

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR**



***EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y NUTRICIONAL DE
ALMIDONES Y PELÍCULAS COMESTIBLES
A BASE DE ALMIDÓN***

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la Licenciada Mighay Carlet Lovera Fuchs, para optar al título de Doctora en Ciencias, mención Biología Celular.

Tutor: Dr. Alexander Laurentin

Caracas – Venezuela
Julio 2015



VEREDICTO

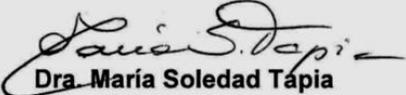
Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y por el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por la Lic. **Mighay Lovera**, titular de la Cédula de Identidad No. **17.482.187**, bajo el título **“EVALUACIÓN FISCOQUÍMICA Y NUTRICIONAL DE ALMIDONES Y PELÍCULAS COMESTIBLES A BASE DE ALMIDÓN”** a los fines de cumplir con el requisito legal para optar al grado de **DOCTOR EN CIENCIAS - Mención BIOLÓGÍA CELULAR**, dejan constancia de lo siguiente:

- 1º Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del Jurado, éste fijó el día **17/07/2015** a las **9:00 am.** para que la autora lo defendiera en forma pública, lo cual éste hizo en la sala “Usos Múltiples” del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado; todo ello conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado vigente.
- 2º Finalizada la defensa pública del trabajo, el jurado decidió **APROBARLA** por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por la Autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

CIUDAD UNIVERSITARIA DE CARACAS – PATRIMONIO MUNDIAL

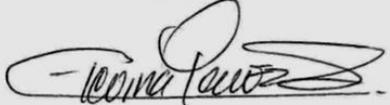
3° El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad. Para dar este veredicto el jurado estimó que, la contribución hecha por la licenciada Lovera es un aporte a la ciencia y tecnología de materiales biodegradables elaborados a partir de almidón de siete fuentes botánicas, algunas no convencionales. Los resultados obtenidos sugieren un potencial para su aplicación en la industria de alimentos y otras industrias. Además, el trabajo establece correlaciones particulares entre los estudios *in vitro* con los ensayos *in vivo*. Finalmente, se resalta que tanto la redacción del manuscrito como la presentación oral fue de alta calidad académica.

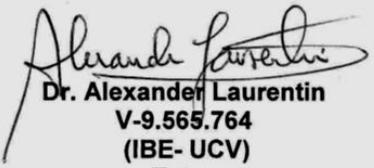
En fe de lo cual se levanta la presente ACTA a los diecisiete días del mes de julio del año dos mil quince, dejándose también constancia de que, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como jurado, el tutor del trabajo, el Dr. Alexander Laurentin.


Dra. María Soledad Tápia
V- 3.914.268
(ICTA-UCV)
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad


Dra. Mercedes Schnell
V-3.242.367
(Facultad de Medicina, UCV)
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad


Dra. Alexia Torres
V-4.888.049
(USB)
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado


Dra. Elevina Pérez
V-3.710.533
(ICTA-UCV)
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado


Dr. Alexander Laurentin
V-9.565.764
(IBE-UCV)
Tutor

AG- 17/07/2015

CIUDAD UNIVERSITARIA DE CARACAS – PATRIMONIO MUNDIAL



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 fisicoquímicas 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 regular, 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 físico, químico, mecánico, morfológico y propiedades de barrera y (iii) se caracterizaron nutricionalmente las películas comestibles formuladas. Las películas comestibles a base de almidón de maíz regular, maíz *waxy*, mapuey, apio y papa al 5% (p/v) y de ocumo chino y yuca al 6% (p/v) se formularon 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 variables de almidón disponible (58–70%), almidón resistente total (1,1–11,8%) y almidón retrogradado (0,06–2,86%), así como una alta tasa de hidrólisis enzimática en su estado crudo (43–83% a los 60 min). *In vitro* pero no *in vivo*, las películas elaboradas con el almidón de maíz *waxy* fueron más digeribles que las preparadas con el almidón de maíz regular; posiblemente factores extrínsecos al almidón afecten su biodisponibilidad. El análisis de componentes principales utilizado para evaluar el efecto combinado de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón (*in vivo* e *in vitro*), mostró que a excepción de las películas de almidón de maíz *waxy* y yuca, la gelatinización térmica empleada para su elaboración aumentó la digestibilidad del almidón, sin embargo, con la formulación ocurrió una dilución de los nutrientes. Por su parte, el efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles, se observó en las propiedades de barrera, físicas, mecánicas y en la digestibilidad *in vitro* de las películas; siendo más delgadas, transparentes, solubles y digeribles las películas de almidón de maíz *waxy* y yuca. Este estudio permitió identificar propiedades fisicoquímicas y nutricionales en las películas comestibles, que podrían contribuir a ampliar las aplicaciones de estas preparaciones como materiales termoplásticos comestibles, biodegradables, económicos y de gran versatilidad, que benefician la salud de los consumidores.

Physicochemical and nutritional evaluation of starches and starch based edible films

Abstract

Edible films are thin layers of a polymeric material that can be consumed directly as a sheet or as part of a food. They provide a physical barrier that extends food shelf life and can be a vehicle for functional ingredients. Edible films can be developed from starches of various botanical sources and due to their polymeric characteristics particular physicochemical and nutritional properties are obtained. The purpose of this study was to evaluate the physicochemical and nutritional properties of edible films produced with regular corn, waxy corn (*Zea mays* L.), white cush-cush yam (*Dioscorea trifida* L.), cassava (*Manihot sculenta* Crantz), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), taro (*Colocasia esculenta* L.) and potato starches (*Solanum tuberosum* L.). (i) Starches were isolated and nutritionally characterized by studying *in vitro* (available starch, total resistant starch and α -amylolysis rate) and *in vivo* (survival, weight variation, α -amylase like activity and uric acid excretion in the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L.) digestibility; (ii) edible films were made and characterized in terms of physical, chemical, mechanical, morphological and barrier properties and (iii) nutritionally characterized. The films were successfully prepared with 5% (w/v) of regular corn, waxy corn, white cush-cush yam, arracacha and potato starches or 6% (w/v) of taro and cassava starches, all with 2% (v/v) of glycerol; resulting in easily manageable and flexible films. Cassava and waxy corn starch films showed the best barrier properties to water vapor, and were highly soluble and water tolerant; unlike potato, regular corn and white cush-cush yam starch films. From the point of view of starch digestibility, edible films showed variable contents of available starch (58–70%), total resistant starch (1,1–11,8%) and retrograded starch (0,06–2,86%) and a high rate of enzymatic hydrolysis in their raw state (43–83% at 60 min). *In vitro* but not *in vivo*, films made with waxy corn starch were more digestible than those prepared with regular corn starch; probably extrinsic factors affect their bioavailability. The principal component analysis used to evaluate the combined effect of the botanical source of starch as polymeric matrix and the formulation of edible films on starch digestibility (*in vivo* and *in vitro*) showed, that except for waxy corn and cassava starch films, the thermal gelatinization increased starch digestibility, however, the formulation caused a dilution of nutrients. Meanwhile, the effect of the botanical source of the starch, as a polymeric matrix, on the properties of the edible films was observed in barrier, physical and mechanical properties and *in vitro* digestibility of the films: waxy corn and cassava starch films were thinner, transparent, soluble and more digestible. This study identified physicochemical and nutritional properties of edible films, which could help to expand the applications of these preparations as edible thermoplastic, biodegradable, economic and versatile materials that benefit the health of consumers.

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 dirección del doctor Alexander Laurentin.

DEDICATORIA

A mis abuelos

Leticia y Luis

AGRADECIMIENTOS

*A mi maravillosa familia
Mamá, papá, Denisse y Mikhael*

A mi tutor el Dr. Alexander Laurentin

A mis amigas las doctorísimas Ana, Meris, Carolina e Ingrid

*A las Dras. Mercedes Schnell, María Soledad Tapia,
Elevina Pérez y Alexia Torres*

A la Dra. Lourdes Suárez

A los Licenciados Carlos González-Quilen e Iván León

A mi amigo de todos los tiempos Alejandro Márquez

*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.....	7
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	22
III. Objetivos	25
IV. Materiales y Métodos	27
4.1. Materia prima.....	27
4.2. Extracción y purificación del almidón	27
4.3. Composición proximal de los almidones extraídos	28
4.4. Películas comestibles a base de almidón.....	28
4.4.1. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones.....	29
4.4.2. Preparación de la solución formadora de película	29
4.4.3. Caracterización de las películas comestibles	30
<i>Grosor</i>	30
<i>Actividad de agua</i>	30
<i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	31
<i>Solubilidad en agua</i>	32
<i>Capacidad de retención de agua</i>	33
<i>Color</i>	33
<i>Determinación del pH</i>	34
<i>Prueba de punción</i>	34
<i>Microscopia electrónica de barrido</i>	34
4.5. Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> de los almidones y las películas comestibles..	35
<i>Almidón disponible</i>	35
<i>Almidón resistente total</i>	38

<i>Almidón retrogradado</i>	40
<i>Tasa de hidrólisis enzimática</i>	43
4.6. Determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> de los almidones y las películas comestibles ..	45
<i>Preparación de las dietas de almidones y de películas comestibles</i>	46
<i>Mantenimiento del cultivo de gorgojos y bioensayo</i>	46
<i>Supervivencia y variación de peso en los insectos</i>	47
<i>Actividad similar a α-amilasa</i>	48
<i>Excreción de ácido úrico</i>	49
4.7. Análisis estadístico.....	51
V. Financiamiento	52
VI. Resultados	53
Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles	53
Formulación y caracterización física, química, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles.....	67
Caracterización nutricional de las películas comestibles	78
Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón.....	87
Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles.....	91
VII. Discusión	95
Caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles	95
Formulación y caracterización física, química, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles.....	125
Caracterización nutricional de las películas comestibles	156
Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón.....	170
Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles.....	174
VIII. Conclusiones	179
IX. Recomendaciones	182
X. Bibliografía	183
XI. Anexos	197

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.....	58
Figura 3. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.	61
Figura 4. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.	61
Figura 5. Variación de peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.	63
Figura 6. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones. ...	63
Figura 7. Pérdida de agua del sistema experimental en función del tiempo, en cada una de las películas comestibles.	71
Figura 8. Morfología de las películas comestibles a base de distintas fuentes de almidón.....	77
Figura 9. Tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de las películas comestibles.	81
Figura 10. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	83
Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.	83
Figura 12. <i>Biplot</i> del análisis de componentes principales de las películas comestibles y sus respectivos almidones nativos.	90
Figura 13. <i>Biplot</i> del análisis de componentes principales realizado para las películas comestibles a base de almidón.	94

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón.....	18
Tabla 2. Composición proximal y pureza de los almidones.....	54
Tabla 3. Contenido de almidón disponible y almidón resistente total de los almidones.....	56
Tabla 4. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de los almidones.	59
Tabla 5. Pesos promedio y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con los diferentes almidones.....	64
Tabla 6. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.....	65
Tabla 7. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.....	66
Tabla 8. Criterios cualitativos de selección que presentaron las formulaciones seleccionadas de las películas comestibles a base de almidón y glicerol.....	68
Tabla 9. Propiedades físicas, químicas y de barrera de las películas a base de almidón.....	69
Tabla 10. Determinación del color de las películas comestibles.....	73
Tabla 11. Propiedades mecánicas de las películas comestibles determinadas con la prueba de punción.....	75
Tabla 12. Contenido de almidón disponible, almidón resistente total y almidón retrogradado de las películas comestibles.....	78
Tabla 13. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de α -amilólisis <i>in vitro</i> de las películas comestibles.....	82
Tabla 14. Pesos promedio y variación de peso al día 8 de los insectos alimentados con las diferentes películas comestibles.....	84
Tabla 15. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.....	85
Tabla 16. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.....	86

I. Introducción

Las películas comestibles han recibido una atención considerable en los últimos años, debido a las ventajas que ofrecen con 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; Gutiérrez y col., 2015c), arroz (Bourtoom y Chinnan, 2008; Li y col., 2008), papa (Jansson y Thuvander, 2004; Rojas, 2007; Hernández y col., 2008), 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; Gutiérrez y col., 2015a; 2015b), ñame (Mali y col., 2004a; 2004b), mapuey (Rached y col., 2006; Pérez y col., 2012; Gutiérrez y col., 2015a; 2015b), apio (Tapia y col., 2012; Medina y col., 2012), ocumo chino (Tapia y col., 2012), sagú (Hernández y col., 2008), plátano (Romero-Bastidas y col., 2005; Sothornvit y Pitak, 2007; Ortiz, 2010) 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 físicas,

químicas, 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 fisicoquímicas y tecnológicas de las películas a base de almidón, poco se conoce sobre su digestibilidad *in vitro* e *in vivo* y, aunque usualmente solo 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, enturbiantes, formador de películas, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante (Edel-Leon y col., 2007; Singh y col., 2007).

Los estudios sobre películas comestibles se concentran en la caracterización estructural (patrón de cristalinidad) y en la evaluación de las propiedades físicas (color, grosor, humedad), químicas (pH), mecánicas (dureza, fuerza ténsil y elongación), térmicas (curvas de descomposición), morfológicas y de barrera (solubilidad y capacidad de retención de agua; permeabilidad al vapor de agua, al O₂, CO₂ y N₂), características que ayudan a identificar las posibles aplicaciones de estos biomateriales en áreas como la tecnología de alimentos.

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).

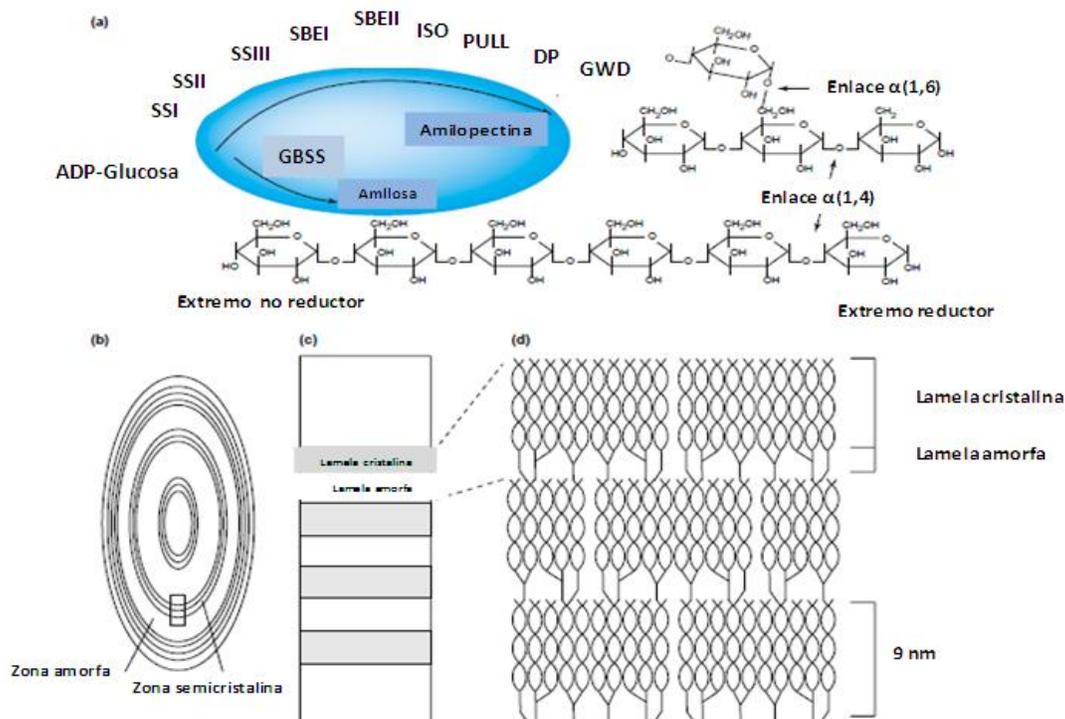


Figura 1. Enzimas de la biosíntesis del almidón y la estructura del gránulo.

(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 μm de longitud. (c) Vista en aumento de un anillo de crecimiento de la región semicristalina, mostrando el rearme 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 semicristalina; 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 generalmente 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 presentan una gran estabilidad por las múltiples interacciones que existen entre 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 a 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 pobre 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. Varios grupos de investigación han realizado estudios

sobre la composición química y las propiedades funcionales 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; Kaushal y col., 2013; Gutiérrez y col., 2014).

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 más 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 sanos” (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) y de un quinto tipo de almidón resistente (AR5), los complejos amilosa lípidos (Hasjim y col., 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación nutricional del almidón.

Tipo de almidón	Ejemplo de alimentos que lo contienen
Rápidamente digerible Lentamente digerible	Alimentos amiláceos recién cocinados. 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.
Tipo 5. Complejos amilosa lípidos (AR5)	Almidones que contienen complejos amilosa lípidos resistentes a la digestión.

Modificado de Englyst y col., 1992; Hasjim y col., 2013 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 la 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).

El AR5 se produce cuando los ácidos grasos de cadena mediana y larga (de 12 a 18 carbonos) son retenidos dentro de la estructura helicoidal de la amilosa (Holm y col., 1983; Laurentin, 1999; Tovar y col., 1999a; Laurentin y col., 2003; Hasjim y col., 2013). Los complejos amilosa lípidos se forman de manera natural durante la biosíntesis del almidón, pero también pueden producirse durante la cocción y tienen una menor digestibilidad que el almidón cocido (Holm y col., 1983). El maíz con alto contenido de amilosa (amilomaíz) es una de las principales fuentes de AR5 (Hasjim y col., 2013).

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: (i) aumenta la proliferación de estas células; (ii) incrementa la producción de energía metabólica e (iii) 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, del almidón resistente total y del almidón retrogradado 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 el efecto de la formulación de películas comestibles a base de almidón aislado de cuatro fuentes botánicas (maíz, papa, plátano y sagú), sobre su digestibilidad *in vitro*, 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 para 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 (Laurentin y col., 2014a).

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 de las características físicas, químicas, mecánicas, morfológicas y de barrera con las características 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 al emplearse como coberturas y empaques de alimentos.

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar física, química y nutricionalmente a las películas comestibles a base de almidón aislado de siete fuentes botánicas [cereal: maíz regular y maíz *waxy* (*Zea mays* L.), tubérculos radicales: mapuey (*Dioscorea trifida* L.), yuca (*Manihot sculenta* Crantz) y apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), y tubérculos caulinare: 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*.
6. Evaluar el efecto combinado de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón,

empleando el análisis de componentes principales como herramienta estadística multivariada.

7. Evaluar el efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades físicas, mecánicas, de barrera y nutricionales de las películas comestibles; empleando el análisis de componentes principales como herramienta estadística multivariada.

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 maíz regular y el maíz *waxy* o ceroso (*Zea mays* L.), b) tubérculos radicales, como el mapuey (*Dioscorea trifida* L., variedad blanca), la yuca (*Manihot sculenta* Crantz) y el apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) y c) tubérculos caulinareos, como el ocumo chino (*Colocasia esculenta* L.) y la papa (*Solanum tuberosum* L.). Los almidones de maíz regular, 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 (centrífuga 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 un 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 (Nº 44-15A), de cenizas (Nº 08-17) y de proteína cruda (Nº 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 utilizaron como matriz polimérica los siguientes almidones: maíz regular, 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 física, química, 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 o 6% p/v) y el agente plastificante (1,5 o 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. Para la gelatinización del almidón, esta suspensión fue calentada lenta y directamente sobre una plancha de calentamiento, con agitación magnética constante hasta observar el cambio total de viscosidad en la solución (usualmente 40 minutos). La temperatura final de la solución en este punto estuvo entre 70–95 °C, dependiendo del tipo de almidón. Posteriormente, se adicionó el agente plastificante en la concentración correspondiente y la mezcla se dispersó 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 ser fácilmente desprendidas de la placa, sin romperse durante el proceso. Finalmente, las películas fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas herméticamente cerradas, para luego proceder a su caracterización física, química, mecánica, morfológica y propiedades de barrera.

Para realizar la caracterización nutricional de las películas comestibles mediante pruebas de digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, las películas fueron sometidas a un segundo proceso de secado, en este caso, a 60 °C durante 16 horas. Posteriormente, aquellas empleadas para las pruebas *in vitro* fueron trituradas en un molinillo eléctrico (Ika®-Labortechnik, Alemania) hasta obtener un material finamente particulado, mientras que las películas destinadas a las pruebas *in vivo* fueron cortadas en tiras con una tijera. Ambos grupos de películas fueron almacenadas en bolsas plásticas herméticamente cerradas en un desecador con sílica gel activa, por un lapso de 37–54 días, luego de los cuales fueron analizadas.

4.4.3. Caracterización de las películas comestibles

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.

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).

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 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (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 (pendiente de la recta de la pérdida de peso versus el 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:

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

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

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 g/m·s·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 y se cortaron círculos de 2,5 cm de diámetro. 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 previamente cortadas en círculos de 2,5 cm de diámetro y prepesadas (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:

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

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):

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

Determinación del pH

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

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 colocadas 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.

Microscopía 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. Adicional a estas pruebas, a las películas comestibles se les determinó el almidón retrogradado. 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).

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 13 mm) 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 300 mg de materia seca con agitación magnética constante 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 (usualmente $6,25 \pm 0,06$; $n = 8$).

El procedimiento descrito a continuación se realizó por igual tanto para los almidones como para las películas comestibles. Un volumen de 0,1 mL 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 0,5 mL 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 del reactivo del estuche comercial glucosa oxidasa enzimática colorimétrica, (catálogo 89250, Industrias Invelab[®], Caracas), incubándose durante 10 minutos en un baño de María 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: $y = 0,0309x$ ($R^2 = 0,999$; $n = 16$).

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

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

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.

Las muestras fueron analizadas por triplicado, utilizando como control de calidad del método almidón de papa comercial (Lyckeby Stärkelsen, Suecia).

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, el material resistente de gránulos nativos no digeribles, el almidón resistente debido a retrogradación y los complejos amilosa lípidos (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 Córex de 30 mL. Seguidamente se ajustó el pH de la suspensión a $1,5 \pm 0,02$ con soluciones de HCl de concentraciones de 2 mol/L y 0,5 mol/L. 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 tipo vaivén 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 conteniendo 4 mmol/L CaCl₂ y se ajustó el pH a $6,9 \pm 0,02$ con soluciones de 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 y lavado con 10 mL de agua destilada con agitación magnética; centrifugando la suspensión bajo las mismas condiciones anteriores. 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 conteniendo 20 mmol/L de CaCl₂ y se ajustó el pH a $4,75 \pm 0,02$ con soluciones de HCl de concentraciones de 2 mol/L, 0,5 mol/L y 0,1 mol/L. A continuación, a cada tubo Córax se adicionó 1 mL de la solución de amiloglucosidasa de *Rhizopus sp.* (A-7255: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) (4,8 mg amiloglucosidasa/mL de buffer acetato 0,1 mol/L pH 4,75) 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 µL en tubos de ensayo y se determinó la glucosa liberada, aplicando el método enzimático colorimétrico descrito (Trinder, 1969).

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

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

donde:

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

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

Almidón retrogradado

El almidón retrogradado fue determinado mediante el método propuesto por Saura-Calixto y colaboradores (1993), con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Polisacáridos Vegetales para adaptarlo a las películas comestibles (Hernández, 2006). El método se fundamenta en cuantificar el almidón resistente asociado a la fracción de fibra alimentaria insoluble, mediante la utilización de una solución de KOH que actuará como un agente caotrópico y una digestión con amiloglucosidasa. Dicho almidón resistente corresponde exclusivamente al almidón retrogradado, ya que el almidón nativo que puede ser inaccesible a

la hidrólisis enzimática será previamente gelatinizado por la aplicación de calor durante la obtención del residuo indigerible y el almidón físicamente inaccesible será eliminado con el proceso de molienda (Tovar, 2001a).

La homogeneización de las películas se llevó a cabo con 100 mg de materia seca en 12,5 mL de buffer fosfato 0,08 mol/L pH 6,0, en tubos de centrifuga Córrex de 30 mL y empleando un homogeneizador Ultra-Turrax como ya fue descrito. Seguidamente se agregó 0,1 mL de la α -amilasa bacteriana termoestable Termamyl[®] 120L (Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) y se incubaron los tubos durante 20 minutos en un baño de María en ebullición, con agitación magnética cada 5 minutos. Las suspensiones obtenidas se dejaron enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Luego se agregó 1 mL de HCl 2 mol/L seguido de un ajuste del pH a $1,5 \pm 0,02$ con soluciones de NaOH de concentraciones de 2 mol/L y 1 mol/L; se adicionó 0,5 mL de una solución de pepsina (P-7000: Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) (100 g/L de agua destilada) y se incubaron los tubos durante 1 hora en un baño de María a 37 °C con agitación magnética constante a una velocidad de 300 r.p.m. Transcurrido el tiempo de la incubación se añadió 0,5 mL de NaOH 5 mol/L y se ajustó el pH a $6,9 \pm 0,05$ con soluciones de HCl de concentraciones de 2 mol/L y 0,5 mol/L; luego se agregó 0,5 mL de una solución de pancreatina porcina (P-7545: Sigma Chemical Co., Louis, EE. UU.) (100 g/L de agua destilada) y se incubaron nuevamente los tubos con la suspensión en un baño de María a 37 °C por 1 hora con agitación magnética constante a una velocidad de 300 r.p.m. Posteriormente, se agregó 0,25 mL de HCl 5 mol/L y se ajustó el pH a $4,5 \pm 0,05$ con soluciones de NaOH de concentraciones de 2 mol/L y 1 mol/L. Esta suspensión se centrifugó durante 15 minutos a $3000 \times g$ (entre 0 y 5 °C) (Sorvall[®] RC-5B) y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue lavado tres veces consecutivamente con 10 mL de agua

destilada y con agitación magnética; centrifugando la suspensión bajo las mismas condiciones anteriores. Luego de la última centrifugación, el sedimento se almacenó a temperatura ambiente.

Al día siguiente, el residuo fibroso insoluble obtenido en el último lavado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se incubó en un baño de María en ebullición durante 20 minutos con agitación magnética cada 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, las suspensiones se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se adicionó 1 mL de KOH 4 mol/L recién preparado; manteniendo la suspensión en agitación vigorosa al momento de añadir la base. La agitación magnética constante se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregó a las suspensiones 2 mL de HCl 2 mol/L y 0,5 mL de buffer acetato de sodio 0,4 mol/L pH 4,75 conteniendo 20 mmol/L de CaCl₂. El pH se ajustó a $4,75 \pm 0,05$ con soluciones de HCl de concentraciones de 5 ml/L, 2 mol/L y 0,5 mol/L y se adicionó 0,5 mL de amilogucosidasa de *Rhizopus sp.* (A-7255: Sigma Chemical Co., Louis, EE. UU.) (4 mg amilogucosidasa/mL de buffer acetato de sodio 0,4 mol/L pH 4,75 con 20 mmol/L de CaCl₂). Los tubos se incubaron en un baño de María a 40 °C por 1 hora con agitación constante tipo vaivén. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a $3000 \times g$ (entre 0 y 5 °C) (Sorvall® RC-5B) y se recolectó el sobrenadante en balones aforados de 10 mL; el sedimento se resuspendió en 1 mL de agua destilada con agitación magnética (lavado) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, el sobrenadante obtenido se colocó en los mismos balones aforados y se completó el volumen a 10 mL con agua destilada. De cada balón se tomó una alícuota de 50 µL y se determinó la concentración de glucosa, aplicando el método de Trinder (1969) descrito.

El porcentaje de almidón retrogradado se determinó aplicando la siguiente fórmula:

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

donde:

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

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

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 conteniendo 7 mmol/L de NaCl, 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 constante, 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 las otras réplicas 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 María en 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: $y = 0,393x$ ($R^2 = 0,999$; $n = 7$).

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

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

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 del método 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 de agua destilada inicialmente, mezclando la suspensión con una espátula. Luego, se continuó añadiendo una cantidad de agua variable hasta 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 aproximadamente 200 individuos en frascos de vidrio, con un tercio de su volumen ocupado por arvejas (aproximadamente 160 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 una referencia, el almidón de maíz [semillas artificiales de almidón de maíz comercial (Maizina Americana[®], Alfonso Rivas & Cia., C.A., Caracas)] y la película a base de almidón de maíz, propuesta por Lovera (2014). 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.

Supervivencia y variación de peso en los insectos

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).

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 0,5 mL con buffer acetato 50 mmol/L pH 5. Posteriormente, se añadió 0,5 mL 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 ecuación de la recta de la curva de calibración promedio para la determinación de maltosa fue: $y = 0,417x - 0,004$ ($R^2 = 1,000$; $n = 9$).

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 acuoso de los 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.

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, apio, ocumo chino y papa) y el 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 y agitando la solución por 10 segundos. Luego de la extracción, la suspensión obtenida se transfirió inmediatamente 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 del ácido úrico 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 catálogo 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: $y = 0,154x - 0,002$ ($R^2 = 0,999$; $n = 8$).

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, 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 de una vía, la prueba *a posteriori* de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher 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. Para los análisis de componentes principales se utilizó el programa estadístico PAST (Palaeontological Statistic v3.05; Hammer y col., 2001)

utilizando una matriz de correlación, debido a que los datos no fueron dimensionalmente homogéneos. Este tipo de matriz implica una estandarización de todas las variables al dividir las entre su desviación estándar (Hammer y col., 2015).

V. Financiamiento

Este trabajo estuvo enmarcado dentro del proyecto individual No. PG-03-8074-2011 (Etapa 1 y 2) (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 cinco partes organizadas de la siguiente manera: (i) caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles, (ii) formulación y caracterización física, química, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles, (iii) caracterización nutricional de las películas comestibles, (iv) efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón y (v) efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades 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 (regular y ceroso) y de yuca, con contenidos de humedad intermedios y finalmente el almidón de papa y el de apio con un contenido 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	0,61 ± 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 ± 0,01 ^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 ± 0,5 ^a	0,43 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,07 ^{b,c}	0,55 ± 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}	99,1 ± 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 regular, 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 regular, 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 regular, 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 91%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los almidones de distinto origen botánico.

El mayor contenido de almidón disponible se encontró para el almidón de maíz regular 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 regular y el almidón de papa, almidones que presentaron el mayor y el menor contenido de almidón disponible, respectivamente.

Tabla 3. Contenido de almidón disponible y 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 ± 1,3 ^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 presentaron 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 (regular 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 regular 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 regular, papa y ocumo chino. Los almidones de apio, yuca y maíz *waxy* presentaron las mayores magnitudes finales de hidrólisis, seguida del almidón de maíz regular 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 regular.

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.

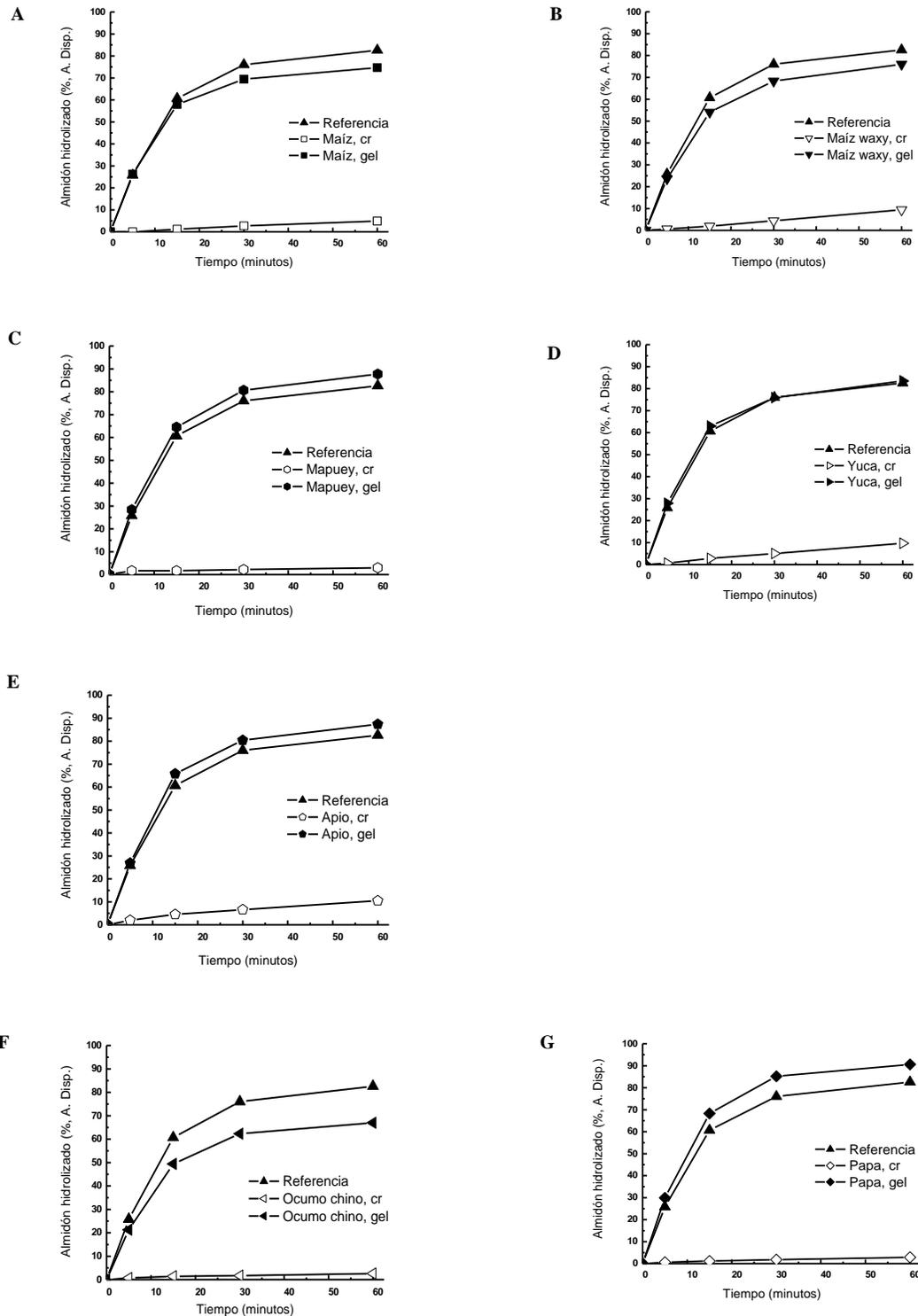


Figura 2. Tasa de α -amilólisis *in vitro* de los almidones estudiados.

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 regular) 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	74,7
Maíz waxy	1,86	9,42	54,1	76,0
Mapuey	1,67	3,01	64,5	87,7
Yuca	2,75	9,73	63,0	83,5
Apio	4,53	10,5	65,8	87,5
Ocumo chino	1,38	2,62	49,4	67,0
Papa	1,18	2,91	68,3	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 $82 \pm 5\%$ al día 8. Este resultado fue menor ($p < 0,05$) al obtenido para la condición alimentada y la referencia, que se mantuvo en $100 \pm 0\%$ al final del bioensayo.

En general, la supervivencia de los insectos alimentados con los diferentes almidones se mantuvo cercana al 100%, estadísticamente igual a la mantenida con la referencia ($p > 0,05$), con la excepción de las dietas de almidón de mapuey y de papa, en las cuales la supervivencia de los insectos fue menor a la referencia ($p < 0,05$). Con la dieta de almidón de mapuey la supervivencia al día 8 fue de $93 \pm 3\%$ y con el almidón de papa fue de $76 \pm 5\%$, ésta última resultó similar ($p > 0,05$) a la del ayuno (Figura 4).

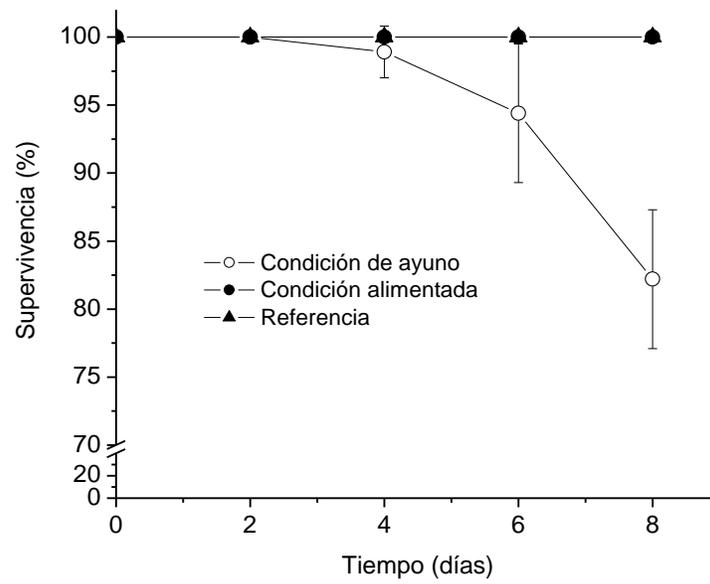


Figura 3. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.

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

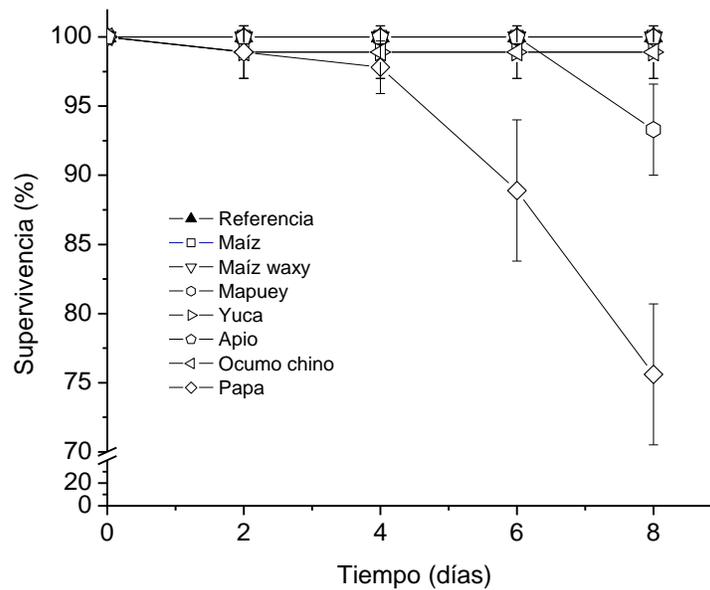


Figura 4. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

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 durante los 8 días del bioensayo, hasta un $21 \pm 3\%$ del peso inicial de los insectos. En contraste, al final del bioensayo en la condición alimentada y en la referencia el peso de los insectos aumentó un $6 \pm 1\%$ con respecto al inicial.

En varios de los almidones estudiados (maíz regular, maíz *waxy* y yuca) se promovió una ganancia de peso en los insectos similar a la referencia ($p > 0,05$). Con los almidones de apio y ocumo chino la ganancia de peso fue menor ($p < 0,05$) que la referencia, mientras que con las dietas de almidón de mapuey y de papa se obtuvo una pérdida importante de peso en los insectos (Figura 6 y Tabla 5), siendo mayor ($p < 0,05$) la obtenida en los alimentados con las semillas artificiales de almidón de papa. En la Figura 6 se puede observar como esta pérdida significativa de peso en los insectos ocurrió gradualmente desde el inicio del bioensayo, pero no así en los insectos mantenidos con las semillas de almidón de mapuey, donde después del segundo día, el peso se mantuvo constante hasta el día 8. La pérdida de peso de los insectos alimentados con el almidón de papa fue estadísticamente menor ($p < 0,05$) y de forma menos pronunciada que la obtenida en los insectos mantenidos en ayuno (Figura 5).

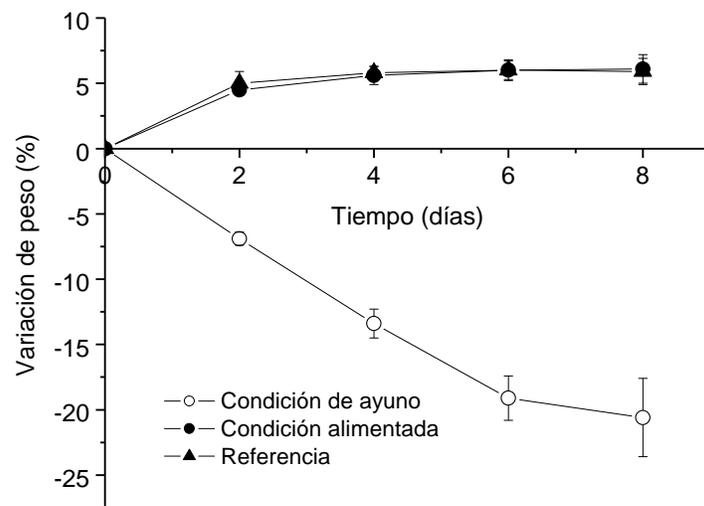


Figura 5. Variación de peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y la referencia.

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

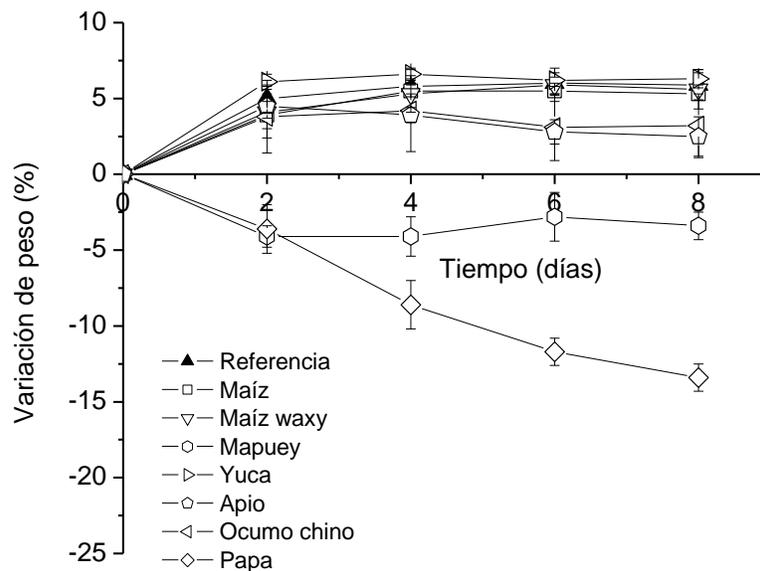


Figura 6. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los diferentes almidones.

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

Tabla 5. Pesos promedio 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 ^a	1,82 ± 0,02 ^{b,c}	5,9 ± 1,0 ^b
Almidón de maíz	1,73 ± 0,00 ₄ ^a	1,82 ± 0,01 ^{b,c}	5,3 ± 0,4 ^{b,c}
Almidón de maíz <i>waxy</i>	1,76 ± 0,03 ^a	1,86 ± 0,06 ^{a,b}	5,6 ± 1,3 ^{b,c}
Almidón de mapuey	1,77 ± 0,01 ^a	1,71 ± 0,02 ^d	-3,4 ± 0,9 ^{c,d}
Almidón de yuca	1,77 ± 0,00 ^a	1,88 ± 0,01 ^a	6,3 ± 0,4 ^b
Almidón de apio	1,73 ± 0,04 ^a	1,77 ± 0,06 ^c	2,5 ± 1,3 ^d
Almidón de ocumo chino	1,75 ± 0,04 ^a	1,80 ± 0,02 ^c	3,2 ± 2,1 ^{c,d}
Almidón de papa	1,74 ± 0,00 ₃ ^a	1,51 ± 0,02 ^e	-13,5 ± 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 1,75 ± 0,00₇ 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 ($p < 0,05$) que la referencia, mientras que el resto de los almidones promovieron actividades α -amilolíticas iguales ($p > 0,05$) al almidón de referencia. Se encontraron diferencias significativas entre la actividad similar a α -amilasa de los insectos alimentados con los almidones de maíz (regular y ceroso), siendo más baja la actividad en los insectos mantenidos con una dieta de almidón de maíz *waxy* ($p < 0,05$).

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	$156 \pm 35^{\text{c}}$	1,12
Almidón de maíz <i>waxy</i>	$87 \pm 4^{\text{d}}$	0,62
Almidón de mapuey	$421 \pm 15^{\text{b}}$	3,03
Almidón de yuca	$112 \pm 7^{\text{c,d}}$	0,80
Almidón de apio	$141 \pm 27^{\text{c}}$	1,01
Almidón de ocumo chino	$144 \pm 5^{\text{c}}$	1,03
Almidón de papa	$728 \pm 71^{\text{a}}$	5,24

La actividad similar a α -amilasa está expresada en micromoles de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). 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 460 ± 49 y $773 \pm 57 \mu\text{mol/s}\cdot\text{L}$, 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 (regular y ceroso), la cual resultó similar a la promovida con el almidón de referencia ($p > 0,05$).

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>	472 ± 74 ^{d,e}	1,31
Almidón de mapuey	1504 ± 199 ^b	4,18
Almidón de yuca	263 ± 21 ^e	0,73
Almidón de apio	985 ± 114 ^c	2,74
Almidón de ocumo chino	292 ± 56 ^{d,e}	0,81
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 física, química, 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 de yuca se requirió ensayar una tercera concentración de almidón (6%) con 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 regular y de 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 físico, químico, 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 regular. No se encontraron diferencias significativas entre las películas de almidón de maíz estudiadas (Tabla 9).

Tabla 9. Propiedades físicas, químicas 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 ₃ ^d	0,34 ± 0,04 ^{d,e}	1,31 ± 0,02 ^e
Maíz waxy	5,23 ± 0,19 ^a	0,13 ± 0,02 ^{b,c}	5,9 ± 0,2 ^d	0,51 ± 0,00 ₂ ^{a,b}	0,79 ± 0,04 ^b	7,13 ± 0,45 ^c
Mapuey	5,46 ± 0,11 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	9,7 ± 0,1 ^a	0,51 ± 0,00 ₄ ^a	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 ₂ ^a	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 ₃ ^a	8,5 ± 0,1 ^{b,c}	0,50 ± 0,00 ₄ ^c	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 de 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 regular 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 regular ($p < 0,05$).

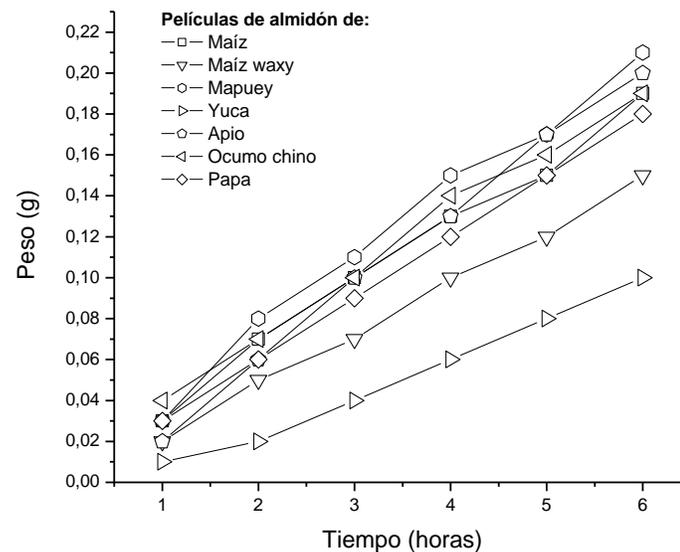


Figura 7. Pérdida de agua del sistema experimental en función del tiempo, en cada una de las películas comestibles.

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 regular, mapuey y papa), películas de intermedia solubilidad en agua (apio) y 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 regular 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 vió 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 transparentes ($p < 0,05$) que el resto de las películas estudiadas, mientras que las películas de almidón de papa, de apio, de maíz regular y de ocumo chino más opacas. 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 0,11 ^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 0,07 ^{b,c}	-0,97 \pm 0,39 ^c	79,32 \pm 0,40 ^b	14,26 \pm 0,40 ^d
Mapuey	17,32 \pm 0,55 ^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 0,05 ^a	1,77 \pm 0,17 ^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 regular presentó mayor dureza y fracturabilidad que la película de almidón de maíz ceroso ($p < 0,05$), mientras que esta 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. Estas películas analizadas por MEB presentaban cuatro (película de almidón de apio), seis (película de almidón de papa), siete (películas de almidón de maíz regular, de mapuey y de ocumo chino) y nueve meses (películas de almidón de maíz *waxy* y de yuca) de almacenamiento. 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 las Figuras 8A, C, E, y F 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 fueron tan notables.

La morfología de la superficie y del interior de la matriz varió entre las películas analizadas. La mayoría de las películas presentaron superficies lisas (Figura 8A, D, E y G) y algunas con rugosidades como las películas de almidón de mapuey y de ocumo chino (Figura 8C y F). Además de las líneas de fracturas en las superficies de las películas (Figura 8B, C, E y F), se observaron grietas de diferentes tamaños, vistas como líneas que se proyectan desde el borde de la superficie hacia el interior de la matriz (Figura 8A, B, C, E y F). En la película de almidón de maíz *waxy* se evidenciaron numerosas líneas de fractura en la superficie y grietas en el interior de la matriz polimérica (Figura 8B), a diferencia de la película de almidón de maíz regular que presentó una superficie lisa y sin fracturas (Figura 8A), pero con grietas poco profundas debajo de la superficie.

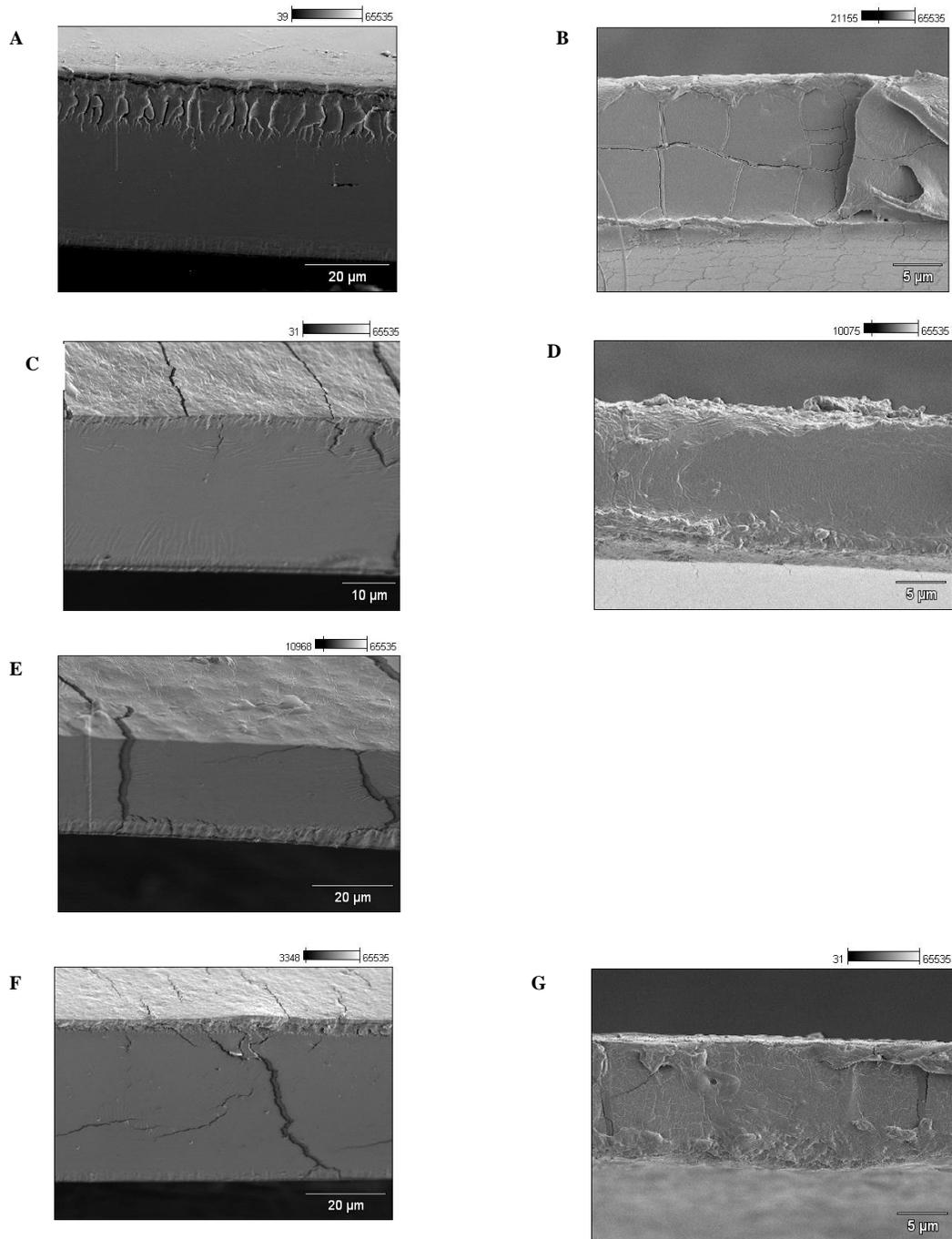


Figura 8. Morfología de las películas comestibles a base de distintas fuentes de almidón.

Micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de barrido, vistas de perfil. Los paneles muestran la película de almidón de: A) maíz regular, 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, el almidón resistente total y el almidón retrogradado obtenido en cada una de las películas comestibles analizadas.

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

Película de almidón de:	Almidón disponible (%)	Almidón resistente total (%)	Almidón retrogradado (%)
Maíz	58,1 ± 2,4 ^d	4,3 ± 0,2 ^c	2,86 ± 0,16 ^a
Maíz waxy	66,2 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,1 ^f	0,06 ± 0,01 ^f
Mapuey	62,1 ± 0,4 ^c	10,4 ± 0,3 ^b	1,24 ± 0,04 ^e
Yuca	69,6 ± 0,6 ^a	2,3 ± 0,1 ^e	1,40 ± 0,06 ^d
Apio	60,6 ± 1,8 ^{c,d}	3,5 ± 0,2 ^d	1,90 ± 0,08 ^b
Ocumo chino	63,3 ± 1,7 ^c	3,3 ± 0,1 ^d	1,69 ± 0,04 ^c
Papa	58,7 ± 1,8 ^d	11,8 ± 0,1 ^a	1,49 ± 0,03 ^d

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 y el almidón retrogradado fue Corn Flakes® (4,0 ± 0,2%; $n = 10$ y 2,06 ± 0,17%; $n = 11$, respectivamente).

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 regular y de yuca, respectivamente ($p < 0,05$).

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 regular, de apio y de 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%).

Las películas comestibles almacenadas entre 37–54 días, presentaron contenidos de almidón retrogradado variables y diferentes entre sí ($p < 0,05$), siendo la película a base de almidón de maíz regular aquella con la mayor fracción resistente por retrogradación, seguida por la película de almidón de apio. Por su parte, la película de almidón de maíz *waxy* presentó un contenido de almidón retrogradado muy bajo, que junto con el mayor contenido de almidón disponible y el menor tenor de almidón resistente total encontrado ($p < 0,05$), hacen que esta película comestible sea de mayor digestibilidad que su contraparte formulada con almidón de maíz regular.

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, de maíz *waxy* y de yuca presentaron la mayor magnitud final, seguida de las películas de almidón de maíz regular y de papa, con valores intermedios, y por las películas de mapuey y de 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 regular.

En tres de las siete películas comestibles estudiadas, 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 45–86%. 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 65% luego de la gelatinización), de almidón de mapuey (de 24% a 62%) y de almidón de maíz regular (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 regular y de maíz *waxy* gelatinizadas, no se encontraron diferencias significativas (Figura 9A y B).

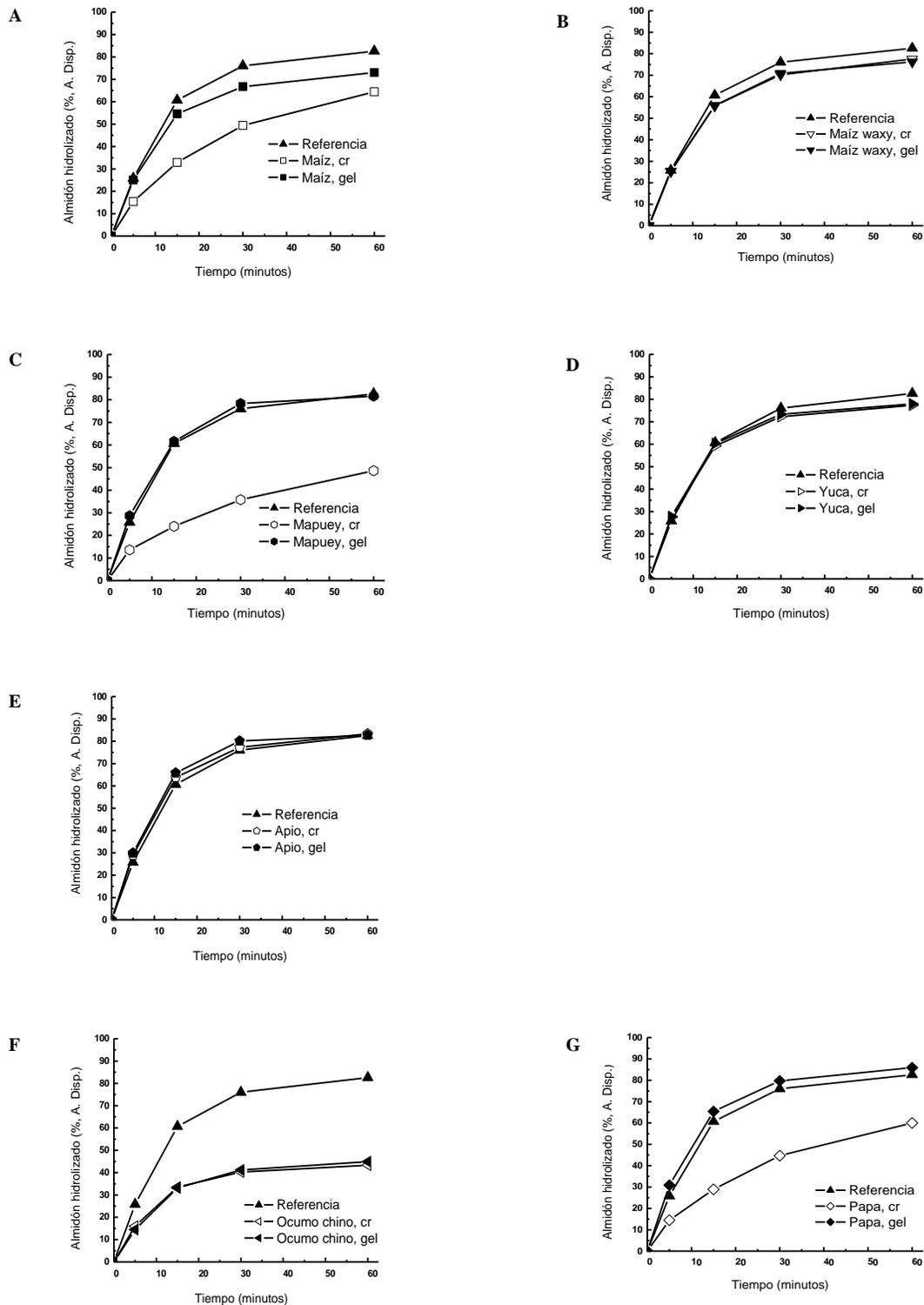


Figura 9. Tasa de α -amilólisis *in vitro* de las películas comestibles.

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.

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 waxy	55,8	77,5	55,9	76,2
Mapuey	24,0	48,7	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 ($n = 7$).

Los resultados de la digestibilidad *in vivo* de las películas comestibles se presentan a continuación. La supervivencia de los gorgojos alimentados con las películas comestibles (Figura 10), fue estadísticamente igual a la película formulada a base de almidón de maíz regular. Sin embargo, con todas las dietas de películas comestibles se promovió una ganancia de peso estadísticamente menor a la película de referencia (Figura 11 y Tabla 14). Con las películas de almidón de mapuey y yuca se promovió una ganancia de peso intermedia, mientras que, con las películas de almidón de ocumo chino, apio, papa y maíz waxy, la ganancia de peso en los insectos fue la más baja.

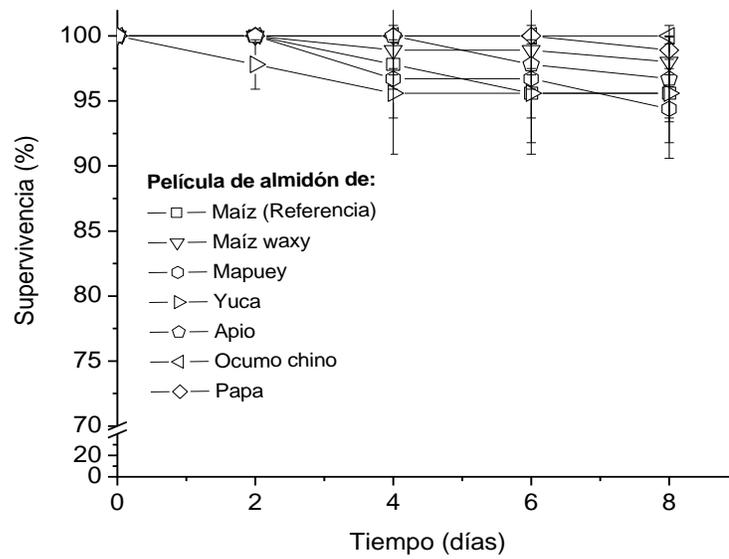


Figura 10. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Las barras indican la desviación estándar de la media.

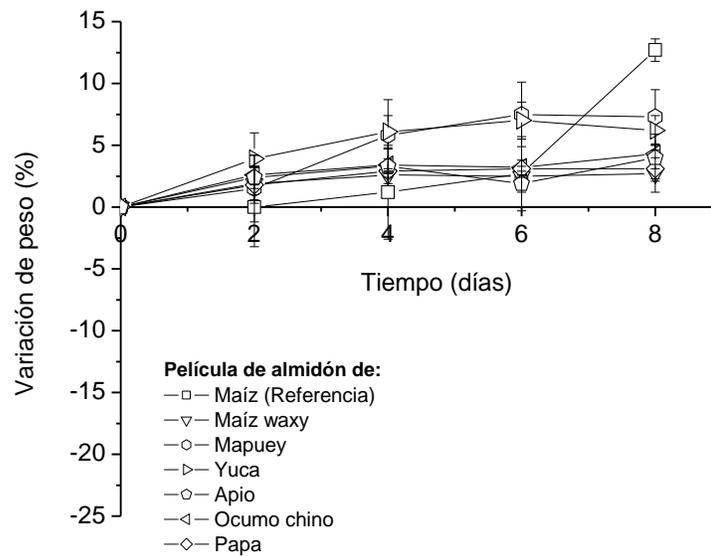


Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las diferentes películas comestibles.

Las barras indican la desviación estándar de la media.

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

Dieta – Película de almidón de:	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Variación de peso al día 8 (%)
Maíz (Referencia)	1,68 ± 0,00 ₄ ^c	1,84 ± 0,09 ^a	12,7 ± 0,9 ^a
Maíz waxy	1,67 ± 0,01 ^c	1,71 ± 0,01 ^b	2,7 ± 0,4 ^d
Mapuey	1,73 ± 0,01 ^b	1,86 ± 0,03 ^a	7,3 ± 2,2 ^b
Yuca	1,77 ± 0,01 ^a	1,88 ± 0,01 ^a	6,2 ± 1,2 ^{b,c}
Apio	1,64 ± 0,00 ₂ ^{d,e}	1,71 ± 0,03 ^b	4,0 ± 1,9 ^{c,d}
Ocumo chino	1,66 ± 0,00 ₂ ^d	1,73 ± 0,01 ^b	4,3 ± 0,3 ^{c,d}
Papa	1,64 ± 0,00 ₂ ^e	1,69 ± 0,03 ^b	3,1 ± 1,9 ^{c,d}

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). Para la condición de ayuno los pesos promedios fueron $1,56 \pm 0,00_2$ 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 $1,71 \pm 0,00_2$ mg (día 0) y $1,82 \pm 0,02$ mg (día 8), la variación de peso fue $6,1 \pm 1,1\%$ ($n = 3$). La media de los pesos promedios al día 0 en las dietas de películas de almidón fue de $1,68 \pm 0,02$ mg ($n = 7$).

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. Las películas a base de almidón de yuca y de papa promovieron actividades α -amilolíticas estadísticamente iguales a la película de referencia. Por su parte, las películas de almidón de apio y de ocumo chino promovieron actividades menores a la referencia ($p < 0,05$), mientras que, con las películas de almidón de maíz waxy y de mapuey se obtuvieron las mayores actividades α -amilolíticas en los insectos ($p < 0,05$).

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

Dieta – Película de almidón de:	Actividad similar a α-amilasa ($\mu\text{mol/s.L}$)	Cociente de actividad similar a α-amilasa
Maíz (Referencia)	124 \pm 10 ^c	1,00
Maíz waxy	228 \pm 12 ^a	1,84
Mapuey	170 \pm 32 ^b	1,37
Yuca	132 \pm 19 ^c	1,06
Apio	79 \pm 2 ^d	0,64
Ocumo chino	83 \pm 30 ^d	0,67
Papa	110 \pm 22 ^{c,d}	0,89

La actividad similar a α -amilasa está expresada en micromoles de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 3$). 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 a la película de referencia. Las actividades enzimáticas en la condición de ayuno y en la condición alimentada fueron de 460 ± 49 y $773 \pm 57 \mu\text{mol/s.L}$, respectivamente ($n = 3$).

La Tabla 16 muestra el efecto de las diferentes dietas de películas comestibles sobre la excreción de ácido úrico en los insectos. Las películas a base de almidón de yuca, de maíz ceroso y de apio promovieron en el insecto la mayor excreción de este metabolito ($p < 0,05$), en comparación con la película de referencia, mientras que con las películas de almidón de ocumo chino, de papa y de mapuey, se promovió una excreción de ácido úrico igual a la película de referencia ($p > 0,05$).

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

Dieta – Película de almidón de:	Excreción de ácido úrico (mg/kg peso al día 8)	Cociente de excreción de ácido úrico
Maíz (Referencia)	1077 ± 89 ^c	1,00
Maíz waxy	2036 ± 297 ^a	1,89
Mapuey	1029 ± 155 ^c	0,96
Yuca	2229 ± 366 ^a	2,07
Apio	1603 ± 94 ^b	1,49
Ocumo chino	1296 ± 260 ^{b,c}	1,20
Papa	1060 ± 148 ^c	0,98

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 ($n = 3$). 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 a la película 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 ($n = 3$).

Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón

Para evaluar la digestibilidad del almidón *in vitro* e *in vivo* en las siete películas comestibles y en su forma nativa, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA de sus siglas en inglés: *Principal component analysis*). Los análisis estadísticos multivariados son técnicas exploratorias que sintetizan la información sobre varias variables medidas a un conjunto de datos, reduciendo la dimensión del problema. Esto permite observar diferencias, semejanzas y/o relaciones que puedan existir entre cada una de las variables estudiadas (Lugo-González y col., 2013). En el PCA las variables originales son transformadas a un pequeño número de nuevas variables (llamadas componentes principales) que captan la mayor parte de la variabilidad presente en las muestras (Härdle y Simar, 2012; Legendre y Legendre, 2012) y que, además, son independientes entre sí (Terradéz, 2002).

Para la aplicación del PCA, la unidad estadística en las variables *in vitro* quedó definida por las películas y los respectivos almidones, y para las variables *in vivo*, la unidad estadística fueron los insectos alimentados con las películas o con los almidones. Las nueve variables seleccionadas para el análisis fueron las siguientes: almidón disponible, almidón resistente total, almidón retrogradado, magnitud final de hidrólisis en estado crudo y gelatinizado, supervivencia al día 8, variación de peso al día 8, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico en los insectos. Se excluyeron del análisis las dos variables de velocidad inicial de hidrólisis (estado crudo y gelatinizado) (Tablas 4 y 13) debido a que los biomarcadores se estimaron luego de 8 días de alimentación del insecto. Dado que los pesos promedio de los insectos al inicio del bioensayo fueron

distintos (Tabla 14), se decidió incluir solamente la variación de peso al día 8 y no los pesos promedio al inicio y al final del bioensayo.

Los componentes principales (CP) se ordenan en función del porcentaje de varianza acumulada, siendo los más importantes aquellos que explican el mayor porcentaje de varianza en los datos (González-Martín y col., 1994). Las nueve variables se lograron reducir a cuatro componentes principales explicando el 89,7% de la variabilidad del estudio¹. El CP1 quedó definido por cinco de las nueve variables analizadas (varianza: 44,9%). Esta nueva variable correlacionó en forma positiva con la actividad similar a α -amilasa ($r = 0,964$), el contenido de almidón resistente total ($r = 0,883$) y la excreción de ácido úrico ($r = 0,554$), y en forma negativa, con la variación de peso y la supervivencia de los insectos al día 8 ($r = -0,921$ y $r = -0,837$, respectivamente). El CP2 (varianza: 23,3%) correlacionó en forma positiva con la magnitud final de hidrólisis en estado crudo ($r = 0,836$) y la excreción de ácido úrico en el insecto ($r = 0,763$), y en forma negativa, con el contenido de almidón disponible ($r = -0,845$). El CP3 (varianza: 12,8%) correlacionó positivamente con el contenido de almidón retrogradado ($r = 0,964$). Por último, el CP4 (varianza: 9,3%) correlacionó positivamente con la magnitud final de hidrólisis en estado gelatinizado ($r = 0,883$)².

El resultado gráfico del análisis de PCA es el *biplot* (Gabriel, 1971), el cual permite representar en un mismo espacio las réplicas (que se encuentran simbolizadas como puntos o equis) y las variables (que son representadas como autovectores) (Laurentin y col.,

¹ En la Tabla 1A (Anexo A) se muestran los autovalores, la varianza total y la varianza acumulada para los nueve CP.

² En la Tabla 2A (Anexo A) se muestran los coeficientes de correlación entre todas las variables y los nueve CP.

2014b). En la Figura 12 se muestra el *biplot* del CP2 versus el CP1³. La representación espacial de los dos primeros componentes principales permitió obtener un agrupamiento o *cluster* de las películas y de los almidones. Todas las películas comestibles se agruparon en el cuadrante dos (valores negativos del CP1 y positivos del CP2), mientras que los almidones nativos se distribuyeron en el resto de los cuadrantes. En conjunto, siete de las nueve variables analizadas correlacionaron con estos dos componentes.

³ En las Figuras 1A y 2A (Anexo A) se muestran los *biplots* del CP3 versus el CP1 y del CP4 versus el CP1, respectivamente.

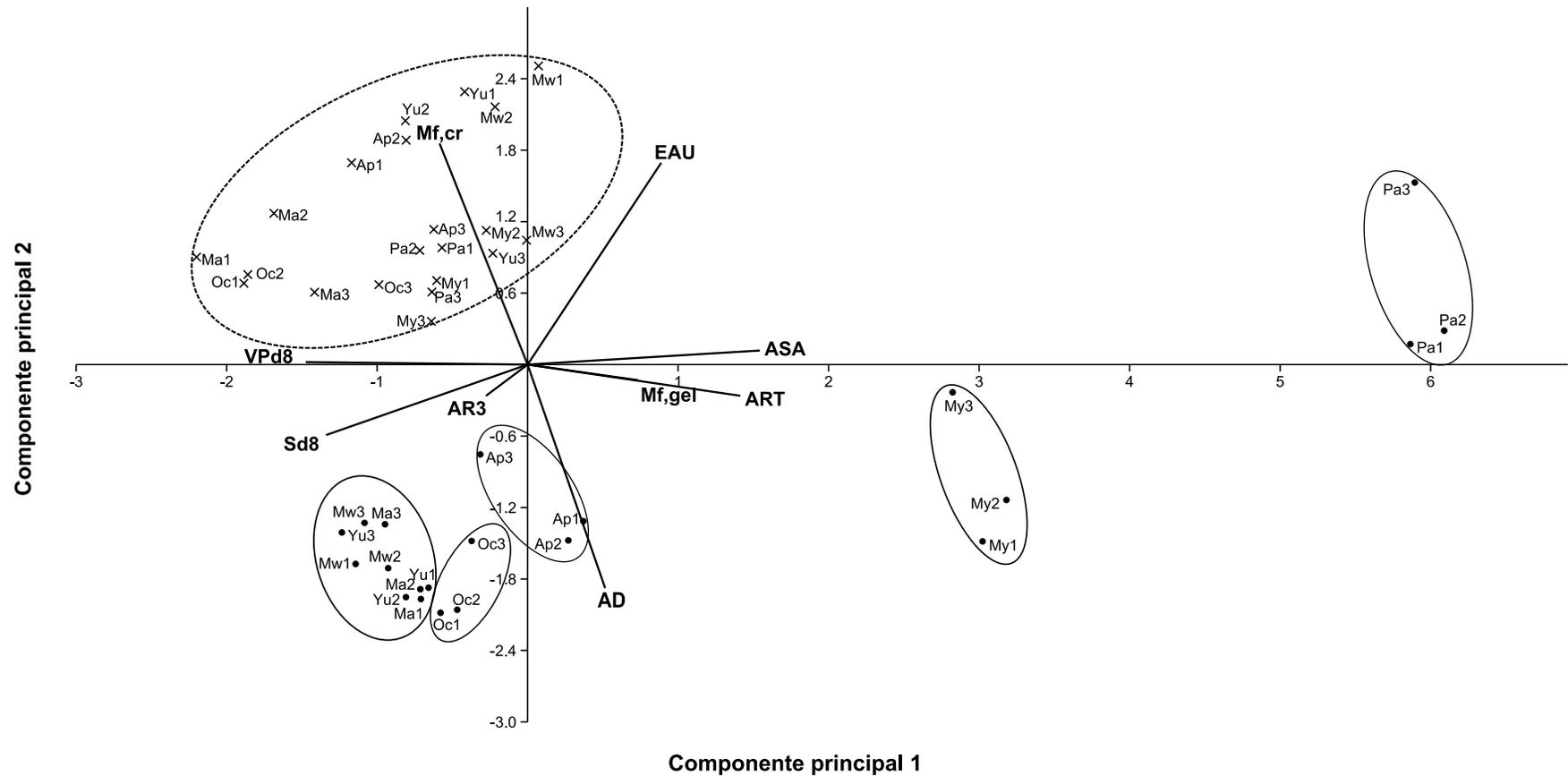


Figura 12. Biplot del análisis de componentes principales de las películas comestibles y sus respectivos almidones nativos.

Las siete películas comestibles y sus respectivos almidones nativos (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los primeros dos componentes principales, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. Fuente botánica: **Ma**: maíz regular; **Mw**: maíz *waxy*; **My**: mapuey; **Yu**: yuca; **Ap**: apio; **Oc**: ocumcho y **Pa**: papa. Almidones (•; óvalos de línea continua) y películas comestibles (x; óvalo de línea segmentada). Variables: almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf_{cr}** y **Mf_{gel}**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles

El efecto de la fuente botánica del almidón utilizado como matriz polimérica en las siete películas comestibles, plastificadas con 2% de glicerol, fue evaluado sobre las propiedades físicas, mecánicas, de barrera y nutricionales (digestibilidad *in vitro* e *in vivo*) a través del PCA.

Para la aplicación de este análisis, la unidad estadística para todas las variables quedó definida por las películas; excepto para las variables de digestibilidad *in vivo*, cuya unidad estadística fueron los insectos alimentados con las películas. Las 19 variables seleccionadas para el análisis fueron: grosor, permeabilidad al vapor de agua, actividad de agua, solubilidad en agua, capacidad de retención de agua, cambio total del color, índice de blanco, dureza, fracturabilidad, adhesividad, almidón disponible, almidón resistente total, almidón retrogradado, magnitud final de hidrólisis en estado crudo y gelatinizado, supervivencia al día 8, variación de peso al día 8, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico en los insectos. Las variables pH de la solución formadora de película y elasticidad fueron eliminadas del análisis porque no mostraron cambios por efecto de la fuente botánica del almidón (Tablas 9 y 11). Los parámetros L, a y b en la determinación del color (Tabla 10), también fueron excluidos porque estos valores se utilizan para el cálculo del cambio total del color y el índice de blanco. Finalmente, se excluyeron las dos variables de velocidad inicial de hidrólisis (estado crudo y gelatinizado) y los pesos promedio de los insectos (inicial y final), por las razones explicadas en la parte anterior.

Las 19 variables se lograron reducir a cinco componentes principales (CP) explicando el 88,9% de la variabilidad del estudio⁴. El CP1 quedó definido por 11 de las 19 variables analizadas (varianza: 41,7%). Esta nueva variable correlacionó en forma positiva con la solubilidad en agua ($r = 0,976$), la excreción de ácido úrico en el insecto ($r = 0,948$), la capacidad de retención de agua ($r = 0,904$), el contenido de almidón disponible ($r = 0,862$), el cambio total del color ($r = 0,857$) y la magnitud final de hidrólisis en estado crudo ($r = 0,588$), y en forma negativa, con la permeabilidad al vapor de agua ($r = -0,918$), el índice de blanco ($r = -0,857$), el grosor ($r = -0,807$), el contenido de almidón resistente total ($r = -0,691$) y de almidón retrogradado en las películas ($r = -0,523$).

El CP2 (varianza: 18,2%) correlacionó en forma positiva con la dureza ($r = 0,770$), la actividad de agua ($r = 0,761$) y la fracturabilidad ($r = 0,594$), y en forma negativa, con la adhesividad de las películas ($r = -0,886$) y la magnitud final de hidrólisis en estado crudo ($r = -0,552$). El CP3 (varianza: 13,9%) correlacionó positivamente con la variación de peso al día 8 de los insectos ($r = 0,759$), el contenido de almidón retrogradado ($r = 0,673$), la fracturabilidad ($r = 0,656$) y la dureza ($r = 0,391$), y negativamente, con la supervivencia de los insectos al día 8 del bioensayo ($r = -0,594$). El CP4 (varianza: 8,8%) correlacionó positivamente con la magnitud final de hidrólisis en estado gelatinizado ($r = 0,873$). Por último, el CP5 (varianza: 6,3%) correlacionó en forma negativa con la actividad similar a α -amilasa ($r = -0,618$)⁵.

⁴ En la Tabla 1B (Anexo B) se muestran los autovalores, la varianza total y la varianza acumulada para los 19 CP.

⁵ En la Tabla 2B (Anexo B) se muestran los coeficientes de correlación entre todas las variables y los 19 CP.

En la Figura 13 se muestra el *biplot* del CP2 versus el CP1⁶. Esta representación espacial permitió agrupar a las siete películas comestibles estudiadas y en conjunto, 15 de las 19 variables analizadas correlacionaron con estos dos componentes.

⁶ En las Figuras 1B – 3B (Anexo B) se muestran los *biplots* del CP3 versus el CP1, del CP4 versus el CP1 y del CP5 versus el CP1, respectivamente.

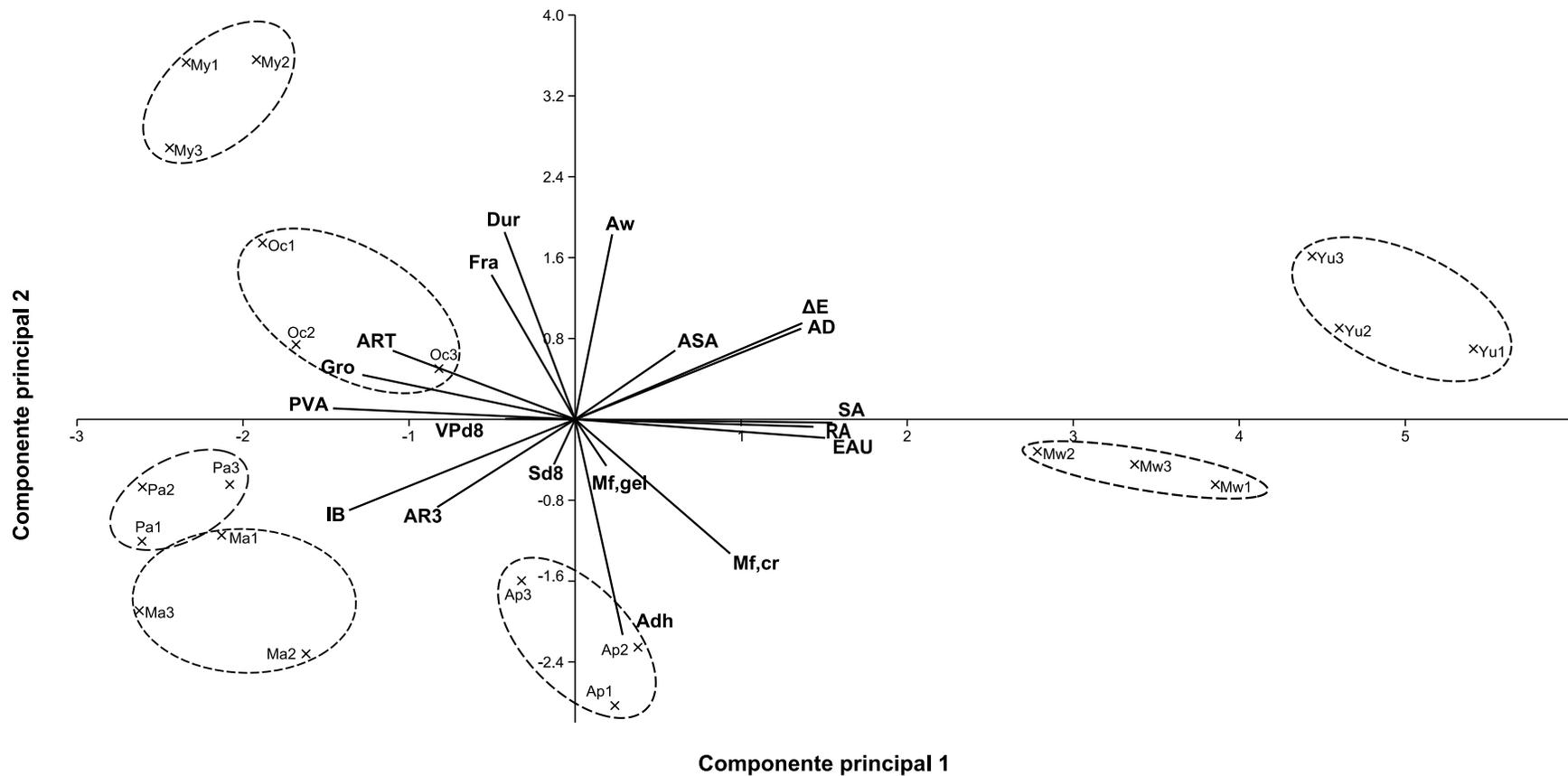


Figura 13. Biplot del análisis de componentes principales realizado para las películas comestibles a base de almidón.

Las siete películas comestibles a base de almidón (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los primeros dos componentes principales, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. Película: **Ma:** maíz regular; **Mw:** maíz *waxy*; **My:** mapuey; **Yu:** yuca; **Ap:** apio; **Oc:** ocumo chino y **Pa:** papa. Variables: grosor (**Gro**), permeabilidad al vapor de agua (**PVA**); actividad de agua (**Aw**); solubilidad en agua (**SA**); capacidad de retención de agua (**RA**); cambio total del color (**ΔE**); índice de blanco (**IB**); dureza (**Dur**); fracturabilidad (**Fra**); adhesividad (**Adh**); almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf, cr** y **Mf, gel**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

VII. Discusión

Como se mencionó en la sección anterior, la discusión de los resultados se presenta dividida en cinco partes: (i) caracterización nutricional de los almidones utilizados para la formulación de las películas comestibles, (ii) formulación y caracterización física, química, mecánica, morfológica y propiedades de barrera de las películas comestibles, (iii) caracterización nutricional de las películas comestibles, (iv) efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón y (v) efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades 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). González y Pérez (2003) obtuvieron una humedad de 10,2% para el almidón de yuca, similar a lo obtenido en este trabajo. Mientras que, 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 regular 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). El alto contenido 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 mayor al aquí obtenido. Sin embargo, Bello y col. (2001) obtuvieron 0,27% de cenizas para este mismo almidón, lo que coincidió 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 variedad blanca 0,07% (Rached y col., 2006), mapuey variedad negra 0,2% (Gutiérrez y col., 2014), yuca 0,1% (González y Pérez, 2003; Gutiérrez y col., 2014), maíz regular 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 regular 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) y Gutiérrez y col. (2014), quienes obtuvieron un contenido de grasa menor en este almidón (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. González y Pérez (2003), Boatella y Codony (2004), Jobling (2004) y Gutiérrez y col. (2014) 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. Gutiérrez y col. (2014) obtuvieron por el método de micro-Kjeldahl 0,26% de proteínas en el almidón de yuca, siendo el mismo método utilizado en este estudio para cuantificar proteína cruda (ver sección 4.3). Sin embargo, González y Pérez (2003) no determinaron proteína en el almidón de yuca igual a lo obtenido en este trabajo. 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 regular 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* según Gianibelli y col. (2005) y en el almidón de mapuey se ha reportado 0,36% y 0,38% de acuerdo con Rached y col. (2006) y Gutiérrez y col. (2014) para las variedades blanca y negra respectivamente, todos contenidos de proteínas 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 cenizas, grasas y proteína en los distintos trabajos pudieran deberse, tanto a las fuentes botánicas seleccionadas como al método de extracción del almidón utilizado. Por ejemplo, diferencias en el número de lavados realizados a la pulpa para la obtención de la lechada y/o al sedimento de almidón obtenido por centrifugación, lavados que son necesarios para separar y remover la capa mucilaginosa presente en la superficie del sedimento (ver sección 4.2). Regularmente el sedimento se lava varias veces resuspendiéndolo en agua destilada y luego centrifugándolo, hasta que se observe libre de material de origen no amiláceo (Gutiérrez y col., 2014).

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 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 regular (Bello y

col., 2001), 99,2% para 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 de grasa ($r = -0,820$; $p < 0,05$; $n = 19$) obtenido en estas muestras⁷. 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 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

⁷ Por razones prácticas se decidió mostrar en esta sección los coeficientes de correlación simple entre las variables de estudio.

(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 la materia prima utilizada. 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 (capa mucilaginosa), podrían contribuir con la disminución del contenido de almidón disponible, tal como ha sido señalado para el almidón de plátano por diferentes autores (Bello-Pérez y col., 2004; Marín, 2009).

En este estudio, el contenido de almidón disponible del almidón de maíz regular 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 estos estudios podrían reflejar una

vez más las variaciones en la materia prima utilizada para extraer los respectivos almidones. 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 el 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 ocurrió con los almidones de mapuey y de apio, debido al elevado contenido de almidón resistente total obtenido en estas muestras (Tabla 3) y en el caso del almidón de apio, mayor al 7,5% estimado por Galeno (2006). 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 nativos provenientes de cereales, raíces y tubérculos presentan patrones de cristalinidad distintos (Hoover, 2001), siendo esta característica uno de los factores que afecta la velocidad y el grado de su hidrólisis enzimática (Buleon y col. 1998). Desde el punto de vista bioquímico, estas diferencias tienen que ver con la estructura molecular fina de los componentes básicos del biopolímero (amilosa y amilopectina) y la manera en que estos polímeros se asocian para formar la estructura supramolecular final o gránulo de almidón (Gallant y col., 1992; Zobel, 1988b).

En la mayoría de los almidones provenientes de raíces y tubérculos se ha descrito un patrón de difracción de rayos X tipo B, entre ellos el almidón de papa (Zobel, 1988a), mapuey (Pérez y col., 2011) y apio (Santacruz y col., 2002; Medina y col., 2012). Esta organización cristalina caracteriza a los almidones pobremente digeribles en estado nativo (AR2) (Englyst y col., 1992) y se ha reportado que esta 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). Los gránulos de almidón con estructura cristalina tipo B presentan en la periferia una capa gruesa formada por bloques grandes y más o menos esféricos, que se encuentran apilados y están constituidos por lamelas cristalinas y amorfas de amilopectina con un alto grado de compactación (Gallant y col. 1997). Esta organización dificulta el acceso de las enzimas digestivas al interior del gránulo y los hace más resistentes a la hidrólisis.

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 ha descrito que los gránulos de almidón con patrón tipo A como en el maíz, la cebada y el trigo (Naguleswaran y col., 2013; Hung y col., 2015) y algunos gránulos de tubérculos con patrón tipo C (Cao y col., 2014), poseen una serie de canales y/o poros en su superficie que permiten que las enzimas hidrolíticas difundan rápidamente al interior del gránulo nativo y tengan acceso a sus sustratos, aumentando así la digestibilidad del almidón (Naguleswaran y col., 2013).

En el almidón de yuca se ha descrito 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 tipo A (Lim y col., 1994; Simsek y El, 2015). Sin embargo, Tapia y colaboradores (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, esta 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). Además, un mayor contenido de cenizas encontrado para el almidón de ocumo chino (Tabla 2), podría indicar la presencia de altos contenidos de fósforo y como consecuencia de esto, una baja digestibilidad, como ha sido reportado por Aboubakar y col. (2008) en un estudio con seis variedades de ocumo.

A pesar de la relación existente entre el patrón de cristalinidad y la digestibilidad del almidón, Cai y Shi (2014) proponen que el tipo de cristalinidad *per se* parece no ser un factor clave que afecte la digestibilidad de los gránulos de almidón nativo y que la resistencia enzimática de los almidones con patrón de difracción tipo B, podría atribuirse a otras características estructurales y organizacionales del gránulo. Además, una baja cristalinidad en el gránulo no resulta en una alta digestibilidad del almidón. Por ejemplo, en comparación con los almidones nativos de maíz *waxy* y regular, se ha reportado que el amilomaíz tiene un grado de cristalinidad menor pero es más resistente a la hidrólisis (Brewer y col., 2012). Esta baja digestibilidad está asociada al contenido muy elevado de amilosa, lo que aumenta el grado de compactación en la masa amorfa y reduce la

flexibilidad de las cadenas de amilosa, dificultando su hidrólisis (Naguleswaran y col., 2013).

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 los diferentes almidones nativos se pudo observar una 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 regular 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 *Sitophilus 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). También se ha reportado que los gránulos de almidón de maíz *waxy* tienen un menor contenido de lípidos unidos, lo que los hace más digeribles (Naguleswaran y col. 2013), similar a lo obtenido en este trabajo (Tabla 2). Los componentes menores tales como las proteínas y los lípidos en la superficie de los gránulos y en los canales, pueden bloquear los sitios de unión de los sustratos reduciendo la velocidad de hidrólisis (Naguleswaran y col., 2011). Además, los lípidos forman complejos con la amilosa originando fracciones resistentes que retardan la hidrólisis del almidón. Se ha obtenido un patrón de cristalinidad del tipo B-V en geles de almidón de maíz regular retrogradado (Zhou y Lim, 2012), lo que es un indicio de la formación de estos complejos amilosa lípidos.

En contraste a los trabajos anteriores, You y colaboradores (2014) en un estudio con seis almidones de arroz *waxy*, reportaron una menor digestibilidad en este tipo de almidón, asociada a la limitada accesibilidad física de las enzimas a las regiones altamente cristalinas y a la presencia de fracciones de almidón resistente (entre 0–7,5%). Estos autores propusieron que tanto la estructura molecular (proporción de las cadenas de amilopectina) como la estructura cristalina de estos almidones, influyen sobre su digestibilidad.

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 regular y yuca. Solamente obtuvieron una disminución significativa de la actividad de esta enzima cuando se empleaba como sustrato almidón de maíz *waxy* gelatinizado. Sin embargo, estos resultados no concordaron 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 (Björk y col, 1994; Naguleswaran y col. 2013). Posiblemente, los resultados encontrados también 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 presentaron 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). Otros estudios han usado el almidón de ocumo para producir un almidón resistente enriquecido en fracciones retrogradadas, el cual fue hidrolizado más lentamente que el almidón nativo, presentó un índice glucémico intermedio y la capacidad de unirse *in vitro* a las sales biliares, con un posible efecto hipocolesterolémico, lo que lo hace ideal para la formulación de productos especialmente dirigidos a personas diabéticas y con problemas de peso (Simsek y El, 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 presentó una alta supervivencia al ser mantenido 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 (arvejas verdes partidas y peladas) como una dieta rica en nutrientes para el mantenimiento de los cultivos y a la dieta de referencia (almidón de maíz comercial) como dieta basal, con un aporte limitado pero suficiente de nutrientes.

Cuando los insectos fueron sometidos a una restricción alimentaria total (condición de ayuno), la supervivencia disminuyó 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 (82%; Figura 3). 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). 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 (21%; Figura 5) 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 bioensayo (Figura 5). Estos resultados fueron comparables a los reportados por Lovera (2008) con una ganancia de peso final de 4%, la cual se alcanza con un incremento progresivo de peso durante los ocho días del bioensayo. No obstante, en este estudio el aumento de peso ocurrió al segundo día 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 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 notable 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 total determinados *in vitro*, presentes en los almidones de papa y de plátano. Esto último, también podría explicar lo encontrado en el presente trabajo con respecto a la supervivencia y a la variación de peso en los insectos alimentados con la dieta de almidón de mapuey crudo (Figura 4 y 6), que tiene 56% de fracción resistente total (Tabla 3).

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 este sentido, una menor pérdida de peso en los insectos alimentados con el almidón de mapuey (Figura 6), posiblemente evitó un aumento de la mortalidad y con ello, de la toxicidad de la dieta.

En el presente estudio, los biomarcadores supervivencia y variación de peso de los insectos correlacionaron negativamente con el contenido de almidón resistente total ($r_{\text{Sup}} = -0,700$; $r_{\text{Var.P}} = -0,849$; $p < 0,05$; $n = 21$) y positivamente con el contenido de almidón disponible ($r_{\text{Sup}} = 0,743$; $r_{\text{Var.P}} = 0,758$; $p < 0,05$; $n = 21$), lo que explicaría, por

ejemplo, 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 en 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 del 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, fue observado de manera menos acentuada en los insectos alimentados con el almidón de mapuey, pero no se evidenció en aquellos alimentados con el almidón de apio. Posiblemente esta diferencia se deba a que estos almidones tienen un mayor contenido de almidón disponible a pesar de presentar una elevada fracción de almidón resistente total (Tabla 3), además de una mayor tasa de hidrólisis enzimática como ocurrió para el almidón de apio en estado crudo (Figura 2E y Tabla 4). Adicional a esto, 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 tres almidones, sugiere que la baja biodisponibilidad del almidón de papa pudiera deberse también, a otros factores presentes en este almidón.

Además de la movilización de las reservas energéticas del insecto producto de la ingesta de dietas poco biodisponibles, 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) y este efecto permitiría explicar la pérdida de peso observada en los insectos alimentados con dichas dietas. 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 de los almidones de papa y mapuey. 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; Laurentin y col., 2014a). 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* solo 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 la actividad similar a α -amilasa en el insecto: 1) almidones de menor digestibilidad que la referencia: papa y mapuey y 2) almidones de igual digestibilidad que la referencia: maíz regular, ocumo chino, apio, yuca y 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 ($r = 0,840$; $p < 0,05$; $n = 21$) 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 ($r = -0,726$; $p < 0,05$; $n = 21$) 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 ($r = -0,573$; $p < 0,05$; $n = 14$) 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 α -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 esta 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), 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 genomios (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 (Laurentin y col., 2014a), 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; Laurentin y col., 2014a).

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 0,55% (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 0,73–1,39 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 la excreción de ácido úrico en el insecto: 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 de tipo B, aspectos que los hacen altamente resistentes al ataque enzimático (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992), como lo confirman 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 menor excreción de ácido úrico en los almidones de maíz (regular y ceroso), ocumo chino y 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 ($r = -0,790$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón disponible y positivamente ($r = 0,850$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón resistente total, sin embargo, no se obtuvo correlación alguna con la velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis de los almidones en estado crudo. García (2003), Galeno (2006) y González-Quilen (2013) empleando almidones de distinto origen botánico, también encontraron una correlación positiva entre este biomarcador y el contenido de almidón resistente total. 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 ($r = 0,934$; $p < 0,05$; $n = 24$) y con los dos biomarcadores se obtuvo un mismo ordenamiento de los almidones de acuerdo a su digestibilidad *in vivo*, con la excepción del almidón de apio. En este caso, el biomarcador excreción de ácido úrico ubicó al almidón de apio como de menor digestibilidad que la referencia, en comparación con el biomarcador actividad similar a α -amilasa, que lo ubicó como de igual digestibilidad que la referencia. Estos biomarcadores también presentaron una correlación negativa con la supervivencia ($r_{ASA} = -0,921$; $r_{EAU} = -0,909$; $p < 0,05$; $n = 24$) y la variación de peso ($r_{ASA} = -0,974$; $r_{EAU} = -0,947$; $p < 0,05$; $n = 24$) 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.

Pocos son los estudios en los que se evalúa la digestibilidad de los almidones mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Recientemente Hung y colaboradores (2015) compararon la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de cinco almidones de arroz nativos que variaban en su contenido de amilosa (4,7–30,6%) y de almidón resistente (6,3–11,8%), con la de sus respectivos almidones modificados físicamente. El objetivo de este estudio fue correlacionar las fracciones del almidón (rápidamente digerible, lentamente digerible y almidón resistente) con sus índices glucémicos, evaluados a través de la medición de la respuesta al incremento de los niveles de glucosa sanguínea en ratones alimentados vía oral

con una solución gelatinizada del almidón al 7,5% (p/v). Estos investigadores encontraron fuertes correlaciones entre los contenidos de almidón resistente –que aumentaron en los almidones modificados– y la variable medida *in vivo*, que fueron los valores de índice glucémico ($r = -0,747$; $p < 0,01$). Este tipo de estudio, donde se busca correlacionar los parámetros *in vitro* como el contenido de almidón resistente y algún parámetro determinado *in vivo*, es de gran utilidad para finalmente dilucidar el destino metabólico de los productos de la digestión de los almidones analizados.

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 física, química, 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, flexibles y elásticas (Mali y col. 2004a;

2004b; Rojas, 2007). En este estudio, se observó el efecto del plastificante al utilizar dos concentraciones de glicerol (1,5% y 2% v/v) en las formulaciones ensayadas (sección 4.4.1). Tomando en cuenta estas características, fueron seleccionadas las formulaciones que tenían un mayor contenido del plastificante, porque resultaron ser películas más manejables y menos quebradizas (Tabla 8), lo que permitía estudiar mejor sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales.

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., 2009; Bourtoom, 2008; López y col., 2008), tanto en películas a base de proteínas como de carbohidratos. 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 de esto, aumenta la flexibilidad y la elasticidad de las películas y se reduce la fuerza ténsil (Psomiadou y col., 1996).

La interacción del almidón con otros componentes como proteínas y lípidos, puede también afectar las propiedades de textura de las películas y las coberturas comestibles, ya que estos compuestos interactúan entre sí formando estructuras complejas, lo que puede modificar las propiedades estructurales y mecánicas finales de la matriz. Con los siete almidones estudiados de origen y composición proximal distinta (Tabla 2), se obtuvieron

películas comestibles con características de textura también diferentes, a pesar de haber sido formuladas con la misma concentración de almidón (5% p/v) y del plastificante (2% v/v), con la excepción de la película de almidón de yuca y de ocumo chino, que para conseguir las características recomendadas por Ortiz (2010), se aumentó la concentración del almidón a 6% p/v (Tabla 8). 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.

En este sentido, la composición proximal de los almidones estudiados podría tener un efecto sobre las propiedades mecánicas de las películas comestibles (Tabla 11). 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 las 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 ($r = -0,541$; $p < 0,05$; $n = 21$).

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 películas a base de almidones han reportado este parámetro (Ortiz, 2010). Esta prueba también permite determinar la dureza del material, que se define como la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o la resistencia del alimento a la rotura (Rosenthal, 2001).

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.

Rosenthal (2001) define a un material elástico como aquel que se deforma inmediatamente en cierta extensión cuando se aplica un esfuerzo y recupera su forma original una vez que el esfuerzo se ha eliminado. El esfuerzo es la fuerza ejercida sobre el material, la cual ocasiona el estiramiento de los enlaces interatómicos que sujetan el material junto. Al realizar la prueba de estiramiento, las películas de almidón de apio y de yuca resultaron ser las más flexibles y elásticas de las formulaciones seleccionadas (Tabla 8). Resultados similares fueron reportados por Gutiérrez y col. (2015b) al evaluar

las propiedades mecánicas de las películas de almidón de yuca. No obstante, en el presente trabajo 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).

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 caracterizaban por presentar una estructura granular y porosa, detalles no observados 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 observaban poros ni fracturas. Resultados similares fueron reportados por López y col. (2008), quienes realizaron micrografías a películas elaboradas con almidón de maíz acetilado y realizadas por la técnica de 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. En el presente trabajo, la mayoría de las películas presentaron superficies lisas (Figura 8A, D, E y G) y algunas con rugosidades (Figura 8C y F). 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 de las películas (4–9 meses).

Lovera (2014) observó el efecto del tiempo de almacenamiento de la película comestible de almidón de maíz *waxy* sobre la morfología de la misma, pudiendo evidenciar claramente como las películas que presentaban una semana de almacenamiento para el momento en que fue realizado el estudio morfológico, carecían de líneas de fractura y grietas, la superficie era totalmente lisa y el interior de la película se evidenciaba más laxo y homogéneo que aquella película que tenía 9 meses de almacenamiento. Lawton (1996) reportó que a diferencia de la película de almidón de maíz *waxy*, un elevado contenido de amilosa volvía a las películas más estables en el tiempo (7–168 días) y sus propiedades mecánicas presentaban menos variaciones a medida que cambiaba la humedad relativa (15–93 %) del medio donde estaban almacenadas. Este efecto del tiempo de

almacenamiento sobre la morfología de la película observado por Lovera (2014), también fue encontrado para la película de almidón de yuca (resultados no mostrados).

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 también influye sobre las características morfológicas y las 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 películas a base de almidón hay que tener en cuenta la composición química del gránulo, porque ocurre una interacción de diferentes grados de intensidad entre el agente plastificante y los polímeros que forman el almidón (Gutiérrez, 2013) y de ello, depende la obtención de una película homogénea y con buenas propiedades mecánicas.

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 resistencia a la rotura 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 explicaron 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. Además, esto se favorecía por el tipo de modificación química que los autores habían realizado 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, debido a que los almidones *waxy* como el de maíz y el de mapuey presentaron esta capacidad, los cuales originaron películas firmes y de buena manejabilidad (Tabla 8). 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

como plastificante, 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 podría ser indicio de una menor rigidez y cohesividad, como consecuencia de una menor interacción almidón-almidón y una mayor interacción glicerol-amilosa, lo que se traduciría en un aumento en la flexibilidad y en la elasticidad de la película, como fue observado con la película de almidón de yuca (Tabla 8 y Figura 8D), que al contrario de aquellas películas más rígidas y cohesivas como la de almidón de mapuey blanco (Figura 8C), tendrían propiedades de barrera diferentes así como también, un comportamiento característico en soluciones acuosas (solubilidad y retención de agua; Tabla 9). Resultados similares fueron reportados por Gutiérrez y col. (2015b) con películas a base de almidón de yuca y de mapuey negro, respectivamente.

Mali y col. (2004b) estudiaron la capacidad formadora de película de los almidones de yuca, maíz y ñame, los cuales contenían 19%, 25% 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 para las películas a base de almidón de

yuca y de maíz *waxy* (Tabla 8). Estas películas fueron flexibles y traslúcidas 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. La transparencia de ambas películas se vió reflejada en un cambio total del color elevado y en un menor índice de blanco, siendo más acentuado para la película de almidón de yuca (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Myllärinen y col. (2002a) quienes 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 un mayor contenido del plastificante (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), la concentración de almidón (Mali y col., 2004a) y su contenido de amilosa (Gutiérrez y col., 2015b), 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 clara. 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). Por su parte, Gutiérrez y col. (2015b) reportaron para las películas de almidón de yuca un cambio total del color menor debido al mayor grosor, sin embargo, para aquellas a base de almidón de mapuey negro, este parámetro resultó similar al obtenido en este trabajo. Una mayor diferencia en el cambio de color en las películas de almidón de yuca refuerza la idea de que son películas más transparentes, esto pudiera estar relacionado con el contenido de amilosa en este almidón (21% con respecto a un 12% en el almidón de mapuey; Gutiérrez y col. 2014), como fue reportado por Gutiérrez y col. (2015b). 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.

El grosor es un parámetro que también 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 de la película aumenta también lo hace la

resistencia a la fuerza de punción, es decir, las películas se vuelven más duras. No obstante, en el presente estudio no se encontraron correlaciones algunas entre los parámetros de textura y el grosor de las películas.

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 una susceptibilidad de la película de almidón de mapuey al deterioro físico con el tiempo de almacenamiento (siete meses), como ha sido señalado por Lovera (2014) para la película de almidón de maíz *waxy*. Las líneas de fractura observadas podrían ser consecuencia de una posible pérdida de humedad en la película y una retrogradación del almidón, lo que generaría cambios estructurales en la matriz polimérica que se reflejan en la morfología de la película.

Famá y colaboradores (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 0,58, 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, era principalmente lo que producía los cambios observados en las propiedades mecánicas de las películas comestibles estudiadas.

Varios estudios sobre las propiedades mecánicas de las películas de almidón de mapuey han reportado que estas películas tienen un comportamiento más frágil y quebradizo (Tapia y col., 2012; Gutiérrez y col., 2015b). Estos autores atribuyen este efecto a la composición química de los gránulos de almidón presentes en este material, sobre todo a sus contenidos elevados de amilopectina y bajos de amilosa. Gutiérrez y col. (2015b) propusieron que la rigidez causada por la retrogradación del almidón es un fenómeno que ocurre como consecuencia de la plastificación por la humedad. Durante la gelatinización, el agua actúa como un plastificante debilitando la interacción glicerol-almidón y esto es mayor en los almidones *waxy* o con altos contenidos de amilopectina. Gutiérrez (2013) propuso que el glicerol puede interactuar más fuertemente con el almidón de yuca que con el de mapuey, posiblemente debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el glicerol y las moléculas de amilosa (polímero fundamentalmente lineal). Esta interacción glicerol-amilosa debilita las interacciones intra e intermoleculares entre las cadenas del polímero, lo que conduce a un aumento de la movilidad y del rearreglo de estas cadenas en el interior de la matriz, aumentando así la flexibilidad y la elasticidad de la película de almidón de yuca. Los resultados obtenidos por Gutiérrez y col. (2015b) permiten explicar lo obtenido en este trabajo, en relación con las diferencias morfológicas encontradas entre las películas de almidón de mapuey blanco y de yuca (Figura 8C y D, respectivamente). Sin embargo, además del contenido de amilosa y amilopectina, otros factores como la absorción de agua y el comportamiento de la película en soluciones acuosas, parecen estar influyendo en la formación de una matriz polimérica flexible y menos rígida, puesto que el almidón de maíz ceroso también generó una película con estas características.

El grosor es un parámetro que afecta notablemente diversas propiedades en las películas comestibles. Este 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 (método de vaciado en placas) y por las condiciones de secado de las películas (con calor o en frío).

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% v/v).

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, rangos de grosor más amplios a los encontrados en el presente estudio (Tabla 9). Pérez y col. (2012) y Gutiérrez y col. (2015b) obtuvieron valores de grosor de 0,13 mm y 0,12 mm en películas de almidón de mapuey (variedad blanca y negra, respectivamente), similar a lo encontrado en este estudio. Mientras que Phan The y col.

(2009) formularon películas muy delgadas de almidón de yuca con 0,047 mm de grosor, en comparación a lo obtenido por Gutiérrez y col. (2015b) con 0,17 mm, ambos resultados diferentes a los reportados en este trabajo. Es importante señalar que las diferencias existentes pueden ser atribuidas al tipo de almidón, la proporción relativa de los componentes empleados para la formulación de las películas, así como al procedimiento utilizado para la elaboración y secado de estas preparaciones.

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; Gutiérrez y col., 2015a; 2015b), 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 las obtenidas en este trabajo–, 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 es mayor que en las películas delgadas, lo que resulta en una mayor orientación de las moléculas dentro de la matriz polimérica. La misma respuesta fue observada cuando las películas fueron 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). Por esta razón, las condiciones de secado de las películas es un parámetro que hay que tener en cuenta cuando se evalúan las propiedades físicas, químicas, 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 la manera en que las moléculas interactúan entre sí y con el agente dispersante, 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 utilizado y la forma en que la solución se vierte en la cápsula, la cual actúa como molde para generar la capa fina o película. 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 ha 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 esta última, una técnica de preparación de películas a base de almidón, que

garantiza un mayor control del grosor, de manera de generar películas más finas y uniformes.

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 $0,20-0,25 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa (Romero-Bastidas, 2005); $0,15-0,50 \times 10^{-10}$ 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; Gutiérrez y col., 2015b); 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., 2009; 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, aumentaba 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 incrementaba. 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. Esto también fue observado por Gutiérrez y col. (2015b) en películas de almidón de yuca y de mapuey (variedad negra) formuladas con 2% (p/v) y 1,9% (p/v) de glicerol. Sin embargo, en este trabajo las películas a base de

almidón de mapuey resultaron ser más gruesas y por lo tanto, más permeables al vapor de agua, en comparación con las películas de almidón de yuca. Posiblemente, las proporciones relativas de almidón y glicerol utilizadas para la formulación de estas películas expliquen las diferencias encontradas con Gutiérrez y col. (2015b). García y col. (2009) reportaron que las películas de almidones *waxy* tienden a ser menos permeables que las películas preparadas con almidones que presentan mayores contenidos de amilosa, como es el caso del almidón de yuca. Esto se debe a que una mayor interacción glicerol-amilosa limitaría la posible interacción entre las moléculas de agua, glicerol y almidón, evitando así que el vapor de agua pase más fácilmente a través de las películas, como fue reportado por Gutiérrez y col. (2015b) para la película de almidón de yuca.

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) y como consecuencia, originar cambios en la transferencia de vapor de agua entre la película y el ambiente circundante.

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 yuca, maíz 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.

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 mayoría tienen una estructura fundamentalmente amorfa (Xu y col., 2005) con regiones discretas de estructura cristalina tipo A o B, como se ha reportado para las

películas de almidón de maíz *waxy* y de yuca, respectivamente (García y col., 2006). Sin embargo, Myllärinen y col. (2002b) señalaron que la cristalinidad de las películas de amilosa con y sin glicerol era más estable que las de amilopectina altamente plastificadas (con 30% de glicerol y mantenidas a 91% humedad relativa), donde la estructura cambiaba de la forma amorfa a la cristalina tipo B durante el primer mes de almacenamiento. En este sentido, un posible aumento de la cristalinidad en las películas de almidón de maíz *waxy* favorecido por las condiciones de almacenamiento (ver sección 4.4.2), 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 regular con mayor contenido de amilosa, aun siendo películas formuladas con una baja concentración de glicerol (2%). Además, es posible que la mayor velocidad de transmisión de vapor de agua obtenida para la película de almidón de maíz regular, sea debido a su mayor grosor (Figura 7), aunque estas diferencias notables en la permeabilidad al vapor de agua no reflejan el grosor similar encontrado entre estas dos películas.

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; y por Rindlav y col. (1997) para la película de almidón de papa. Mientras que la película de almidón de yuca presenta una estructura altamente amorfa o con un patrón de difracción de tipo B-V (Famá y col., 2005; Flores y col., 2007). Dado que la amilosa es un polímero principalmente lineal y 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). No obstante, los cambios en la cristalinidad en las películas también dependen de la cantidad del plastificante y de las condiciones de humedad relativa del medio en donde sean almacenadas.

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 bajo la condición de almacenamiento utilizada (temperatura ambiente en bolsas herméticamente cerradas), similar a lo reportado por Rojas (2007) para la película de almidón de papa (Tabla 9). Por su parte, Pérez y col. (2012) reportaron una a_w de 0,43 en películas de almidón de mapuey blanco y Gutiérrez y col. (2015a) también encontraron valores de actividad de agua similares en películas de almidón de yuca y de mapuey negro acondicionadas por una semana ($a_w \sim 0,58$ a 25°C , con una solución saturada de NaBr). Estos resultados con películas acondicionadas comparados con los obtenidos en este trabajo, reflejan una buena estabilidad del almidón termoplástico a diferentes condiciones de almacenamientos. Los valores de $a_w < 0,6$ unidos 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). 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 de 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 rígida (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 almidón de apio, de ocumo chino y de maíz regular presentaron una resistencia intermedia al agua, resultados similares a los obtenidos en películas de carragenato (Lee, 1999), mientras que las películas de almidón de mapuey y de 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). 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 regular. 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 regular y ceroso, respectivamente. 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 a base de almidón de apio y de yuca, la metodología planteada por Lee y col. (2004) y Rhim (2004) para la determinación de la capacidad de retención de agua, 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 debe 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 de maíz regular. Lee y col. (2004) encontraron un valor 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, de maíz *waxy* y de 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, de maíz regular y de 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 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 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 regular y papa resultaron ser más resistentes al agua, lo que refleja el potencial de estas formulaciones para ser usadas como coberturas de productos de alta humedad como las 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.

En función de las propiedades físicas, químicas, morfológicas, mecánicas y de barreras, todas las películas analizadas presentaron características que las hacen potencialmente funcionales para la industria de alimentos, ya sea como empaques biodegradables resistentes y/o flexibles, así como matrices poliméricas de soporte de frutas y hortalizas frescas, actuando como coberturas comestibles. Estos usos dependerán siempre de las características de los productos que se desean empaquetar o cubrir, así como de los requerimientos que se tengan sobre estos empaques (Gutiérrez y col., 2015b).

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 regular (Tabla 12), fue similar a lo reportado por Hernández y col. (2008). Las diferencias en cuanto a las condiciones de preparación de estas películas y a la concentración de almidón y glicerol utilizadas en ambos estudios, no ocasionaron cambios en este parámetro.

Las películas de almidón de yuca y de 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), lo contrario se obtuvo con las películas de almidón de papa y de maíz regular. 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.

El elevado tenor de almidón resistente total encontrado para las películas preparadas a base de almidón de mapuey y de papa, puede deberse principalmente, a la presencia de gránulos sin gelatinizar luego del tratamiento térmico para la elaboración de las películas,

aspecto que se evidenció en las tasas de amilólisis *in vitro* de las películas crudas (no sometidas a tratamiento térmico antes del ensayo enzimático), en comparación a las películas gelatinizadas (Figura 9C y G). Resultados similares han sido encontrados 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 también a la generación de almidón resistente por retrogradación (Tabla 12); sin excluir la posible contribución de fracciones inaccesibles físicamente.

El contenido de almidón resistente total en la película de almidón de maíz regular 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 el incremento en el almidón 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, por lo que estas fracciones resistentes (total y retrograda) deberían ser menores bajo estas condiciones, sin embargo, un contenido mayor del plastificante utilizado en este estudio (2% con respecto a 1,5% en Hernández y col, 2008), pudo ocasionar un aumento notable en la fracción retrogradada (Tabla 12).

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.

El contenido de almidón retrogradado fue menor a la fracción resistente total determinada en las películas analizadas, igual a lo reportado por Hernández y col. (2008) en películas comestibles a base de almidón de maíz regular, papa, plátano y sagú. Esto se debe a que el método de Saura-Calixto y col. (1993) permite determinar parte de la fracción indigerible, específicamente aquella asociada al almidón retrogradado presente en la muestra (Tovar, 2001a), mientras que el método de Goñi y col. (1996) incluye la suma del almidón físicamente inaccesible, los gránulos indigeribles no gelatinizados y las fracciones resistentes retrogradadas.

En la película de maíz regular la fracción retrogradada fue mayor a lo reportado para esta película (2,86% con respecto a 1,63% en Hernández y col., 2008) y estadísticamente mayor a la obtenida en la película de almidón de maíz *waxy* (0,06%; Tabla 12). Para la película de almidón de papa se obtuvo un contenido de almidón retrogradado menor a lo reportado por este mismo autor (1,49% con respecto a 2,01%). Estos resultados se relacionan con los contenidos elevados de almidón resistente total obtenidos en las películas de almidón de maíz regular y de papa. Además, el contenido de almidón disponible de las películas correlacionó negativamente ($r = -0,580$; $p < 0,05$; $n = 21$) con el contenido de almidón retrogradado, siendo estas dos películas las que presentaron un menor contenido de almidón disponible entre las películas estudiadas.

El contenido de amilosa y amilopectina afectan la estabilidad de estas preparaciones en el tiempo. En el caso de la película de almidón de maíz *waxy*, un mayor contenido de amilopectina en el almidón ocasionó una menor retrogradación luego de su gelatinización, aspecto que se vió reflejado en un contenido de almidón retrogradado extremadamente bajo y en una fracción resistente total también baja, menor a lo obtenido en la película a base de almidón de maíz regular, un almidón que presenta entre 70–80% de amilopectina. Con la película de almidón de mapuey que es de naturaleza *waxy* (96,2% de amilopectina, Tapia y col. 2012), se encontró el segundo contenido de almidón retrogradado más bajo entre las películas analizadas, lo que corresponde con la baja tendencia de la amilopectina a retrogradar, sin embargo, esta película presentó un elevado contenido de almidón resistente total (Tabla 12). Es probable que la presencia de fracciones cristalinas que no se disociaron durante el tratamiento térmico en la preparación de las películas de almidón de mapuey, estén contribuyendo a los mayores valores de almidón resistente total encontrados en esta película, como muestra la curva de α -amilólisis de esta película cruda en comparación a la gelatinizada (Figura 9C). Además, los contenidos de almidón resistente total muy altos presentes en el almidón de mapuey al igual que en el almidón de papa (Tabla 3), hace que las películas comestibles también presenten un elevado contenido de fracciones resistentes a la digestión, en comparación con aquellas formuladas con almidones que son más digeribles en estado crudo, de acuerdo a su patrón de difracción de rayos X tipo A, como son los almidones de maíz (regular y ceroso).

Distintos factores afectan la digestibilidad de las películas a base de almidón. Li y colaboradores (2015) estudiaron la influencia de la estructura molecular, cristalina y granular de las películas de almidón de maíz regular (28% de amilosa) sobre su

biodegradabilidad, empleando una digestión con la α -amilasa de *Aspergillus niger*. Estos investigadores formularon películas usando la técnica de moldeo por compresión (135°C a 7,5 MPa por 5 min) y empleando almidones que tenían diferentes estructuras moleculares (obtenidos por hidrólisis ácida) y tamaños de gránulo, plastificadas con glicerol al 30% (v/v). Además, envejecieron estas películas almacenándolas en bolsas de plástico herméticamente cerradas y colocadas a temperatura controlada, las cuales fueron guardadas por distintos tiempos (0, 8 y 14 días), con la finalidad de obtener películas con diferentes grados de cristalinidad (4,7; 5,5 y 15%, respectivamente). Los autores encontraron que las películas que contenían moléculas más grandes, independientemente del tamaño del gránulo, eran degradadas más rápido debido a la mayor cantidad de sustrato disponible para ser hidrolizado. Por su parte, las películas retrogradadas eran degradadas más lentamente que aquellas no retrogradadas. Los autores explicaron que, aunque inicialmente eran degradadas más rápido las moléculas más pequeñas o las cadenas de almidón fácilmente accesibles en la superficie amorfa de las películas, la estructura más ordenada formada durante la retrogradación (almidón resistente), incluso antes o durante la degradación enzimática, inhibía fuertemente la degradación de la película.

La solubilidad en agua y la capacidad de retención de agua de las películas comestibles son dos parámetros que influyen notablemente sobre la digestibilidad *in vitro* de estas preparaciones. En este sentido, Hernández (2006) refiere que una menor solubilidad de las películas podría limitar su digestibilidad al existir en ellas una 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 y con ello, generar resistencia enzimática.

En el caso de las películas de almidón de yuca por ejemplo, una estructura polimérica más laxa (Figura 8D) pudo ocasionar una mayor entrada de agua a la película (muy alta capacidad de retención de agua; Tabla 9) con la consecuente disolución de sus componentes (elevada solubilidad en agua; Tabla 9), lo que condujo 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 en la película. Esto se vió reflejado en este trabajo, tanto en un mayor contenido de almidón disponible como en una fracción resistente total menor (Tabla 12). Por el contrario, la película de almidón de papa presentó la menor solubilidad y capacidad de retención de 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). 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.

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*. Además, la capacidad de retención de agua de las películas es otra propiedad de las películas que influye también sobre su digestibilidad. Ambas propiedades de barrera dependen directamente de las características intrínsecas del almidón utilizado para la preparación de las películas comestibles. En este sentido, Li y col. (2005) propusieron que la cantidad de sustrato liberado a la solución desde la película como consecuencia de su solubilización puede afectar la velocidad de degradación. Estos autores encontraron que las películas retrogradadas eran menos solubles en agua fría que las no retrogradadas, con solo

un 0,2% de almidón soluble luego de 24 horas en las películas almacenadas por 8 y 14 días. Estos investigadores propusieron que, durante el proceso de degradación de las películas a base de almidón, existen al menos dos mecanismos: el primero involucra la degradación rápida de los componentes fácilmente accesibles, como las moléculas pequeñas que entran rápidamente en solución y los componentes accesibles que son parte integral de la película, y el segundo, involucra la degradación lenta de las fracciones resistentes.

En el presente estudio, los parámetros solubilidad en agua y 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 ($r_{SA} = -0,725$; $r_{RA} = -0,700$; $p < 0,05$; $n = 21$). Por su parte, la solubilidad en agua de las películas correlacionó con el contenido de almidón retrogradado ($r_{SA} = -0,486$; $p < 0,05$; $n = 21$), aspecto que coincide con lo reportado por Li y col. (2005).

La cinética de hidrólisis encontrada en las películas comestibles que no fueron sometidas a ebullición previa al ensayo enzimático (películas crudas) (Tabla 13 y 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), como la película de almidón de papa, de mapuey y de maíz regular. 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 y positivamente ($r = 0,594$; $p < 0,05$; $n = 14$) con el contenido de almidón disponible obtenido en las películas comestibles.

La cinética de hidrólisis obtenida con la película de almidón de maíz regular gelatinizado (Figura 9A), fue similar a lo reportado por Hernández y col. (2008), quienes obtuvieron una magnitud final de hidrólisis de 74% (Tabla 13). La tasa de α -amilólisis de la película de almidón de maíz *waxy* fue ligeramente mayor (Figura 9B y Tabla 13). Los gránulos de almidón *waxy* son hidrolizados más rápidamente que los gránulos que contienen cantidades significativas de amilosa (Jane, 2007). 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 regular. En este sentido, los parámetros solubilidad en agua y 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, con relación a las películas de almidón de maíz regular.

Las propiedades mecánicas de las películas comestibles pueden también tener un efecto sobre su digestibilidad *in vitro*. En este sentido, la dureza de las películas correlacionó positivamente con el contenido de almidón resistente total ($r = 0,535$; $p < 0,05$; $n = 21$) y negativamente con la magnitud final de hidrólisis de las películas crudas ($r = -0,590$; $p < 0,05$; $n = 14$). Tanto las condiciones de secado de las películas como 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.

En un estudio más detallado de la digestibilidad de las películas a base de almidón y glicerol, se empleó el bioensayo del gorgojo de arroz *S. oryzae* para evaluar *in vivo* las propiedades nutricionales de estas preparaciones comestibles.

La supervivencia de los insectos alimentados con las películas a base de almidón y glicerol fue similar a lo reportado por otros investigadores en películas de almidón de papa (Rojas, 2007), batata, plátano y yuca (Ortiz, 2010), en estudios realizados con este mismo modelo animal. A diferencia de otros carbohidratos utilizados como matriz polimérica (goma gelano y alginato), las películas a base de almidón pueden ser ingeridas sin generar toxicidad en el insecto (Rojas, 2007). No obstante, Ortiz (2010) reportó una supervivencia menor en los insectos alimentados con la película de almidón de yuca (93% al día 8),

similar a lo encontrado en este trabajo para la película de almidón de mapuey (94%; Figura 10).

La ganancia de peso encontrada en los insectos alimentados con las dietas de películas a base de almidón (Figura 11 y Tabla 14), también ha sido reportada por varios investigadores. Rojas (2007) encontró una ganancia de peso de 10% en los insectos alimentados con la película de almidón de papa, mayor a lo encontrado en este estudio (3%), pero similar a la obtenida con la película de referencia y la de almidón de mapuey (Tabla 14). Ortiz (2010) obtuvo un aumento de peso en los insectos de 8% con películas de almidón de plátano, pero reportó una disminución del peso con las películas de almidón de batata y de yuca. Las diferencias encontradas entre estos estudios pudieran deberse a la composición proximal y a la digestibilidad de los almidones utilizados, así como a las diferencias en la formulación de las películas y a su digestibilidad, no obstante, estos investigadores no evaluaron la digestibilidad *in vitro* de las películas formuladas.

La ingesta de alimento durante el bioensayo es un parámetro que puede verse influenciado por la textura de las dietas. Aunque en este estudio no fue determinado, una menor ganancia de peso en los insectos alimentados con una dieta de película de almidón de maíz *waxy*, en comparación a la película de referencia formulada a base de almidón de maíz regular (Tabla 14), podría reflejar una diferencia en la ingesta de estas dos dietas, tomando en consideración que estas películas presentaron características de textura claramente diferentes (Tabla 11).

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 mayores 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, dado que en los insectos se promovió una mayor actividad α -amilolítica en comparación a la película de referencia (Tabla 15). Se ha reportado que películas de amilopectina formuladas con elevados contenidos del plastificante (30% de glicerol) 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, las películas de almidón de maíz *waxy* formuladas con 2% de glicerol fueron almacenadas por 49 días, lo que pudo favorecer un aumento de la cristalinidad y por lo tanto, una disminución de su digestibilidad. Sin embargo, la menor digestibilidad *in vivo* encontrada con esta película no concuerda con la mayor digestibilidad obtenida en los estudios *in vitro* (Tablas 12 y 13), en comparación con la película de almidón de maíz regular (película de referencia) con un tiempo de almacenamiento de 47 días. Posiblemente, otros factores como la textura del alimento estén afectando la digestibilidad *in vivo* de estas preparaciones, por ejemplo, la menor dureza y fracturabilidad, así como una mayor adhesividad de las películas de almidón de maíz ceroso (Tabla 11), pudo ocasionar una disminución en el grado de masticación del alimento, dificultando su fragmentación y por lo tanto, el acceso a las enzimas digestivas.

En el caso de la película de almidón de mapuey (54 días de almacenamiento), la cual presentó un alto contenido de almidón resistente total (Tabla 12) y una baja tasa de

hidrólisis en estado crudo (Tabla 13), promovió como se esperaba, una mayor actividad α -amilolítica en el insecto. No obstante, con la película de almidón de papa (37 días de almacenamiento), que presentó también elevados contenidos de almidón resistente total (Tabla 12), la actividad α -amilolítica en los insectos fue similar a la obtenida con la película de referencia, lo que se corresponde con que *in vitro* ambas películas tienen una tasa de hidrólisis en estado crudo similar y mayor a la obtenida en la película de almidón de mapuey (Tabla 13).

En comparación con la película de referencia, las películas estudiadas pueden ser ordenadas de menor a mayor digestibilidad tomando en cuenta la actividad similar a α -amilasa: 1) películas de menor digestibilidad que la referencia: maíz *waxy* y mapuey, 2) películas que presentan una digestibilidad similar a la referencia: yuca y papa y 3) películas de mayor digestibilidad que la referencia: ocumo chino y apio.

La alta excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con las películas a base de almidón (Tabla 16), podría deberse a un efecto de dilución de los nutrientes en la mezcla que constituye la solución formadora de película (carbohidrato y proteínas principalmente). 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, con 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.

En comparación con la película de referencia, las películas estudiadas pueden ser ordenadas de menor a mayor digestibilidad tomando en cuenta la excreción de ácido úrico:

- 1) películas de menor digestibilidad que la referencia: yuca, maíz *waxy* y apio y
- 2) películas de igual digestibilidad que la referencia: ocumo chino, papa y mapuey.

Es importante resaltar que el método para extraer el ácido úrico a partir de las excretas y los restos de la dieta, implicaba la solubilización de este compuesto en un volumen fijo de agua destilada hirviente. Cabe destacar que las películas comestibles a base de almidón son muy hidrofílicas y presentan diferentes grados de solubilidad y retención de agua (Tabla 9), propiedades que dificultaron el procedimiento de extracción del ácido úrico en este tipo de material. Por ejemplo, cuando los restos de películas finamente triturados entraban en contacto con el agua, adquirirían una consistencia gelatinosa, lo que afectaba la obtención de un sobrenadante a partir del cual se pudiese cuantificar el ácido úrico. Este problema metodológico se evidenció en mayor medida con los restos de películas a base de almidón de yuca, maíz *waxy*, apio y ocumo chino. En estas últimas muestras se empleó un mayor volumen de extracción (3 mL de agua destilada), para tratar de obtener dichos sobrenadantes en cantidades suficientes para su posterior cuantificación. En este estudio, el biomarcador excreción de ácido úrico correlacionó positivamente con los parámetros solubilidad y retención de agua de las películas analizadas ($r_{SA} = 0,924$; $r_{RA} = 0,878$; $p < 0,05$; $n = 21$). En este sentido, una rápida y mayor absorción de agua en la película, podría favorecer la solubilización del ácido úrico y por lo tanto, su extracción de la matriz sólida en la que se encuentra, esto se vería reflejado en un aumento en la cantidad de ácido úrico cuantificable en la muestra, así como ocurrió con los restos de películas de almidón de yuca, maíz *waxy*, apio y ocumo chino, justamente

aquellas películas más solubles y con la mayor capacidad de retención de agua (Tabla 9). Es probable que la alta excreción de este metabolito de manera general en todas las dietas de películas comestibles, se deba a un efecto metodológico más que biológico. Por esta razón, se recomienda la búsqueda de un método alternativo para la cuantificación del ácido úrico en películas a base de almidón y glicerol.

A diferencia de los almidones nativos, con las películas comestibles no se encontraron correlaciones entre los parámetros supervivencia, variación de peso y actividad similar α -amilasa y los parámetros de digestibilidad *in vitro* (como almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis). Sin embargo, el biomarcador excreción de ácido úrico correlacionó positivamente con la velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis de las películas crudas ($r_{Vi}= 0,795$; $r_{Mf}= 0,687$; $p < 0,05$; $n = 14$) y con el contenido de almidón disponible ($r = 0,792$; $p < 0,05$; $n = 21$), y negativamente con el contenido de almidón resistente total ($r = -0,688$; $p < 0,05$; $n = 21$). Interesantemente estas dos últimas correlaciones (con AD y ART) fueron opuestas a las encontradas entre estas mismas variables pero con las dietas de almidones nativos.

El contenido de almidón retrogradado correlacionó positivamente con la variación de peso ($r = 0,511$; $p < 0,05$; $n = 21$) y negativamente con la actividad similar a α -amilasa ($r = -0,688$; $p < 0,05$; $n = 21$) y la excreción de ácido úrico ($r = -0,491$; $p < 0,05$; $n = 21$). Es probable que las películas con mayores contenidos de almidón retrogradado presenten una textura más dura, aunque estos parámetros no correlacionaron de manera significativa. Una película comestible con las características de textura señaladas, podría favorecer una mayor ingesta de esta dieta por parte de los insectos, una mejor masticación y trituración del alimento, así como un incremento en su digestibilidad *in vivo*, lo que se reflejaría en

una disminución tanto de la actividad α -amilasa como de la excreción de ácido úrico y finalmente, en una mayor ganancia de peso en los insectos, como fue observado con la película de almidón de maíz regular en comparación a su contraparte cerosa.

Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón

Una de las desventajas de los análisis estadísticos univariados realizados separadamente para cada característica, es que pueden conducir a interpretaciones erróneas o incompletas de los resultados, puesto que se ignora la correlación o interdependencia entre cada una de las variables de estudio. En este sentido, el análisis de componentes principales como técnica estadística multivariada permite extraer la máxima información posible del conjunto de datos obtenidos en un determinado estudio (García, 2008). Esta técnica puede ser usada con distintos enfoques: (i) como análisis exploratorio que permita descubrir interrelaciones entre los datos y de acuerdo a los resultados, proponer los análisis estadísticos más apropiados, (ii) como técnica para simplificar y reducir la dimensionalidad de la matriz original de datos, (iii) como análisis para clasificar las unidades estadísticas y/o las variables dentro de grupos y subgrupos, y (iv) para la construcción de variables no observables (componentes principales) a partir de variables observables (González-Martín y col., 1994).

El análisis de PCA realizado con nueve variables sobre la digestibilidad del almidón (*in vitro* e *in vivo*) presente en las películas comestibles y en su forma nativa, permitió observar diferencias notables entre ambos grupos. La digestibilidad del almidón se vio reflejada principalmente en el CPI y los valores negativos de este componente denotaron

un aumento en la digestibilidad del almidón, ya que se asociaron con una baja actividad similar a α -amilasa, bajos contenidos de almidón resistente total, baja excreción de ácido úrico, mayor variación de peso y supervivencia en los insectos. Por otra parte, el CP2 reflejó el efecto de la formulación de la película y sus valores positivos se asociaron con menores contenidos de almidón disponible, una alta tasa de α -amilólisis en estado crudo y una elevada excreción de ácido úrico en los insectos. En conjunto, estas características resultaron comunes para el grupo de las películas comestibles (Figura 12). La mayor digestibilidad de las películas fue consecuencia del tratamiento térmico empleado para su elaboración, sin embargo, el menor contenido de almidón disponible y la mayor excreción de ácido úrico en los insectos, se debió a un efecto de la dilución del almidón y de los nutrientes en la solución formadora de película, respectivamente.

De acuerdo con el CP1, las películas comestibles formuladas a base de almidón de maíz regular y de ocumo chino resultaron más digeribles que las de almidón de maíz *waxy*. Por su parte, los almidones de papa y de mapuey presentaron la menor digestibilidad entre los almidones estudiados. Estas películas comestibles y almidones de menor digestibilidad, podrían ser utilizados en productos alimenticios bajos en fibra alimentaria o en la formulación de alimentos dirigidos a personas diabéticas o con problemas de peso.

Analizando el efecto combinado de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y la formulación de la película comestible, se obtuvo que, en la mayoría de los casos, la preparación de la película ocasionó un aumento de la digestibilidad del almidón, con la excepción de las películas formuladas a base de almidón de maíz *waxy* y de yuca. Este aumento de la digestibilidad se evidenció en el *biplot* como un desplazamiento de

estas réplicas hacia los valores negativos del CP1, el componente principal que definió la digestibilidad del almidón. Con los almidones de mapuey y de papa fue más evidente este aumento de la digestibilidad con la formulación de la película (Figura 12). Este efecto no ocurrió con las películas de almidón de maíz *waxy* y de yuca, posiblemente debido a la elevada excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con estas dos películas (Tabla 16).

El análisis de componentes principales ha resultado útil para comprender mejor como están relacionadas entre sí las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la molécula de almidón. Sandhu y col. (2008) utilizaron este análisis multivariado para comparar el comportamiento de cuatro almidones de maíz regular y un almidón de maíz *waxy* (nativos y oxidados). El PCA les permitió observar similitudes y diferencias entre los almidones, así como las interrelaciones entre un total de 19 variables medidas. Los investigadores obtuvieron que los dos primeros componentes principales explicaban el 88,7% del total de la variabilidad, por lo que el *biplot* obtenido al graficar estos dos componentes proveía información con respecto a las propiedades fisicoquímicas y reológicas de estos almidones. Como era de esperar, los almidones de maíz regular y ceroso se comportaron de manera muy diferente en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, térmicas y reológicas, y en el *biplot*, las réplicas del almidón de maíz *waxy* quedaron separadas y ubicadas hacia el extremo opuesto de las réplicas de los almidones de maíz regular. En el presente estudio, el análisis de las variables nutricionales permitió observar diferencias en la digestibilidad del almidón entre las películas comestibles a base de almidón de maíz (regular y *waxy*), pero no así entre sus respectivos almidones nativos. En el CP1, la película de almidón de maíz regular fue más digerible que la de almidón de maíz *waxy* (Figura 12) y en el CP3, la

variable contenido de almidón retrogradado, la cual resultó independiente de las demás variables de estudio, permitió separar la película de almidón de maíz regular de su contraparte cerosa.

Del mismo modo, Lugo-González y col. (2014) emplearon este análisis multivariado para valorar la calidad nutricional de la dieta (arvejas verdes peladas, agar al 4%, glucosa al 5% en agar al 4%, almidón de maíz regular y almidón de papa), utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L. En un estudio con 12 variables entre ellas la supervivencia, la variación de peso y los parámetros de la composición corporal del insecto, los autores encontraron que los primeros dos componentes principales explicaban el 61,5% del total de la variabilidad. Estos investigadores reportaron correlaciones positivas con el CP1 de las variables supervivencia, variación de peso, grasa corporal y los diferentes carbohidratos determinados (glucosa, trehalosa y glucógeno). También encontraron que los autovectores de las variables supervivencia y variación de peso correlacionaban positivamente entre sí, lo que indicaba que las poblaciones de insectos que tenían mayor peso corporal poseían una mayor probabilidad de supervivencia y/o que los individuos que sobrevivían durante el bioensayo incrementaban su talla o peso corporal. Resultados similares con estas variables fueron obtenidos en el presente trabajo. Además, Lugo-González y col. (2014) reportaron un aumento de peso en los insectos alimentados con los almidones de maíz regular y de papa, probablemente debido a la acreción grasa, dado que la variable grasa corporal también correlacionó positivamente con el CP1. No obstante, en el presente trabajo los almidones de maíz regular y de papa presentaron una ubicación opuesta en el *biplot*, en relación con los autovectores de las variables

supervivencia y variación de peso (Figura 12), lo que sugiere notables diferencias en la digestibilidad de estos almidones.

Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles

El efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica en la formulación de las películas comestibles, plastificadas con glicerol, fue evaluado sobre sus propiedades físicas, mecánicas, de barrera y nutricionales; analizando un total de 19 variables. El CP1 englobó las propiedades de barrera, las físicas y la digestibilidad de las películas. El CP2 por su parte, reflejó las propiedades mecánicas y la actividad de agua de las películas comestibles. El CP3 aportó información sobre el contenido de almidón retrogradado, la fracturabilidad y la dureza, variables que se relacionan con el envejecimiento de la película.

Los valores positivos del CP1 se asociaron con películas comestibles más delgadas, muy solubles e intolerantes al agua, muestras que tienen una elevada capacidad para retener un gran volumen de agua en el interior de su matriz, lo que promueve la pérdida rápida de su integridad estructural en soluciones acuosas. Estas características a su vez, se asociaron con una mayor digestibilidad *in vitro* del almidón, al presentar mayores contenidos de almidón disponible y magnitudes finales de hidrólisis en estado crudo, junto con una muy baja fracción de almidón resistente total y retrogradado, como las películas a base de almidón de maíz *waxy* y de yuca. Por su transparencia, reflejada en un elevado cambio total del color y bajo índice de blanco, estas películas podrían ser empleadas como coberturas de frutas y hortalizas frescas, sin que se afecte las propiedades naturales de

estos alimentos, mientras que por su muy alta solubilidad, serían ideales como recubrimientos de productos alimenticios que van a ser cocinados. Este tipo de material también podría utilizarse como empaque flexible o sobre tipo *sachet*, con alimentos secos o de muy baja humedad, pero se recomienda mejorar su capacidad como barrera al vapor de agua para así evitar o disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y el medio circundante.

Las películas de almidón de ocumo chino, mapuey, maíz regular y papa resultaron ser más gruesas, resistentes y tolerantes al agua, lo que refleja el potencial de estas formulaciones para ser usadas como coberturas de productos de alta humedad, frutas frescas cortadas o alimentos congelados, para disminuir su exudación y conferirles mayor estabilidad y funcionalidad (Lee y col., 2004). Sin embargo, serían un material deficiente como barrera al vapor de agua. No obstante, la baja digestibilidad *in vitro* las hace ideales para cubrir alimentos bajos en fibra alimentaria, siendo el almidón resistente en la película, un valor agregado que contribuiría a aumentar los contenidos de fibra del alimento que recubre.

Además, entre las películas resistentes y tolerantes al agua, fue posible encontrar materiales con diferentes propiedades de textura y estabilidad en condiciones de almacén, lo que amplía mucho más sus aplicaciones. Por ejemplo, los valores positivos del CP2 se asociaron con películas comestibles muy poco adhesivas, más duras y fracturables, como las películas de almidón de mapuey y de ocumo chino. La correlación negativa con el CP2 de la variable magnitud final de hidrólisis en estado crudo, sugiere que estas películas serían menos susceptibles a la hidrólisis enzimática *in vitro*. Además, los valores positivos del CP2 también se asociaron con una mayor actividad de agua, lo que sugiere la necesidad

de incorporar a la formulación de la película, un componente con propiedades antimicrobianas como el quitosano, que aumente la estabilidad de las películas de almidón de mapuey y de ocumo chino durante su almacenamiento (Valenzuela y Arias, 2012).

A diferencia de las correlaciones simples, con la estadística multivariada fue posible observar una relación entre el contenido de almidón retrogradado y las propiedades mecánicas de las películas (fracturabilidad y dureza). El análisis del CP3 indicó que las películas comestibles con elevados contenidos de almidón retrogradado como la de almidón de maíz regular, fueron más fracturables y duras. La variable contenido de almidón retrogradado también correlacionó negativamente con el CP1. La asociación de los valores negativos del CP1 con películas de menor digestibilidad *in vitro* del almidón, guarda relación con los altos contenidos de almidón resistente total encontrados en dichas películas comestibles, en algunos casos, no por un aumento del almidón retrogradado *per se* sino más bien, por un aumento de las fracciones intrínsecamente resistentes (AR2), puesto que estas películas comestibles no fueron las que presentaron los mayores contenidos de almidón retrogradado, con la excepción de la película de almidón de maíz regular (Tabla 12).

En general, las variables medidas para evaluar la digestibilidad *in vivo* de las películas comestibles, resultaron independientes del resto de las variables estudiadas o aportaron información contradictoria en comparación con la digestibilidad *in vitro* de estas preparaciones. Por ejemplo, a diferencia de Lugo-González y col. (2014) y de lo obtenido en el PCA para evaluar el efecto combinado de la fuente botánica del almidón como matriz polímera y de la formulación de la película comestible sobre la digestibilidad del almidón, los autovectores de las variables supervivencia y variación de peso de los insectos al día 8,

correlacionaron negativamente entre sí, lo que sugiere que una mayor ganancia de peso hizo que los insectos sobrevivieran menos. Debido a este comportamiento de las variables *in vivo* estudiadas, se recomienda evaluar la utilización de otros parámetros como posibles biomarcadores de la digestibilidad *in vivo* del almidón constituyente de las películas comestibles, entre ellos, los parámetros de la composición corporal del insecto, como la grasa corporal y el tenor de los combustibles (glucosa, trehalosa y glucógeno).

El estudio de las películas comestibles a base de almidón, abordado desde un punto de vista integral a través del análisis de sus propiedades físicas, químicas, mecánicas, de barrera, morfológicas y nutricionales, confiere ventajas con respecto a aquellos trabajos que se concentran en dilucidar el comportamiento de las películas, frente a algunas de estas propiedades analizadas separadamente. La principal ganancia en este tipo de enfoque multifactorial, es que permite comprender mejor el funcionamiento de una película comestible con relación a su estructura y composición química, es decir, la interacción entre el plastificante y el almidón como matriz polimérica, y con base a ello, disponer de las herramientas para optimizar las formulaciones y condiciones de su preparación y así adaptar estos nuevos biomateriales a las necesidades y gustos del consumidor.

Las tecnologías emergentes basadas en películas y recubrimientos comestibles han sido aplicadas tanto en productos de origen vegetal (Quintero y col., 2010) como animal (Valenzuela y Arias, 2012), buscando no solo extender la vida útil de los alimentos al mantener su calidad, sino también, tratando de generar un valor agregado con estos biomateriales (Quintero y col., 2010). En este sentido, este tipo de estudio permite

determinar las bondades y limitaciones de estos materiales y con ello, orientar al investigador sobre sus potenciales aplicaciones tecnológicas más allá de su utilización como empaques y coberturas de alimentos, dado que una caracterización de sus atributos nutricionales abriría la posibilidad de novedosos e interesantes usos como materiales termoplásticos comestibles, biodegradables, económicos y de gran versatilidad, que beneficien la salud de los consumidores.

VIII. Conclusiones

1. Tomando en consideración la composición química, especialmente su bajo contenido de proteínas y lípidos, todos los almidones aislados presentaron un muy alto grado de pureza, entre 99–100%.
2. En los almidones se encontraron contenidos de almidón disponible mayores a 91% (excepto el almidón de papa) y fracciones variables de almidón resistente total (1,1–56%), lo que se correspondió con el patrón de difracción de rayos X reportado para estos almidones nativos. Las tasas de α -amilólisis *in vitro* de los almidones crudos fueron muy bajas (2,6–11%) y estas aumentaron con el proceso de gelatinización (67–91%).
3. Los almidones de mayor digestibilidad y, por tanto, de mayor calidad nutricional de acuerdo a los parámetros *in vitro* e *in vivo* estudiados, 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 contenido muy elevado de almidón resistente total. La baja supervivencia y la pérdida de peso encontrada en los insectos alimentados con estas dietas, sugiere una baja biodisponibilidad de estos almidones en su estado crudo.
4. El almidón de maíz *waxy* resultó ser más digerible que el almidón de maíz regular, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*.
5. Se formularon satisfactoriamente películas comestibles a base de almidón de maíz regular, 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. Las películas de almidón de yuca y de maíz *waxy* fueron las más delgadas, transparentes y con mejores propiedades de barrera al vapor de agua, sin embargo, fueron altamente solubles y tolerantes al agua.
7. Desde el punto de vista de la digestibilidad del almidón, las películas comestibles presentaron contenidos variables de almidón disponible (58–70%), almidón resistente total (1,1–11,8%) y almidón retrogradado (0,06–2,86%), junto con una cinética de hidrólisis elevada como consecuencia del tratamiento térmico empleado para la preparación de la película.
8. *In vitro*, 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, una menor fracción resistente (total y retrogradado) y una mayor cinética de hidrólisis, tanto en su estado crudo como gelatinizado. Sin embargo, *in vivo* fueron menos digeribles.
9. La supervivencia y la variación de peso no fueron biomarcadores apropiados para evidenciar mayores 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. Las propiedades de textura de las películas y algunos factores extrínsecos al alimento como la ingesta y el grado de masticación, pudieran afectar su digestibilidad *in vivo* y por lo tanto, su biodisponibilidad.
10. El efecto combinado de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón, se evidenció en una disminución de la actividad similar a α -amilasa, de la excreción de ácido úrico, del contenido de almidón disponible y de la fracción de almidón

resistente total y en un aumento de la magnitud final de hidrólisis en estado crudo, de la ganancia de peso y de la supervivencia de los insectos, variables que caracterizaron a todas las películas comestibles en comparación con los almidones nativos, con la excepción de las películas de almidón de maíz *waxy* y de yuca, películas que promovieron en el insecto una elevada excreción de ácido úrico.

11. El efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles, se observó en las propiedades de barrera, físicas, mecánicas y en la digestibilidad *in vitro* de las películas, lo que sugiere múltiples aplicaciones de estas preparaciones en el área de tecnología de alimentos.

IX. Recomendaciones

1. Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento de las películas comestibles a base de almidón y glicerol, sobre su digestibilidad *in vitro* e *in vivo* y relacionarlo con sus propiedades microestructurales.
2. Estudiar el efecto del glicerol sobre la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de las películas comestibles a base de almidón.
3. Evaluar el efecto prebiótico de las películas comestibles con elevados contenidos de almidón resistente total, sobre la acreción grasa del insecto.
4. Evaluar las formulaciones caracterizadas empleándolas como empaques y/o coberturas comestibles de alimentos.

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.
- Aboubakar, Njintang, Y. N., Scher, J., Mbofung, C. M. F. 2008. Physicochemical, thermal properties and microstructure of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flours and starches. *Journal of Food Engineering*, **86**: 294-305.
- 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.
- Brewer, R. L., Cai, L. y Shi, Y.-C. 2012. Mechanism and enzymatic contribution to *in vitro* test method of digestion for maize starches differing in amylose content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 4379–4387.
- 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.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V. y Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, **23**: 85–112.
- Cai, L. y Shi, Y.-C. 2014. Preparation, structure, and digestibility of crystalline A- and B-type aggregates from debranched waxy starches. *Carbohydrate Polymers*, **105**: 341-350.
- Cai, J., Cai, C., Man, J., Zhou, W. y Wei, C. 2014. Structural and functional properties of C-type starches. *Carbohydrate Polymers*, **101**: 289–300.
- 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. Págs, 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., Villaruel, 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. y 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., Buleon, A. y Lemarie, F. 1988. Action of *Bacillus subtilis* α -amylase on native wheat starch. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**: 895–904.
- 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.
- Gabriel, K. R. 1971. The biplot graphic display of matrices with application to PCA. *Biometrika*, **58**: 453–467.
- 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., Szyllit, 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, 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, H. 2008. Que es análisis estadístico multivariado. *Revista SIGMA*, **7**: 33–39. <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rsigma/article/view/115/123>. Acceso: 18 de marzo de 2015.

- 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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-Martín, P., Díaz de Pascual, A., Torres-Lezama, E. y Garnica-Olmos, E. 1994. Una aplicación del análisis de componentes principales en el área educativa. *Revista Económica*, **9**: 55–72.
- 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.
- Gutiérrez, T. J. 2013. Propiedades físicas, químicas y microestructurales de películas comestibles a base de almidón de mapuey y yuca. Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Gutiérrez, T. J., Pérez, E., Guzmán, R., Tapia, M. S. y Famá, L. 2014. Physicochemical and functional properties of native and modified by crosslinking, dark-cush-cush yam (*Dioscorea trifida*) and cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, **2**: 1–5.
- Gutiérrez, T. J., Morales, N. J., Pérez, E., Tapia, M. S. y Famá, L. 2015a. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches. *Food Packaging and Shelf Life*, **3**: 1–8.
- Gutiérrez, T. J., Tapia, M. S., Pérez, E. y Famá, L. 2015b. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloids*, **45**: 211–217.
- Gutiérrez, T. J., Tapia, M. S., Pérez, E. y Famá, L. 2015c. Edible films based on native and phosphated 80:20 waxy: normal corn starch. *Starch/Stärke*, **67**: 90–97.

- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**: 1–9.
- Hammer, Ø. 2015. PAST: Paleontological statistics, version 3.05. Reference manual. <http://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>. Acceso: 19 de febrero de 2015.
- 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.
- Härdle, W. K. y Simar, L. 2012. **Applied multivariate statistical analysis** (3.^a ed.) Springer. Nueva York.
- 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.
- Hasjim, J., Ai, Y. y Jane, J. 2013. Novel applications of amylose lipid complex as resistant starch type 5. Págs. 79–94 en: Shi, Y. y Manigant, C. (eds.), **Resistant starch: applications and health benefits**. Wiley Blackwell. Chichester, West Sussex, UK.
- Hemlata, M. K., Bhide, A. J., Gupta, V. S. y Giri, A. P. 2012. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene*, **501**: 1–7.
- 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.
- 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.
- Hickey, D. A. y 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.). MacGraw-Hill/Interamericana. Madrid. 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. y 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.
- Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M. y Kasemsuwan, T. 2007. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemists*, **76**: 629–637.
- 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.
- Jay, J. 1996. **Modern Food Microbioly** (5.^a ed.). Champan & Hall Pub. Nueva York.
- 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.
- Kampeerapappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D. y Srikulkit, K. 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*, **67**: 155–163.
- Kaushal, P., Kumar, V. y Sharma, H. K. 2013. Utilization of taro (*Colocasia esculenta*): a review. *Journal of Food Science and Technology*, **52**: 27–40.
- 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.
- Laohakunjit, N. y Noomhorm, A. 2004. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch/Stärke*, **56**: 348–356.
- 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., 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.
- Laurentin, A. y Edwards, C. A. 2013. Fiber: Resistant starch and oligosaccharides. Págs. 246-253, en: Caballero, B. (ed.), **Encyclopedia of Human Nutrition** (3.^a ed.). Academic Press. Waltham, MA.

- Laurentin, A., González-Quilen, C., Martín V., Marín, J. G., Guzmán, R., Pérez, E. y Edwards, C. A. 2014a. ¿Qué puede decirnos el gorgojo de arroz sobre la digestibilidad de los alimentos farináceos? *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **7**: 93–96.
- Laurentin, A., Lovera, M., Lugo, D., Suárez-Villasmil, L., Casotto, M., Gómez, A. y Carmona, A. 2014b. Uso del análisis de componentes principales en estudios nutricionales usando el gorgojo de arroz como modelo. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **7**: 101–104.
- Lawton, J. W. 1996. Effect of starch type on the properties of starch containing films. *Carbohydrate Polymers*, **29**: 203–208.
- 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.
- Legendre, P. y Legendre, L. 2012. **Numerical Ecology** (3.^a ed.). Elsevier. Oxford.
- 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.
- Li, M., Witt, T., Xie, F., Warren, F. J., Halley, P. J. y Gilbert, R. G. 2015. Biodegradation of starch films: the roles of molecular and crystalline structure. *Carbohydrate Polymers*, **122**: 115–122.
- 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, H. W., Levrat-Verny, M. A., Coudray, C., Besson, C., Krespine, V., Messager, 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.
- López, Y. 1999. Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Lovera, M. 2008. Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- 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.
- Lovera, M. 2014. Evaluación fisicoquímica y nutricional de películas comestibles a base de almidón. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesora Asistente, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Lugo-González, D., Hugo-Aguilar, V., Casotto, M., Laurentin, A. y Gómez, A. 2013. Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **63**: 232–239.

- Magoulas, C., Bally-Cuif, L., Loverre-Chyurlia, A., Benkel, B. y 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.
- 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 xanthorrhiza*). 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Medina, O. J., Pardo, O. H. y Ortiz, C. A. 2012. Modified arracacha starch films characterization and its potential utilization as food packaging. *Vitae*, **19**: 186–196.
- 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.
- Naguleswaran, S., Li, J., Vasanthan, T. y Bressler, D. 2011. Distribution of granule channels, protein, and phospholipid in triticale and corn starches as revealed by confocal laser scanning microscopy. *Cereal Chemistry*, **88**: 87–94.
- Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover R. y Bressler, D. 2013. The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starches toward amylolysis at sub-gelatinization temperatures. *Food Research International*, **51**: 771–782.
- 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**: 139–144.
- 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.
- Quintero, C. J., Falguera, V., Muñoz, H. A. 2010. Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, **5**: 3-118.
- 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.
- Rindlav, A., Hullerman, S. H. D. y Gatenholm, P. 1997. Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, **34**: 25–30.
- Rindlav-Westling, A., Stading, M., Hermansson, A.-M. y Gatenholm, P. 1998. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, **36**: 217–224.
- 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, 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.

- 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.
- Romero-Bastidas, C., Bello-Pérez, L., García, M., Martino, M., Solorza-Feria, J. y Zaritzky, N. 2005. Physicochemical and microestructural 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.
- Sandhu, K. S., Kaur, M., Singh, N. y Lim, S.-T. 2008. A comparison of native and oxidized normal and waxy corn starches: physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT - Food Science and Technology*, **41**: 1000–1010.
- 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. Physic-chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, **49**: 63–70.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L. y Mañas, E. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *Journal of Food Science*, **58**: 642–643.
- Schoch, T. J. 1964. Fatty acids substances in starch. Págs. 56–61 en: Whistler R. L. (ed), **Methods in Carbohydrates Chemistry**. Academic Press. Nueva York.
- 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.
- Simsek, S. y El, S. N. 2012. Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm and determination of its effects on health by *in vitro* methods. *Carbohydrate Polymers*, **90**: 1204–1209.
- Simsek, S. y El. S. N, 2015. *In vitro* starch digestibility, estimated glycemic index and antioxidant potential of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm. *Food Chemistry*, **168**: 257–261.
- Singh, J., Kaur, 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. Págs. 15–46 en: **Starch conversion Technology** (Ed). GMA. Marcel Dekker, Inc.
- 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.
- Terrádez, M. 2002. Análisis de componentes principales. http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf. Acceso: 18 de febrero de 2015.
- 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.-G. 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 retrodegradation. 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. Págs. 1–10 en: Pandalai, S. G. (ed.), **Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry, Vol. 3**. Research Singpost. Trivandrum.

- 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 Ltda. 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.
- Valenzuela, C. V. y Arias, J. I. 2012. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias*, **27**: 33–47.
- Van Hung, P., Huynh, T. C., Nguyen, T. L. P. 2015. *In vitro* digestibility and *in vivo* glucose response of native and physically modified rice starches varying amylose contents. *Food Chemistry*, [En Prensa].
- 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.
- You, S.-Y., Lim, S.-T., Lee, J. H. y Chung, H.-J. 2014. Impact of molecular and crystalline structures on *in vitro* digestibility of waxy rice starches. *Carbohydrate Polymers*, **112**: 729–735.
- 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. y Hamaker, B. R. 2012. Banana starch structure and digestibility. *Carbohydrate Polymers*, **87**: 1552–1558.
- Zhou, X. y Lim, S.-T. 2012. Pasting viscosity and *in vitro* digestibility of retrograded waxy and normal corn starch powders. *Carbohydrate Polymers*, **87**: 235–239.
- 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.

XI. Anexos

Anexo A: Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica y de la formulación de las películas comestibles sobre la digestibilidad del almidón.

Tabla 1A. Autovalores, varianza total y varianza acumulada para los nueve componentes principales.

Componente Principal	Autovalores	Varianza total (%)	Varianza acumulada (%)
1	4,040	44,890	44,890
2	2,101	23,343	68,233
3	1,095	12,171	80,404
4	0,840	9,333	89,737
5	0,311	3,460	93,196
6	0,253	2,807	96,003
7	0,160	1,777	97,780
8	0,134	1,485	99,265
9	0,066	0,735	100,000

Tabla 2A. Coeficientes de correlación de las nueve variables seleccionadas con cada uno de los componentes principales.

Variables	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9
AD	0,322	-0,845	-0,189	-0,032	0,048	0,364	0,099	0,030	-0,011
ART	0,883	-0,118	0,172	-0,008	0,341	-0,158	0,060	0,165	-0,071
AR3	-0,173	-0,119	0,964	0,057	0,067	0,092	0,030	-0,097	0,026
Mf_{cr}	-0,366	0,836	-0,049	0,123	0,233	0,269	-0,128	0,083	0,006
Mf_{gel}	0,458	-0,059	-0,047	0,883	-0,059	-0,012	-0,005	-0,022	0,001
Sd8	-0,837	-0,266	-0,259	0,112	0,325	-0,104	0,097	-0,102	0,115
VPd8	-0,921	0,009	0,146	0,122	-0,148	-0,016	0,166	0,255	0,041
ASA	0,964	0,053	0,043	-0,103	-0,045	0,006	-0,058	0,072	0,213
EAU	0,554	0,763	-0,079	-0,050	-0,025	0,061	0,299	-0,092	-0,001

Variables: almidón disponible (AD), almidón resistente total (ART), almidón retrogradado (AR3), magnitud final de hidrólisis en estado crudo y gelatinizado (Mf_{cr} y Mf_{gel}), supervivencia de los insectos al día 8 (Sd8), variación de peso en los insectos al día 8 (VPd8), actividad similar a α -amilasa (ASA) y excreción de ácido úrico (EAU). CP: componente principal.

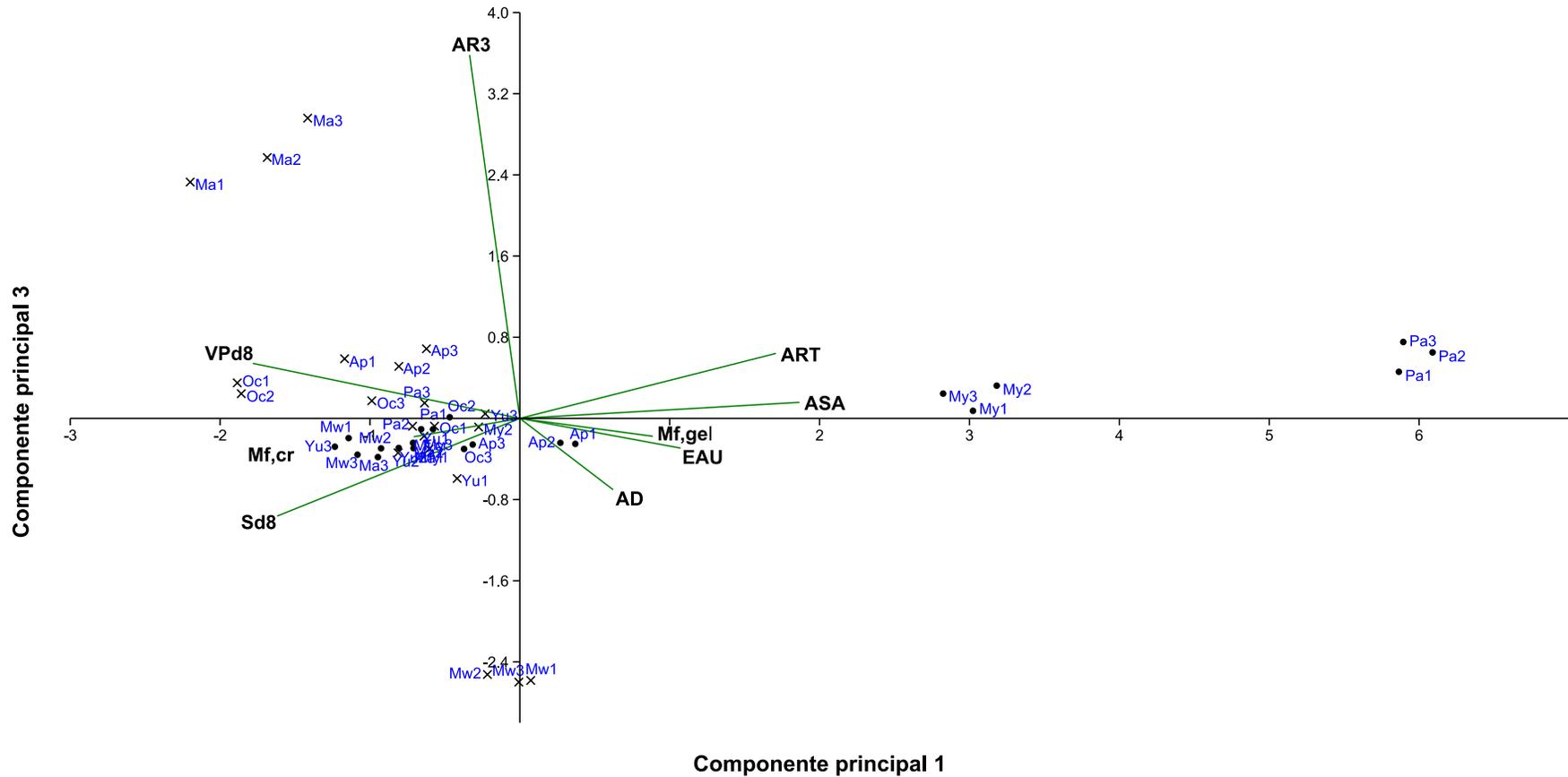


Figura 1A. Biplot del análisis de componentes principales de las películas comestibles y sus respectivos almidones nativos.

Las siete películas comestibles y sus respectivos almidones nativos (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los componentes principales uno y tres, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. Fuente botánica: **Ma**: maíz regular; **Mw**: maíz *waxy*; **My**: mapuey; **Yu**: yuca; **Ap**: apio; **Oc**: ocumo chino y **Pa**: papa. Almidones (●) y películas comestibles (×). Variables: almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf_{cr}** y **Mf_{gel}**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

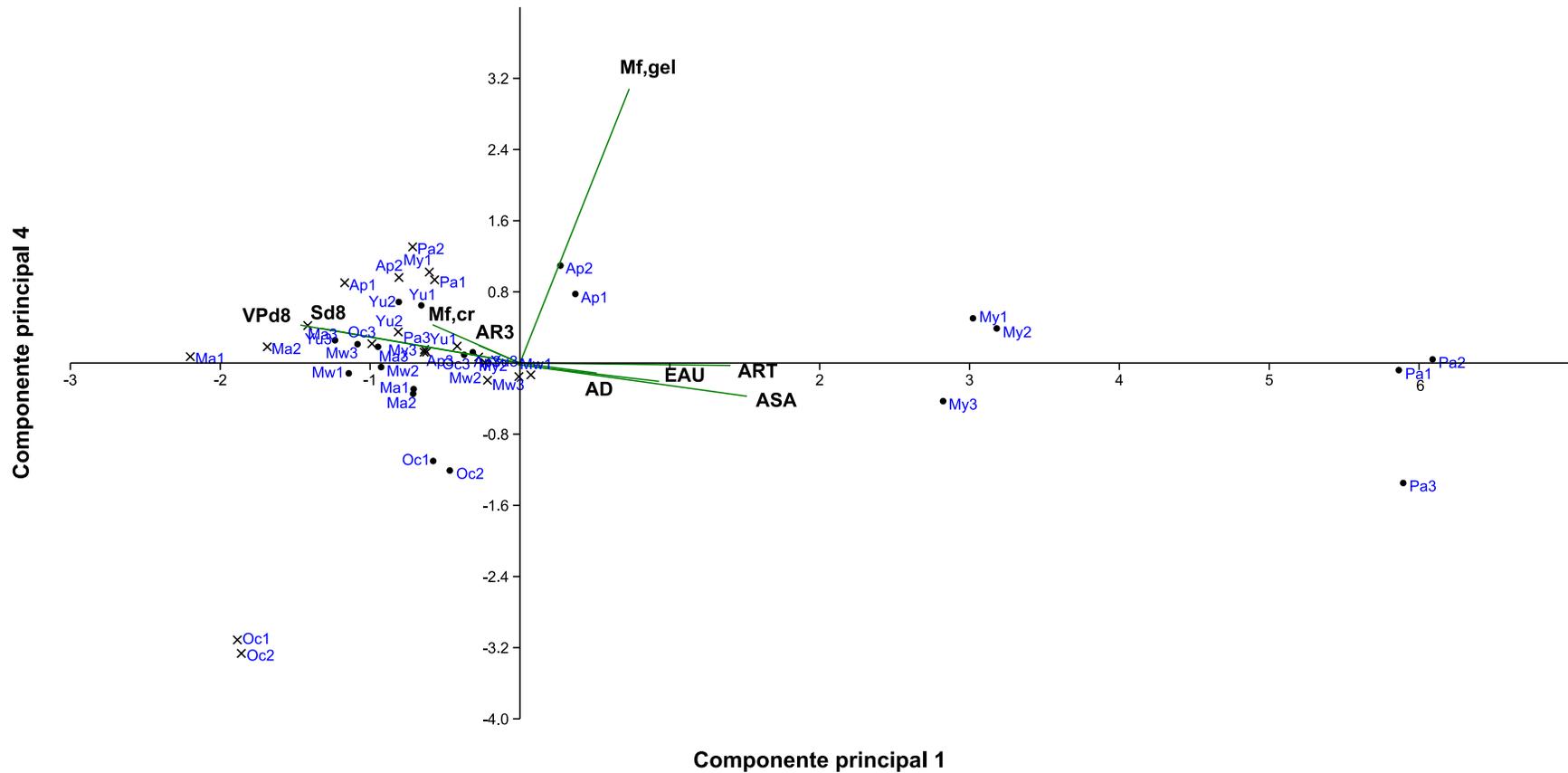


Figura 2A. Biplot del análisis de componentes principales de las películas comestibles y sus respectivos almidones nativos.

Las siete películas comestibles y sus respectivos almidones nativos (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los componentes principales uno y cuatro, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. Fuente botánica: **Ma**: maíz regular; **Mw**: maíz *waxy*; **My**: mapuey; **Yu**: yuca; **Ap**: apio; **Oc**: ocumo chino y **Pa**: papa. Almidones (•) y películas comestibles (x). Variables: almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf**, **cr** y **Mf**, **gel**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

Anexo B: Efecto de la fuente botánica del almidón como matriz polimérica sobre las propiedades de las películas comestibles.

Tabla 1B. Autovalores, varianza total y varianza acumulada para los 19 componentes principales.

Componente Principal	Autovalores	Varianza total (%)	Varianza acumulada (%)
1	7,929	41,731	41,731
2	3,453	18,174	59,905
3	2,636	13,875	73,780
4	1,672	8,802	82,582
5	1,197	6,302	88,880
6	0,655	3,449	92,334
7	0,472	2,485	94,819
8	0,324	1,708	96,526
9	0,251	1,320	97,846
10	1,145	0,761	98,608
11	0,090	0,473	99,080
12	0,072	0,378	99,458
13	0,044	0,233	99,691
14	0,030	0,156	99,847
15	0,015	0,078	99,926
16	0,010	0,052	99,978
17	0,003	0,015	99,993
18	0,002	0,008	100,000
19	0,000	0,000	100,000

Tabla 2B. Coeficientes de correlación de las 19 variables seleccionadas con cada uno de los componentes principales.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18	CP19
Gro	-0,807	0,183	-0,246	-0,111	0,024	0,172	0,306	0,427	-0,093	0,114	-0,034	0,076	0,019	-0,025	0,013	0,001	0,002	0,003	0,004
PVA	-0,918	0,045	-0,159	0,051	-0,016	-0,296	0,102	-0,105	0,026	0,033	0,086	0,037	0,007	0,014	0,081	-0,027	-0,003	0,010	0,001
Aw	0,141	0,761	-0,509	0,112	-0,031	-0,076	0,187	0,123	0,241	-0,024	-0,068	-0,076	-0,013	0,058	0,014	0,022	-0,009	-0,005	-0,004
SA	0,976	-0,014	0,045	-0,043	-0,076	0,034	-0,017	0,014	-0,008	0,135	0,015	-0,019	-0,122	0,023	0,023	0,019	0,025	0,011	-0,007
RA	0,904	-0,030	0,136	-0,223	0,227	-0,162	-0,088	-0,042	-0,011	0,121	0,006	0,086	0,045	0,005	0,035	0,035	-0,004	-0,021	0,008
ΔE	0,857	0,373	0,278	-0,001	0,085	0,160	-0,083	0,053	-0,003	-0,047	-0,033	-0,018	0,014	0,001	0,032	-0,040	0,001	-0,002	0,000
IB	-0,857	-0,374	-0,277	0,003	-0,086	-0,160	0,083	-0,053	0,003	0,046	0,033	0,018	-0,015	0,000	-0,032	0,041	-0,001	0,002	0,000
Dur	-0,268	0,770	0,391	0,046	0,367	0,045	-0,092	-0,116	-0,006	0,084	-0,035	0,093	-0,022	0,057	-0,032	-0,032	-0,016	0,014	-0,009
Fra	-0,317	0,594	0,656	0,004	0,088	0,040	0,167	0,030	-0,231	-0,009	0,088	-0,125	0,012	-0,008	0,015	0,032	-0,005	-0,001	-0,004
Adh	0,180	-0,886	0,125	0,181	0,020	0,280	-0,187	0,084	0,083	-0,009	0,039	-0,034	-0,010	0,022	0,032	0,024	-0,028	0,008	-0,010
AD	0,862	0,396	-0,084	-0,155	0,062	0,030	0,129	-0,011	0,107	-0,134	0,047	0,084	0,013	-0,091	0,006	0,029	-0,002	0,015	-0,001
ART	-0,691	0,282	-0,011	0,503	0,282	0,141	-0,216	0,051	0,092	-0,115	0,124	0,044	-0,013	0,021	0,003	0,012	0,021	-0,009	-0,003
AR3	-0,523	-0,361	0,673	-0,303	0,074	0,045	0,069	-0,008	0,142	-0,033	-0,089	-0,009	0,091	0,040	0,013	0,019	0,022	0,009	-0,002
Mf,cr	0,588	-0,552	0,116	0,304	0,231	-0,159	0,300	0,125	-0,162	-0,148	-0,033	0,077	-0,033	0,057	0,000	-0,002	-0,001	0,000	-0,006
Mf,gel	0,118	-0,192	0,177	0,873	0,289	0,020	0,179	-0,052	0,082	0,145	-0,056	-0,026	0,025	-0,064	0,000	-0,005	0,003	0,000	0,004
Sd8	-0,081	-0,186	-0,594	-0,344	0,397	0,472	0,275	-0,169	-0,021	0,035	0,043	-0,004	0,006	0,020	0,004	-0,008	0,003	-0,004	0,004
VPd8	-0,265	0,002	0,759	-0,048	-0,465	0,183	0,251	0,014	0,158	0,034	0,059	0,075	-0,052	-0,001	-0,007	-0,013	-0,006	-0,012	0,002
ASA	0,380	0,283	-0,289	0,462	-0,618	0,226	0,007	-0,125	-0,138	0,007	-0,019	0,056	0,075	0,039	0,011	0,017	0,004	0,004	-0,006
EAU	0,948	-0,076	-0,037	-0,006	0,007	-0,129	0,060	0,146	0,075	0,089	0,168	-0,023	0,083	0,041	-0,040	-0,019	0,002	0,007	0,000

Variables: grosor (Gro), permeabilidad al vapor de agua (PVA), actividad de agua (Aw), solubilidad en agua (SA), capacidad de retención de agua (RA), cambio total del color (ΔE), índice de blanco (IB), dureza (Dur), fracturabilidad (Fra), adhesividad (Adh), almidón disponible (AD), almidón resistente total (ART), almidón retrogradado (AR3), magnitud final de hidrólisis en estado crudo y gelatinizado (Mf_{cr} y Mf_{gel}), supervivencia de los insectos al día 8 (Sd8), variación de peso en los insectos al día 8 (VPd8), actividad similar a α -amilasa (ASA) y excreción de ácido úrico (EAU). CP: componente principal.

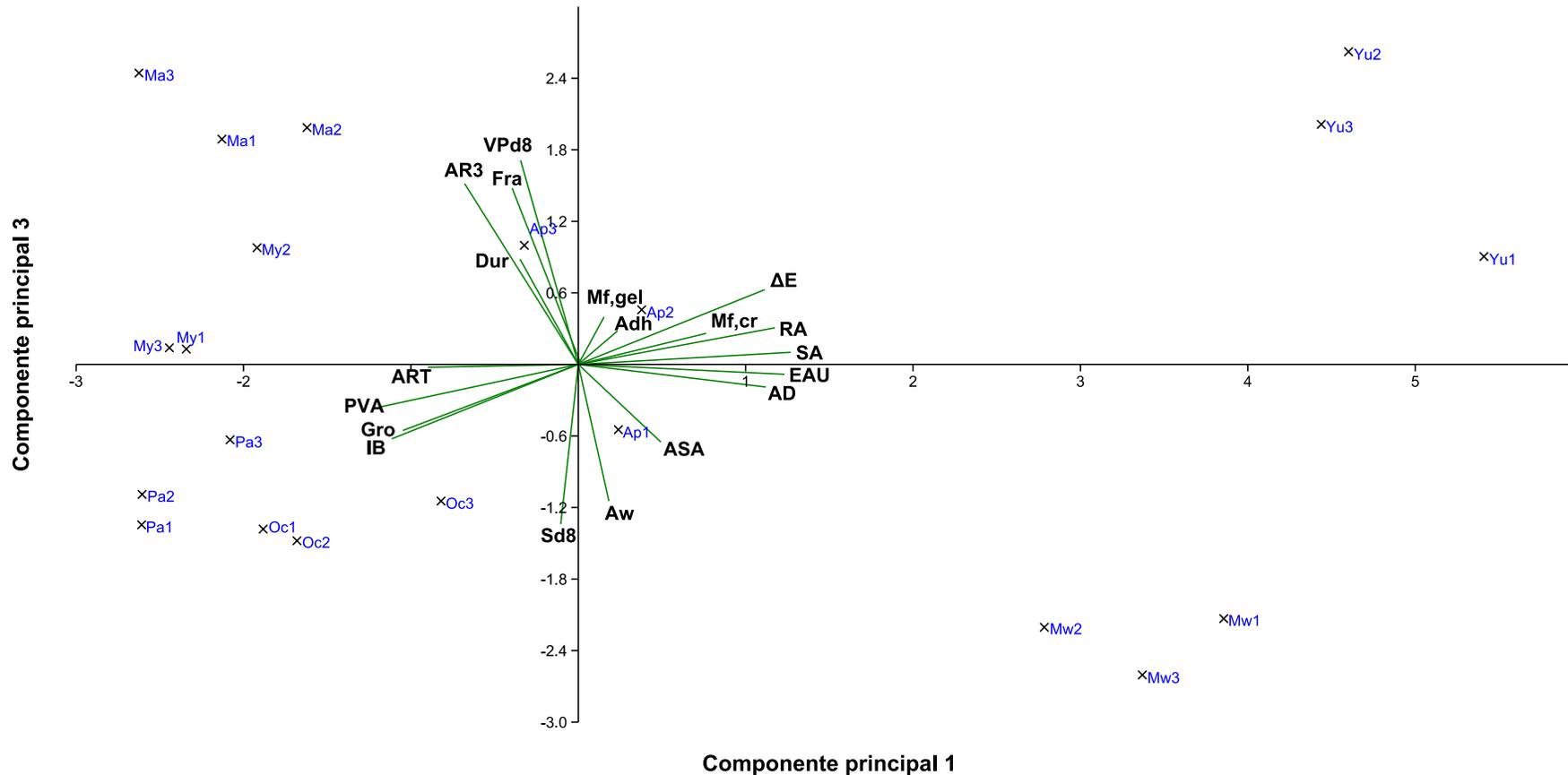


Figura 1B. Biplot del análisis de componentes principales realizado para las películas comestibles a base de almidón.

Las siete películas comestibles a base de almidón (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los componentes principales uno y tres, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. **Película:** **Ma:** maíz regular; **Mw:** maíz *waxy*; **My:** mapuey; **Yu:** yuca; **Ap:** apio; **Oc:** ocumo chino y **Pa:** papa. **Variables:** grosor (**Gro**), permeabilidad al vapor de agua (**PVA**); actividad de agua (**Aw**); solubilidad en agua (**SA**); capacidad de retención de agua (**RA**); cambio total del color (**ΔE**); índice de blanco (**IB**); dureza (**Dur**); fracturabilidad (**Fra**); adhesividad (**Adh**); almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf_{cr}** y **Mf_{gel}**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

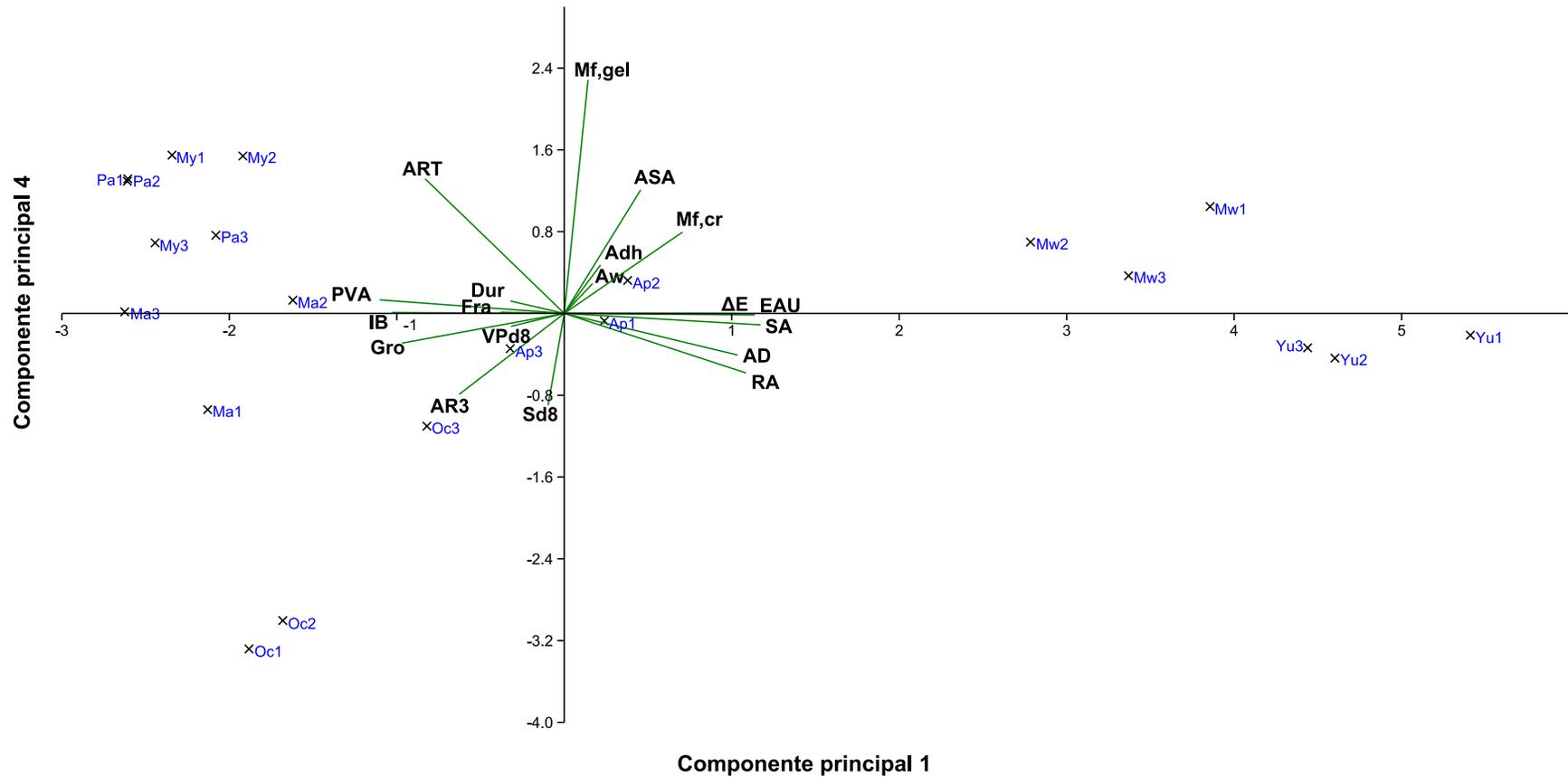


Figura 2B. Biplot del análisis de componentes principales realizado para las películas comestibles a base de almidón.

Las siete películas comestibles a base de almidón (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los componentes principales uno y cuatro, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. Película: **Ma**: maíz regular; **Mw**: maíz *waxy*; **My**: mapuey; **Yu**: yuca; **Ap**: apio; **Oc**: ocumo chino y **Pa**: papa. Variables: grosor (**Gro**), permeabilidad al vapor de agua (**PVA**); actividad de agua (**Aw**); solubilidad en agua (**SA**); capacidad de retención de agua (**RA**); cambio total del color (**ΔE**); índice de blanco (**IB**); dureza (**Dur**); fracturabilidad (**Fra**); adhesividad (**Adh**); almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf_{cr}** y **Mf_{gel}**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).

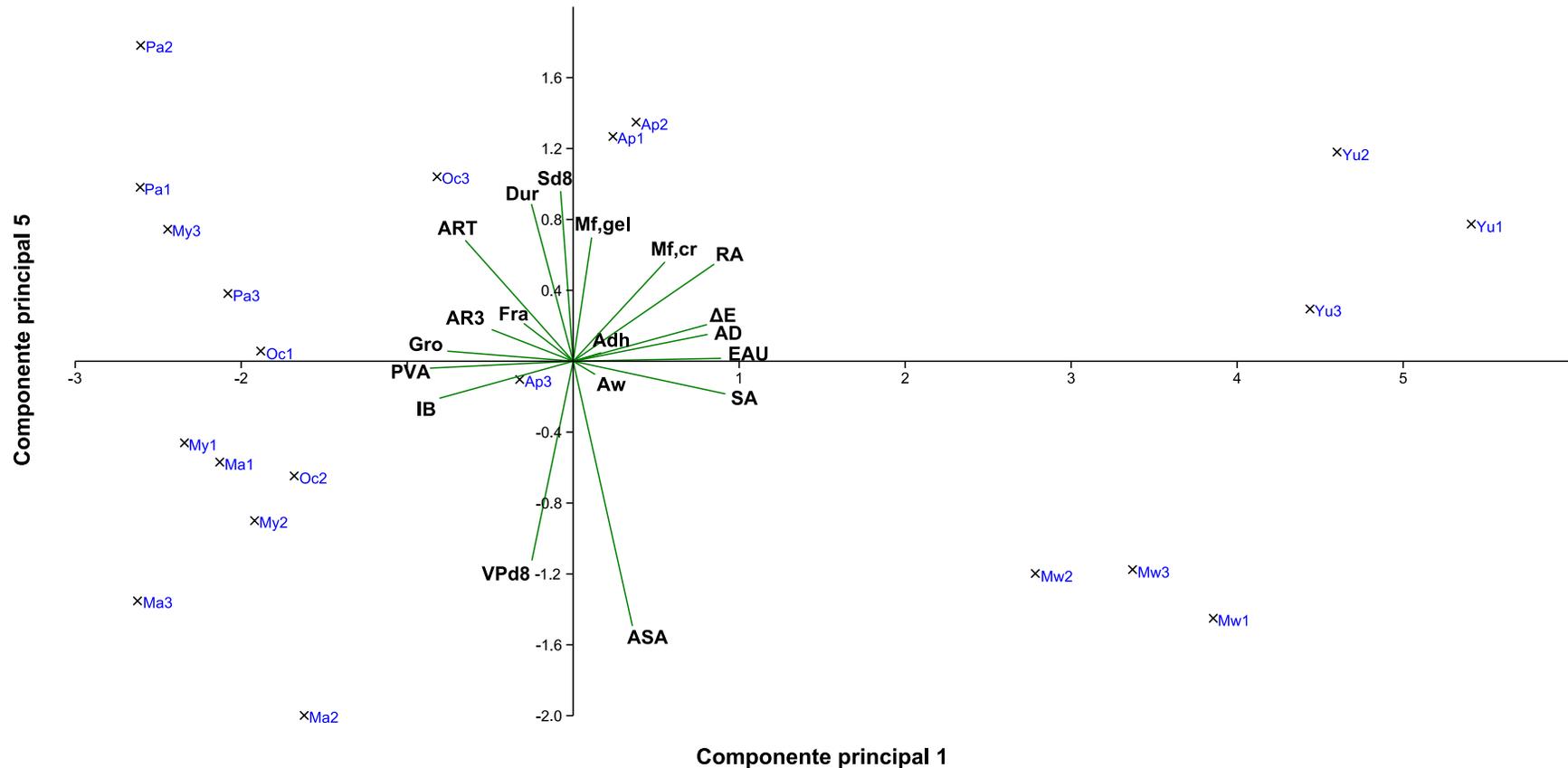


Figura 3B. Biplot del análisis de componentes principales realizado para las películas comestibles a base de almidón.

Las siete películas comestibles a base de almidón (por triplicado) se ubican según sus coordenadas en los componentes principales uno y cinco, junto con los autovectores de las variables seleccionadas. **Película:** **Ma:** maíz regular; **Mw:** maíz *waxy*; **My:** mapuey; **Yu:** yuca; **Ap:** apio; **Oc:** ocumo chino y **Pa:** papa. **Variables:** grosor (**Gro**), permeabilidad al vapor de agua (**PVA**); actividad de agua (**Aw**); solubilidad en agua (**SA**); capacidad de retención de agua (**RA**); cambio total del color (**ΔE**); índice de blanco (**IB**); dureza (**Dur**); fracturabilidad (**Fra**); adhesividad (**Adh**); almidón disponible (**AD**); almidón resistente total (**ART**); almidón retrogradado (**AR3**); magnitud final de hidrólisis, en estado crudo y gelatinizado (**Mf_{cr}** y **Mf_{gel}**); supervivencia de los insectos al día 8 (**Sd8**); variación de peso en los insectos al día 8 (**VPd8**); actividad similar a α -amilasa (**ASA**) y excreción de ácido úrico (**EAU**).