot, J. y Paterson, J. 2003. Edible coating materials –their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Research International*, **36**: 921-928.
- Silva, C. P., Terra, W. R. y Xavier-Filho, J. 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes Subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry of Molecular Biology*, **3**: 41-50.
- Singh, J., Kaurb, L. y McCarthy, O. J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, **21**: 1–22.
- Sívoli, L. 2009. Cambios en la estructura granular, molecular y cristalina del almidón de yuca por efecto de la modificación química (fosfatación-acetilación). Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Sothornvit, R. y Krochta, J. M. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of blactoglobulin films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 6298–6302.
- Sothornvit, R. y Pitak, N. 2007. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*, **40**: 365–370.
- Swinkels, J. 1985. Sources of starch its chemistry and physics. In: **Starch conversion Technology** (Ed). GMA. Marcel Dekker, Inc. Págs,15–46.
- Szepesi, B. 1991. Carbohidratos. Págs. 56–58 en: **Conocimientos actuales sobre nutrición** (6.ª ed.). Organización Panamericana de la Salud. No. 532. Washington, D. C.

- Szwarcbort, J. 1980. Efectos de algunos factores antinutricionales presentes en granos de leguminosas sobre el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Tapia, M. S. 2007. Desarrollo de un producto funcional de fruta por impregnación a vacío y películas comestibles usando matrices sólidas de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A. y Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, **72**: 190–196.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Carmona, A., Rodríguez, F. J., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. 2008. Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*, **22**: 1493–1503.
- Tapia, M. S. y Carmona, A. 2008. Uso de la impregnación a vacío y de películas comestibles en el desarrollo de un alimento funcional a base de papaya (*Carica papaya* L.) c.v Maradol. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **5**: 110-114.
- Tapia, M. S., Pérez, E. Rodríguez, P. E., Guzmán, R., Duncamp-Collin, M.-N., Tran, T. y Rolland-Sabaté, A. 2012. Some properties of starch and starch edible films from under-utilized roots and tubers from the Venezuelan Amazon. *Journal of Cellular Plastics*, **48**: 526–544.
- Terra, W. R. y Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **109**: 1–62.
- Tester, R., Karkalas, J. y Qi, X. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, **39**: 151–165.
- Thomas, S. y Atwell, W. 1999. **Starches. Critical guide for the food industry**. Eagan Press, St Paul, Minnesota.
- Tovar, J., Björck, I y Asp, N. 1990. Analytical and nutritional implications of limited enzymatic availability of starch in cooked red kidney beans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **38**: 488–493.
- Tovar, J. 1992. Bioavailability of starch in processed legumes. Importance of physical inaccessibility and retrogradation. Tesis Doctoral, Universidad de Lund, Suecia.
- Tovar, J. 1994. Natural and man-made resistant starch. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, **5**: 23–25.
- Tovar, J. y Melito, C. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 2642–2645.
- Tovar, J., Melito, C., Herrera, E., Laurentin, A. y Pérez, E. 1999a. Starch modification from a nutritional point of view. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, **10**: 27–30.
- Tovar, J., Herrera, E., Laurentin, A., Melito, C. y Pérez, E. 1999b. *In vitro* digestibility of modified starches. En: **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 3. S. G. Pandalai (Ed.) Research Singpost. Trivandrum. pp 1–10.
- Tovar, J. 2001a. Métodos para la determinación del contenido de almidón resistente en los alimentos. Págs.143–154 en: Lajolo F. M., Saura-Calixto, F., Wittig de Penna, E. y Wenzel-Menezes, E. (eds), *Fibra Alimentaria en Iberoamérica*. Livraria Varela Ltd, São Paulo, Brasil.

- Tovar, J. 2001b. Origen botánico y procesamiento como determinantes de la digestibilidad del almidón. *Memorias del instituto de Biología Experimental*, **3**: 57–60.
- Tovar, J., Melito, C., Herrera, E., Rascón, A. y Pérez, E. 2002. Resistant starch formation does not parallel syneresis tendency in different starch gels. *Food Chemistry*, **76**: 455–459.
- Tovar, J., Sáyago-Ayerdi, G., Peñalver, C., Paredes-López, O. y Bello-Pérez, L.A. 2003. *In vitro* starch hydrolysis index and predicted glycemic index of corn tortilla, black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), and mexican “taco”. *Cereal Chemistry*, **80**: 533–535.
- Tovar, J., Fernández-Piedra, M. y Blanco-Metzler, A. 2005. Digestibilidad *in vitro* del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*, **30**: 780–783.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, **6**: 24–32.
- Villalobos-Carvajal, R., Hernández-Muñoz, P., Albors, A. y Chiralt, A. 2009. Barrier and optical properties of edible hydroxypropyl methylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices. *Food Hydrocolloids*, **23**: 526–53.
- Voet, D y Voet, J. D. 2006. **Bioquímica** (3.^a ed.). Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Wool, D., Namir, Z. y Bergerson, O. 1986. Dietary regulation of amylase activity levels in flour beetles (Coleoptera: Tenebrionidae): (*Tribolium*). *Annals of the Entomological Society of America*, **79**: 407–413.
- Xu, X. Y., Kim, K. M., Hanna, M. A. y Nag, D. 2005. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products an International Journal*, **21**: 185–192.
- Yang, L. y Paulson, A. T. 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, **33**: 563–570.
- Zaidul, I., Nik, N., Mohod, A., Yamauchi, H. y Noda, T. 2007. RVA analysis of mixtures of wheat flour and potato, sweet potato, yam, and cassava starches. *Carbohydrate Polymers*, **69**: 784–791.
- Zhang, P., Hamaker, B. R. 2012. Banana starch structure and digestibility. *Carbohydrate Polymers*, **87**: 1552–1558.
- Zobel, H. F. 1988a. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch*, **40**: 1–7.
- Zobel, H. F. 1988b. Molecules to granules – A comprehensive starch review. *Starch/Staerke*, **40**: 44–50.