



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

**Modificación del almidón de yuca  
(*Manihot esculenta Crantz*) por metilación  
para aplicaciones en alimentos y  
biomedicina.**

**Trabajo Especial de Grado  
Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por la Br. CARABALLO DE MANNA  
DANIELA LUCIA, como requisito  
Para optar al Título  
Licenciada en Biología.**

**TUTORES: Dra. Elevina, Pérez.  
Dr. José, Álvarez**

**CARACAS, VENEZUELA  
Febrero 2011**

ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. DANIELA LUCIA CARABALLO DE MANNA C.I. 17.961645, titulado "MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA (*Manihot esculenta Crantz*) POR METILACIÓN PARA APLICACIONES EN ALIMENTOS Y BIOMEDICINA", para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos APROBADO.


Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los diecisiete días del mes de febrero de dos mil once.



Dra. Elevina Pérez (Tutor).  
C.I.: 3710533



Dr. José Álvarez (Tutor)  
C.I.: 19.465.337



Dra. Lilliam Sívoli (Jurado).  
C.I.: 7096867



Dra. Mary Lares (Jurado).  
C.I.: 8842814



Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Dirección

## CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 16/03/2011, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Caraballo De Manna, Daniela L.**, titular de la cédula de identidad No. 17.961.645; titulado: **"Modificación de almidón de yuca (*Manihot esculent C.*) por metilación para aplicaciones en alimentos y biomedicina."**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los diecisiete días del mes de marzo del año dos mil once.

  
**Dra. Guillermina Alonso**  
Presidenta del  
Consejo de la Escuela de Biología



GA/br.-

### **DEDICATORIA**

A la *VIRGEN* y a mi *Dios*, mi protector por iluminar mi camino y darme las fuerzas necesarias para lograr este sueño tan anhelado.

A *MIS PADRES Y HERMANO*, las personas que más amo en la vida; a ustedes quienes debo todo lo que soy, por darme la vida, por tanto apoyo, confianza, amor y dedicación, y a ti hermano por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas.

A *MIS TÍOS* (Silvana y Gabriel), a quienes quiero tanto, por brindarme tanto apoyo, amor y confianza.

A *MIS ABUELOS* a quienes adoro y son ejemplo de lucha; a pesar de que algunos tuvieron que partir se que desde el cielo junto a Dios están celebrando conmigo este triunfo.

"DA SIEMPRE LO MEJOR DE TI, RECORDANDO SIEMPRE CUANTO TE AMA DIOS."

## AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar a *Dios*, por darme las fuerzas para alcanzar esta meta, que si bien es uno los objetivos que me planteé en la vida “Forma parte de mis más grandes sueños”; gracias Señor por no dejarme sola cuando más lo necesitaba, gracias por tu apoyo y por ayudarme a superar cada uno de los obstáculos que se cruzaban en mi camino. Gracias a ti mi Señor, por iluminar mi camino y guiarme hacia el éxito.

Gracias a mis *Padres* “el centro de mi vida”, gracias por enseñarme a caminar con paso firme, por guiarme junto de la mano de Dios. A ti *MAMÁ*, por ser más que una madre, una gran amiga, por desvelarte cada noche a mi lado cuando las preocupaciones me agobiaban, por ayudarme a sanar mis males, y por enseñarme a levantarme con firmeza. A ti *PAPÁ*, por enseñarme a luchar en la vida, por tu apoyo y confianza. A mi *Hermano* por tu amor incondicional y enseñarme a ser valiente en la vida. Los amo, este triunfo más que mío es de ustedes.

Gracias a mis *Tíos, Silvana y Gabriel* por regalarme un espacio en su hogar, por su confianza y el apoyo que me brindaron cada día, por hacerme sentir como en casa. Gracias *Tía* por tantas atenciones cuando me enfermaba y por aquellos ricos desayunos que me llenaban de energía cada vez que amanecía entre libros, gracias, gracias, gracias y mil veces gracias por TODO. Les digo de corazón que más que mis tíos son mis segundos padres y que este triunfo también es de ustedes, los quiero muchísimo y cuenten conmigo siempre.

A mi familia, quien creyó en mi gracias, en especial a mi tía *Teresa* porque con sólo un par de palabras “*hola licenciada*” desde el inicio de mi carrera me hacia centralizarme en alcanzar este título tan anhelado y que hoy te puedo decir con razón de peso “LO LOGRE”, a mi tía *Ana* por acompañarnos siempre en las buenas y en las malas y por cada palabra de afecto. A mi tío *Cheo y Lidia* por su apoyo desde el inicio de mi carrera y por su cariño. A mi prima *Jackeline* por esas vacaciones tan ricas que pase, muchas gracias. También quiero agradecerle a mi prima y hermana *Susana* “*Mi queridísima MAMAMI*”, por tu apoyo, amor, por escucharme y aconsejarme, y compartir conmigo mis alegrías y tristezas; no quiero dejar de agradecerle a través de ti a *mi angelita bella* “*MI GABRIELITA*”, a ella quien con sus travesuras y su inocencia me ayudaban a liberarme del estrés del día a día (las mamo, hasta el infinitoooo...y más allaaaa, como me dirías tú). También a mi primo *Ale y Gabrielito* (junto a tu familia) por su confianza.

También quiero darle gracias a mis amigos, quienes gracias a Dios tuvimos la dicha de compartir juntos desde el bachillerato y durante toda nuestro recorrido en ciencias, *Andry* mi gran amiga e incondicional que aunque siempre se le olvida mandarme mensajitos se que estará ahí cuando lo necesite, *Lesbia* “*quien con mucho cariño le digo tía*” gracias por brindarme tu mano sin condiciones y *César* mi gran compañero y amigo.

A mis queridas profesoras de bachillerato “*mi madres adoptivas*” *Fátima y Liria* quienes aprecio tanto y les agradezco por mostrarme este camino, el camino de la ciencia.

A mis grandes e incondicionales amigas *Mi Majo*, quien me enseñó el gran valor de la amistad, gracias por tanta confianza y cariño amiga; *Mi Gaby* por tu amistad sincera y por tu compañía, nunca podre olvidar aquel día tan traumático el cual estuviste a cada minuto a mi lado, gracias mi Gaby “*Lupita*” y yo te estamos muy agradecidas. A “*Mamita*” *Mi Lori* por tu grata amista, apoyo y compañerismo, y ahora soy yo quien retoma tu frase y te dice “si Lori, lo que es del cura es del cura”, pues ese título ya es nuestro.

A mis otros grandes amigos, quienes les encantan un bochinche, grandes estudiantes y ahora profesionales, *Sabrina, Yuliana, Chino, Dennise, Cristina, Keyeme, Beatriz, Giovanni, Alan, Rony, Christian*, y espero que no se me haya escapado ninguno; a ustedes con quienes compartí tantas alegrías y tristezas en cada evaluación, gracias por su amistad y compañerismo.

A mis grades amigos desde los primeros semestres *María Angelica “Mi Mani”, Lenny y Marcos*, quienes a pesar de la distancia y malos ratos (en los cuales me enseñaron a valorarla) nuestra amistad sigue viva.

Mis grandes compañeras y amigas, *Oriana* por tu confianza, sinceridad, y tu mano amiga; *Any* por tu disposición en ayudarme y mi *Milagritos* por acompañarme durante toda mi tesis, gracias amiga por vivir conmigo cada una de mis lagrimas cuando algo no salía como yo quería y por echarme una mano cuando lo necesitaba.

También quiero agradecerle a *Lis* por enseñarme tantas cosas durante mis métodos y por su paciencia, *Berny y Ana* por brindarme su mano y explicarme el funcionamiento y manejo de algunos equipos; y *Mighae* por tu ayuda.

También quiero agradecerle al *Dr. Francisco Arvelo* por facilitarme su laboratorio para realizar mis análisis de biocompatibilidad y al *Lic. Felipe Sojo*, por tu colaboración y paciencia para que este objetivo lo pudiera lograr satisfactoriamente.

Finalmente y no menos importantes a mis *TUTORES, Dra. Elevina Pérez*, por su confianza y gran disposición en ayudarme y explicarme, le estoy muy agradecida transcurrí junto a usted un largo tiempo desde mis pasantías, métodos y ahora mi TEG y aprendí no sólo sobre este mundo de los almidones sino también la gran persona que es usted y lo profesional al mostrar el empeño y las ganas de ayudar a sus estudiantes; quiero aprovechar aquí a darle gracias a su esposo el *Señor César* por sus gratas palabras y grandes consejos; a mi otro tutor *Dr. José Álvarez* por la confianza depositada en mi, ya que al inicio como creo así lo noto, yo no tenía ni idea sobre esta área de la biomedicina pero gracias a su disposición pude comprender sobre ella.

*"A TODOS Y CADA UNO UN MILLON DE GRACIAS, DIOS LOS BENDIGA"*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. ÍNDICE DE CONTENIDO	i
II. INDICE DE TABLAS	v
III. ÍNDICE DE FIGURAS	viii
IV. RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Almidones Nativos	5
2.2 Composición química del almidón de yuca ( <i>Manihot esculenta</i> <i>Crantz</i> )	7
2.3 Almidones Modificados	8
2.4 Modificación Química	10
2.5 Modificación del almidón por metilación	11
2.6 Modificaciones realizadas en Venezuela	16
2.7 Envases y embalajes de alimentos	18
2.8 Algunas aplicaciones Biomédicas	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 General	27
3.2 Específicos	27
4 MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Materia Prima	28



4.2. Determinación de los parámetros del almidón nativo de yuca ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> )	28
4.2.1 Determinación proximal del almidón de yuca	28
4.2.2 Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón	29
4.2.3 Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón	30
4.2.4 Microscopia de luz polarizada	31
4.3 Modificación química del almidón ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> )	31
4.3.1 Metilación	31
4.3.2 Obtención de películas Rígidas	32
4.3.3 Obtención de películas Flexibles	32
4.3.4 Evaluación de los parámetros de calidad del almidón Modificado	34
4.4 Caracterización de las Películas a base de almidón modificado	34
4.4.1 Prueba de Textura	34
4.4.2 Grosor de las películas	35
4.4.3 Propiedad de barrera: Permeabilidad del vapor de agua	35
4.4.4 Propiedad Estructural: Solubilidad en agua y Retención de agua	36
4.5 Evaluación de la Biocompatibilidad del almidón de yuca modificado	37
4.5.1 Preparación de Muestras para Cultivo Celular	38
4.5.2 Fibroblastos epidérmicos humanos	39
4.5.3 Medición de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT-ELISA	40
5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42

6.1 Determinación de los parámetros del almidón nativo de yuca ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> )	42
6.1.1 Determinación proximal del almidón de yuca	42
6.1.2 Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón nativo de yuca	45
6.1.3 Características morfométricas del almidón nativo de yuca	48
6.1.3.1 Microscopia de Luz polarizada	48
6.1.4 Características Reológicas	50
6.1.5 Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón Nativos	56
6.2 Modificación química del almidón de yuca ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> )	60
6.2.1 Formulaciones	60
6.2.2- Formulaciones con Dimetil Sulfóxido (DMSO)	61
6.2.3- Formulaciones con Dimetil Sulfato (DMSO <sub>4</sub> )	69
2.2.4- Formulaciones con Glicerol	77
6.3 Determinación de los parámetros del almidón modificado de yuca ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> )	85
6.3.1 Composición proximal y análisis químico del almidón modificado de yuca	85
6.3.2 Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón nativo y modificado	88
6.4 Características morfométricas del almidón nativo de yuca	91
6.4.1 Microscopia de Luz polarizada	91

6.5 Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón modificados	93
6.6 Caracterización de las películas a base de almidón modificado	96
6.6.1 Grosor de las películas	96
6.6.2 Propiedad Mecánica: Textura	96
6.6.3 Propiedad de barrera: Permeabilidad del vapor de agua	99
6.6.4 Propiedad Estructural: Solubilidad en agua (SA) y Retención de agua (RA)	101
6.7- Biocompatibilidad	103
6.7.1 Crecimiento de Fibroblastos Humanos	105
6.7.2 Crecimiento sobre Hidrogeles de AlmidónMetilado/Quitano	106
6.7.3 Prueba de Citotoxicidad (MTT)	111
7 CONCLUSIONES	117
8 RECOMENDACIONES	119
9 BIBLIOGRAFÍA	120
10 Anexos	135
10.1- Anexo1. Formulaciones de películas rígidas con Dimetil Sulfoxido (DMSO).	135
10.2- Anexo2. Formulaciones de películas rígidas con Dimetil Sulfato (DMSO <sub>4</sub> ).	136
10.3- Anexo3. Formulaciones de películas flexibles a base de almidón metilado con Glicerol.	136

## I. ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
1. Análisis proximal y pureza del almidón nativo de yuca.	43
2. Características físico-químicas del almidón nativo de yuca.	46
3. Parámetros para describir el color del almidón nativo de yuca.	48
4. Análisis amilográfico del almidón nativo de yuca.	53
5. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL y 9mL Dimetil Sulfóxido.	62
6. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca con 9mL Dimetil Sulfóxido, aumentando la cantidad en gramos de almidón.	63
7. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a un alto volumen (9 y 12mL) de Dimetil Sulfóxido.	65
8. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca variando el volumen (2 y 10mL) de Dimetil Sulfóxido.	66
9. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a volúmenes iniciales (9 y 1mL) de Dimetil Sulfóxido.	67
10. Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfóxido.	68
11. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfato.	70

12. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca duplicando la cantidad en granos de almidón nativo con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfato. 71
13. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca dvariando tanto la cantidad en granos de almidón nativo como el volumen (1mL, 9mL y 5mL) de Dimetil Sulfato. 73
14. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con volumen constante (1mL) de Dimetil Sulfato. 74
15. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con cantidad en gramos de almidón nativo y volumen constante (1mL) de Dimetil Sulfato y a pH neutralizado; sin cloroformo. 75
16. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 6 y 3 gramos de almidón, para volúmenes de 9mL y 1mL de Dimetil Sulfato, y en adición de de 3, 2 y 1mL de glicerol. 79
17. Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL de Dimetil Sulfato, a pH neutralizado y en adición de 0,25mL y 0,5mL de glicerol y a pH neutralizado. 81
18. Análisis proximal y pureza del almidón modificado de yuca con comparación estadística con el almidón nativo. 85
19. Características físicas y fisicoquímicas del almidón modificado de yuca y comparación estadística con el almidón nativo. 88
20. Parámetros para describir el color del almidón modificado de yuca y comparación estadística con el almidón nativo. 90
21. Grosor promedio de las formulaciones de las películas obtenidas. 96

22. Análisis de textura de las películas de almidón flexibles.	98
23. Velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) y permeabilidad del vapor de agua de las películas de almidón modificado (flexibles).	100
24. Solubilidad en agua (SA) y capacidad de retención de agua (RA) de las películas de almidón modificado (flexibles).	102

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
1. Modelo esquemático del gránulo de almidón.	5
2. Gránulos de almidón nativo de yuca.	6
3. Modificación química del almidón.	10
4. Porcentaje de sustitución en amilopectina (almidón metilado). Los porcentajes indicados se refieren a sustituir residuos de glucosa solamente. El importe de las glucosas no sustituidas varía con la sustitución molar. Fuente: (Van der Burgt y col., 2000).	14
5. Esquema de una parte de amilopectina desnaturalizado, propuesto por Imberty y Pérez (1989). Tamaño total de la molécula de amilopectina es 100-500 nm. Las flechas indican la posición preferente de sustituyentes de metilo.	14
6. Biopolímeros naturales usados en empaque Biodegradables tipo películas. Fuente: Tharantahan, (2003).	22
7. Estructura molecular del quitosano.	24
8. Esquema secuencial para la modificación química (metilación) del almidón.	33

9. Esquema secuencial para el análisis de biocompatibilidad del almidón modificado.	38
10. Almidón nativo de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).	49
11. Cruz de malta del Almidón nativo de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).	50
12. Curva de viscosidad aparente del almidón nativo de yuca.	51
13. Amilograma del almidón nativo de yuca.	55
14. Absorción de agua (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.	57
15. Sólidos solubles (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.	58
16. Poder de Hinchamiento (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.	59
17. Almidón modificado de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).	92
18. Curvas de Absorción de agua (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se distingue un menor porcentaje de absorción de agua en el almidón modificado respecto al nativo a lo largo de todo el ensayo.	93



19. Curvas de Sólidos solubles (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se evidencia un mayor porcentaje de sólidos solubles del almidón modificado a lo largo de todo el ensayo. 94
20. Curvas del Poder de Hinchamiento (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se distingue un menor poder de hinchamiento del almidón modificado respecto al almidón nativo durante el ensayo. 95
21. Variación promedia del peso (g) de las diferentes películas de almidón modificado (flexibles) respecto al tiempo (h) del tratamiento. 101
22. Crecimiento de fibroblastos humanos en medio de cultivo: a) frasco de cultivo 25 cm<sup>2</sup>, b) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 10x), c) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 20x). 105
23. Placas de cultivo con distintas formulaciones de hidrogeles. a) Placa con hidrogeles sin medio de crecimiento de fibroblastos; b) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 3 día de incubación. 107
24. Crecimiento de fibroblastos en placas de cultivo. a) Fractura del hidrogel, la flecha indica la localización de las células muertas (10X); b) células muertas encontradas en la placa de cultivo (100x). 108

25. Placas de cultivo con distintas formulaciones de hidrogeles. a) Placa con hidrogeles sin medio de crecimiento de fibroblastos; b) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 3 día de incubación. c) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 5 día de incubación. 109
26. Crecimiento de fibroblastos en placas de cultivo. a) Fibroblastos en medio de control C3 (almidón con medio de crecimiento) 100X; b) Fibroblastos en medio de control C2 (quitosano solo) 100X; c) Fibroblastos en la mezcla (M) almidón 100X. Las flechas indican a los fibroblastos. 111
27. Cuantificación de la proliferación celular. Absorbancia (DO=570nm) contra sustrato de cultivo a los diferentes días de tratamiento. 116

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue modificar el almidón de yuca químicamente (metilación) para su uso en un empaque tipo comercial y con aplicaciones biomédicas. La metodología empleada permitió la caracterización física, química, funcional y reológica del almidón nativo y modificado. Se realizó un estudio de biocompatibilidad *in vitro* del almidón modificado, así como la identificación por microscopia (MLP) de los gránulos de ambos almidones. Los almidones modificados mostraron marcadas diferencias ( $p \leq 0,05$ ) con el nativo, respecto a los análisis proximales, físicos y fisicoquímicos evaluados. El tratamiento de estos almidones con dimetil sulfato ( $\text{DMSO}_4$ ) resultó ser una técnica con potencial para la obtención de material de empaque orgánico. Los resultados indican que la formulación de 6g almidón nativo/1mL de  $\text{DMSO}_4$ /3,3g hidróxido de bario  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  fue efectiva para la elaboración de películas rígidas; y la incorporación de glicerol les confirió un carácter flexible. Se puede también indicar en función a los resultados obtenidos en los experimentos antes mencionados, y además de las pruebas de citotoxicidad (MTT), que puede ser empleado como material de empaque terciario. Por otra parte, este estudio tiende a representar un aporte innovador en el empleo de almidones modificados para la producción o formulación de material de empaques (rígidos, y flexibles con glicerol) biodegradables de impacto en el área de alimentos y de la biomedicina debido a que se pueden obtener hidrogeles, a base de este polímero con quitosano y glutaraldehído (agente entrecruzante) que mostraron ser excelente material de soporte que permite la adhesión, proliferación y estimulación considerable de la actividad celular.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de harinas y almidones obtenido a partir de raíces y tubérculos tropicales, como materia prima en la elaboración de productos, se ha convertido en una forma de incentivar e incrementar la producción y demanda de estos tubérculos (Pérez y Pacheco, 2005). En Venezuela la yuca ocupa el renglón productivo significativo en la alimentación humana tradicional, en la alimentación animal, en la industria doméstica y en la industria de alimentos (Rangel, 1980; Montaldo, 1991). El almidón es el principal componente de la raíz de yuca y representa junto con los azúcares ~90% de la materia seca (Cock, 1985).

El almidón es un polisacárido vegetal, sustancia de reserva en el tejido vegetal, semejante al glicógeno del tejido animal (Braverman, 1980; Cheftel, 1976). El almidón de yuca presenta características específicas que lo hacen insumo importante y en algunos casos insustituibles para ciertos procesos industriales, como es el caso de la industria alimentaria donde es ventajoso en comparación con almidones de otras fuentes; ya que presenta características de particular interés en el ámbito industrial como, por ejemplo una alta pureza, sabor neutro, fácil hinchamiento y solubilización, desarrollo de viscosidad considerable y una baja tendencia a retrogradar (González y Pérez, 2003). Por otra parte en aquellos procesos donde puede ser reemplazado por otro tipo de almidón, el almidón de yuca permite la obtención de productos finales de mayor calidad (Whistler y Paschall, 1967; Wurzburg, 1986; Morthy, 1994).

Aún cuando los almidones nativos han sido por muchos años un pilar fundamental para los científicos en el área de los alimentos, los almidones modificados tienen ilimitadas aplicaciones (Rogols, 1986). El desarrollo de técnicas de modificación ha permitido expandir el uso de los almidones, en la industria alimentaria, los productos farmacéuticos, la industria de papel (como adhesivo laminado de ciertos papeles), en la industria de explosivos para obtener alcoholes, glucosa y acetona (Alarcón y col. 1998; Van der Burg y col. 2000, Whistler y Paschall, 1967; Wurzburg, 1986; Ligh, 1990).

En las últimas décadas, se han venido aplicando métodos químicos de modificación con la finalidad de lograr el desarrollo de nuevos productos donde se requiere que el almidón cumpla con propiedades y funciones muy específicas (Rogols, 1986; Light, 1990), como por ejemplo su uso como empaque, por lo que es necesario estudiar cada vez más el almidón en sus propiedades. La técnica de modificación por metilación tiene potencial para el desarrollo de empaques orgánicos por lo que se hace necesario así mismo profundizar en este campo.

La prioridad principal de los empaques es la preservación y protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el campo de mayor prioridad. Estos productos requieren atención dada la contaminación generada por microorganismos (bacterias, esporas, hongos, etc.) durante la manipulación (Tharanathan, 2003). La protección se hace a través de los empaques, los cuales generalmente se elaboran a partir de polímeros sintéticos. No obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad, lo que ha impulsado a la búsqueda de

biopolímeros naturales que puedan cumplir con las mismas funciones. El aprovechar los recursos naturales y autóctonos como fuente de conservación y reciclaje se convierte en una excelente opción e innovación en el desarrollo de nuevos productos biodegradables. Su total biodegradación en productos como CO<sub>2</sub>, agua y posteriormente en abono orgánico es una gran ventaja frente a los sintéticos (Bastioli, 2001).

Dada la potencialidad de degradabilidad del almidón, este ha sido propuesto en el campo de la biomedicina, específicamente en la ingeniería de tejido, como la materia prima para la fabricación de soportes celulares (Gomes y col. 2003), incluyendo una gama de polímeros naturales sobre la base de almidón ya que son biocompatibles y con diferentes formas estructurales y propiedades que pueden ser adaptados de acuerdo a sus métodos de elaboración y a la incorporación de aditivos y materiales de refuerzo, por esta razón junto con su bajo costo y abundancia se han sugerido para una amplia gama de aplicaciones biomédicas.

Por lo antes expuesto el objetivo principal de este trabajo fue modificar el almidón de yuca por un método químico (metilación) para su uso en un empaque tipo comercial y con aplicaciones biomédicas; donde se trata de proporcionar un material que satisfaga las demandas del impacto ecológico, además que pueda ser empleado en el campo de la biomedicina.

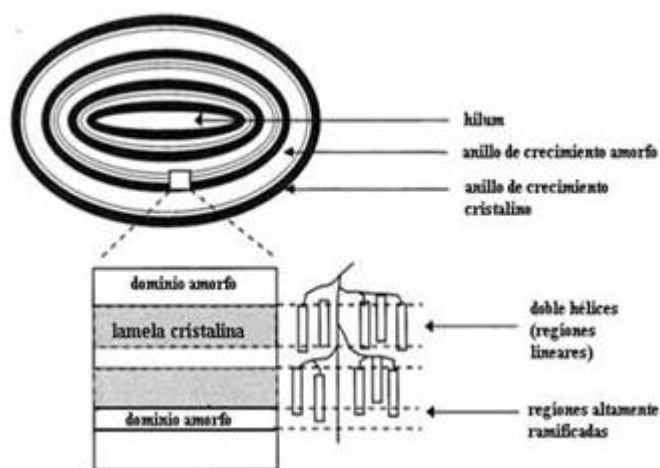
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*), pertenece a la familia Euphorbiaceae y responde a diversos nombres vulgares; yuca, mandioca, cassava, tapioca) en (Montaldo, 1991). El valor de la producción del trópico de este cultivo (yuca) se encuentra entre los rubros más importantes, entre los que se mencionan el maíz, sorgo, la papa, arroz, la caña de azúcar, entre otros (Montaldo, 1995). Su cultivo se hace como planta alimenticia o para fines industriales, notándose cada vez más el incremento en la utilización industrial de sus raíces (CIAT, s. f.). Debido a su alto contenido en almidón, la yuca se utiliza junto con el maíz, como las principales fuentes de la materia prima para la extracción de almidón (Thomas y Atwell, 1999).

Existen dos tipos de yuca: La yuca amarga y la yuca dulce; la primera, de mayor desarrollo, rica en almidón y con un contenido superior de linamarina (glucósido cianogénico), mientras que la yuca dulce es generalmente para consumo directo. Una alternativa para minimizar pérdidas en este rubro es la obtención de almidón, el cual presenta características de particular interés en el ámbito industrial como, por ejemplo, una alta pureza, un sabor neutro, fácil hinchamiento y solubilización, desarrollo de viscosidad considerable y una baja tendencia a retrogradar.

## 2.1- ALMIDONES NATIVOS

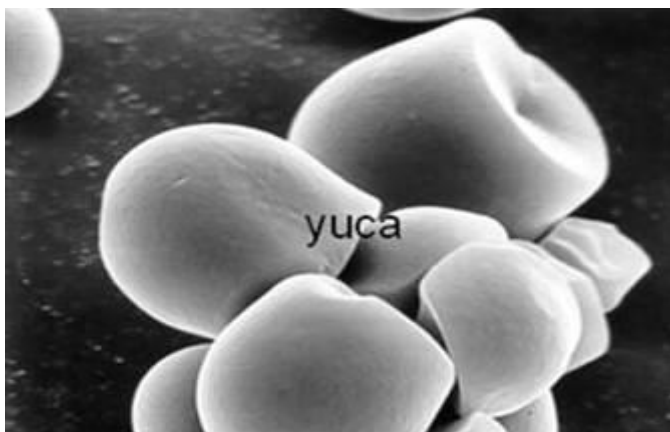
Estructuralmente, los almidones nativos en forma de gránulos semicristalinos están constituidos por amilosa y amilopectina empaquetadas en una estructura insoluble en agua (Figura 1) embebida en una matriz proteica (Hoover y Sosulski, 1991). Estos gránulos presentan de 3-100  $\mu\text{m}$  de diámetro, dependiendo de la fuente vegetal (Cheftel, 1977).



**Fig. N°1:** Modelo esquemático del gránulo de almidón. Fuente: Van der Burgt y col. (1998).

Los gránulos de almidón de yuca se caracterizan por presentar forma oval, con dentición en uno de sus extremos (huevo truncado) y un tamaño promedio que oscila entre 5 y 35  $\mu\text{m}$  (Figura 2) (Wurzburg, 1972; Jones, 1983; Moorthy, 1994).





**Figura 2:** Gránulos de almidón nativo de yuca. Fuente Sívoli y col. (2005).

El uso de los almidones está sujeto a su composición en amilosa y amilopectina, ya que esta va a determinar sus propiedades funcionales y por lo tanto las características del producto final. Las moléculas de amilosa y amilopectina se encuentran asociadas dentro del gránulo, por enlaces de hidrógeno. Así forman micelas orientadas radialmente a zonas cristalinas, con diferentes grados de organización (Zobel, 1992).

Los almidones nativos de tubérculos y cereales contienen un porcentaje de 20 y 25 % de amilosa y a causa de esto están mucho más sujetos al fenómeno de retrogradación (Cheftel, 1976), lo cual origina una serie de cambios indeseables en algunos alimentos (Coultate, 1987). Los almidones con alto contenido de amilosa permiten obtener geles más firmes rápidamente (Cheftel, 1976). Los almidones de yuca, papa y maíz céreo (bajo contenido de amilosa) hinchan bien y dan una viscosidad elevada y aun a bajas temperaturas retrogradan poco. En líneas generales los almidones nativos se utilizan porque regulan y estabilizan la textura de los alimentos y por sus propiedades espesantes

y gelificantes. Sin embargo, la estructura nativa del almidón a veces resulta poco eficiente, ya que ciertas condiciones de los procesos tecnológicos, como temperatura, pH y presión, reducen su uso en aplicaciones industriales al provocar una baja resistencia a esfuerzos de corte, descomposición terminal, alto nivel de retrogradación y sinéresis (Amani y col. 2005; Bello y col. 2002; Kaur y col. 2004). Además, algunas dispersiones de almidón nativo, como aquellas obtenidas a partir de raíces y tubérculos, imparten una textura gomosa y cohesiva en aquellos alimentos donde se utilizan como agentes espesantes (Wurzburg, 1986).

## **2.2- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ALMIDÓN DE YUCA (*Manihot esculenta Crantz*)**

Estudios realizados han permitido evaluar la composición de la raíz de yuca, obteniéndose valores de 70,25% de humedad, 13,13% de azúcares, 1,12% de proteínas, 0,14% de grasa, 1,11% de fibra y 0,54% de ceniza; se considera además que las variedades amargas presentan en promedio 30% de almidón (Grace, 1987). Debido al alto contenido de almidón en sus raíces, las variedades amargas son cultivadas con fines industriales.

Para el caso del almidón, se han reportado valores de contenido de humedad que oscilan entre 8,2 a 14% (Whistler y Paschal, 1967; Wurzburg, 1972, Matos, 1996, González y Pérez; 2003). Whistler y Paschal, (1967), señalan que la humedad puede variar hasta alcanzar valores de 15% dependiendo de las condiciones de almacenamiento; sin embargo, valores de 18% o mayores traen

problemas principalmente por el desarrollo de mohos y otros microorganismos, además de impedir el flujo del material debido al apelmazamiento de las partículas (Radley, 1976).

Matos, (1996) indicó en el análisis químico una alta pureza de almidón (98,12%), Pérez, (1994), reportó un contenido de almidón total de 99,5%. La grasa presentó un valor de 0,17%, Cenizas 0,11%, Proteína cruda 0,75%, y Fibra cruda 0,49%.

González y Pérez (2003), señalan que muestras modificadas por calentamiento en microondas y pregelatinizados reportaron una disminución del contenido de humedad (9,73% y 8,4% respectivamente). En la pregelatinización por doble tambor se hizo pasar, la mezcla de almidón-agua en forma de suspensión, a través de 2 rodillos calentados con vapor a una temperatura de 152°C.

### **2.3- ALMIDONES MODIFICADOS**

Con la finalidad de superar las limitaciones que presentan el uso de almidón nativo se han desarrollado una serie de técnicas para la modificación de almidones, a fin de obtener derivados que presenten las características deseables para procesos específicos. Con la modificación entonces, se puede diversificar el uso adecuado del almidón al modificar las características que gobiernan sus propiedades (Wurzberg y Szymanski, 1970) dotándole así a los productos, de las

propiedades funcionales para sus usos específicos (Swinkels, (1985); Light, 1990, Wurzburg, 1986).

Existen diferentes técnicas de modificación; que pueden ser genéticas, físicas o químicas (Wurzburg, 1972; Cheftel, 1976, Wurzburg, 1986; Rogols, 1986; Light, 1990), y que involucran cambios en la forma física, una degradación controlada y/o la introducción de grupos químicos (Swinkels, (1985); Colonna y col., 1984, Rogols, 1986). Dependiendo del tipo, los almidones modificados pueden espesar, suspender sólidos, proveer textura, estabilizar emulsiones, facilitar el procesamiento o proteger los productos durante la distribución y el almacenamiento (Wurzburg, 1986) o dar propiedades especiales a los productos desarrollados. Estos almidones generalmente muestran, mejor claridad de pasta y estabilidad, imparten diversos grados de viscosidad, menor tendencia de retrogradación y aumento en la estabilidad al congelamiento-deshielo, entre otras ventajas (Agoola y col. 1991; Amani y col. 2005; Schmitz y col. 2006). Por lo que se han dado tres razones fundamentales para modificar almidones, la primera se debe a que ellos proporcionan características funcionales que no pueden obtenerse al utilizar almidones nativos; la abundancia y la relativa disponibilidad del almidón viene a ser la segunda razón de uso, y tercero, el almidón puede proporcionar ventajas económicas en muchas aplicaciones en donde los productos de más alto precio deberían ser usados (Light, 1990).

## 2.4- Modificación Química

El tipo más común de modificación del almidón es el tratamiento de almidón nativo con pequeñas cantidades de reactivos químicos. La modificación química de los almidones cambia la funcionalidad del almidón. La derivación vía éter o formación de ester, oxidación de grupos carboxilo hidroxilo o grupos carboxílicos y la hidrólisis de enlaces glucosídicos son algunos de los mejores mecanismos de la modificación química. Usualmente, la modificación química del almidón es desarrollada en un medio acuoso. Una suspensión del almidón en agua con 30-45% de sólidos, es tratada con el reactivo químico bajo una debida agitación, temperatura y pH. Cuando la reacción es completada, el almidón es llevado a un pH deseado para neutralizar al agente y entonces es purificado con agua y recuperado como polvo seco (Thomas y Atwell, 1999).



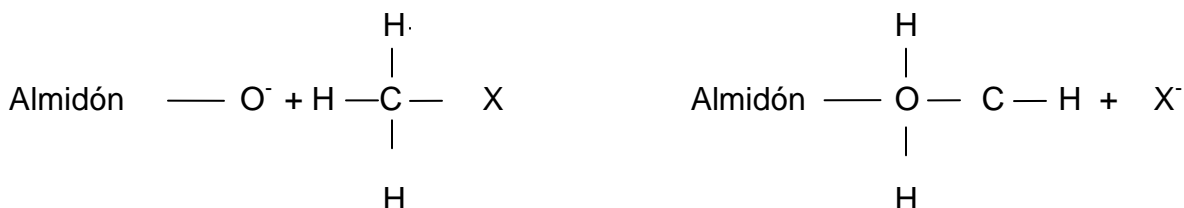
Fig. N°3. Modificación química del almidón. Fuente: Peñaranda y col. (2008).

Así, cuando se tienen bajos grados de sustitución los almidones modificados se utilizan como espesantes para mejorar la estabilidad y claridad de las pastas a bajas temperaturas para proteger las fibras con respecto a la abrasión y el desgaste del hilado y así mejorar la impresión, porosidad y resistencia a la abrasión en la industria del papel, mientras que en altos grados de sustitución los almidones modificados se pueden emplear en recubrimientos, producción de películas y adhesivos (Myllymäki y Aksela, 2005).

## **2.5- MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN POR METILACIÓN**

En la modificación química por metilación, el almidón es fácilmente metilado usando yoduro de metilo o dimetil sulfato. La técnica con dimetil sulfato en condiciones alcalinas es recomendada para el uso comercial, especialmente para almidones de bajo grado de sustitución (Hung, citado por Wistler y Paschall, 1967). Un número de procedimientos de metilación están disponibles y en gran parte, la elección del procedimiento dependerá del grado de metilación deseado. Un bajo grado de sustitución (DS) también resulta del tratamiento de una solución acuosa alcalina del almidón con pequeñas cantidades de yoduro de metilo o con cloruro de metilo. También se puede obtener la metilación con yoduro de metilo, en tolueno. El procedimiento de Haworth utilizando dimetil sulfato y una solución concentrada de hidróxido de sodio, produce metil almidones teniendo valores de grado de sustitución sobre 2; el hidróxido de sodio puede ser reemplazado por hidróxido de bario.

En cada una de estas técnicas de metilación, el mecanismo es una sustitución nucleofílica bimolecular en la cual - X es un ioduro ó ion sulfato monometil.



Kerr, (1950) señala que la metilación del almidón da como producto final 2,3,6 trimetilglucosa y en adición 4,5% de 2,3,4,6 tetrametilglucosa. Muchos almidones tales como el de papa, maíz y maíz waxy dieron aproximadamente los mismos resultados para los experimentos de metilación. El autor antes expuesto, cita que las propiedades de los metilalmidones de bajo grado de sustitución son similares a aquellos almidones ligeramente sustituidos con pocos grupos no iónicos. Estas propiedades incluyen disminución de las temperaturas de gelatinización, incrementada solubilidad en agua y reducida tendencia a Retrogradar. A altos grados de sustitución, las propiedades dependen del grado y método de metilación, ya que la extensión de la degradación del almidón varía ampliamente de una técnica de metilación a otra. Un relativo bajo grado de sustitución del metilalmidón, es soluble en agua fría, pero insoluble en cloroformo y agua hirviente, cuando se incrementa la cantidad de metoxilos, se incrementa la solubilidad en cloroformo, pero disminuye la solubilidad en agua.

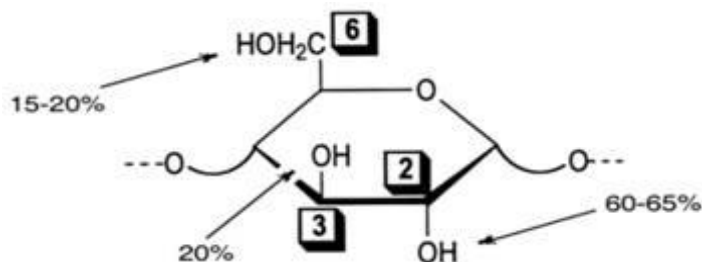
Entre los usos sugeridos para los metilalmidones se encuentran: coloides protectores en emulsiones, agente suspensor de manchas de detergentes,

floculante para pigmentos, espesante para protección de papel, y componente de la capa de transferencia fotográfica en la producción directa de imágenes positivas.

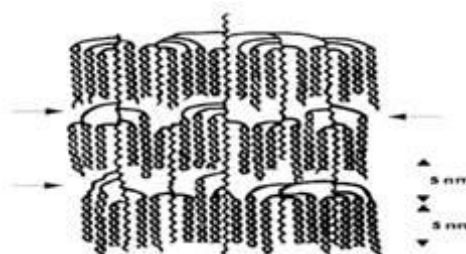
Los plásticos sintéticos, el polietileno y el polipropileno, se utilizan ampliamente en la vida cotidiana, en la industria de alimentos, el campo de la biomedicina y la agricultura. En las últimas dos décadas debido a los problemas de residuos plásticos, se le ha prestado mucha atención a los materiales biodegradables como alternativa a los derivados del petróleo. Biopolímeros naturales incluidos el almidón, la celulosa y quitosano se han ensayado solos o combinados con polímeros sintéticos, con la finalidad de formar total o parcialmente polímeros biodegradables. De estos materiales el almidón es el más atractivo, debido a su bajo costo, fácil disponibilidad y potencial en alta producción de recursos renovables. Sin embargo, la baja resistencia al agua y la alta fragilidad de las películas de almidón, han limitado su aplicación extensiva. No obstante, la biodegradabilidad de la película de almidón disminuyó con la adición de los polímeros sintéticos no degradables (Guohua y col. 2005). Teóricamente, la metilación es una forma eficaz de aumentar la hidrofobicidad del almidón y para mejorar la compatibilidad del almidón y el PVA (grado de hidrólisis 99,5%) (Guohua y col. 2005). Van der Burgt, y col. (1998), señalan una preferencia en los sitios de sustitución en los residuos de glucosa ramificada; estos investigadores han demostrado que se distribuyen sustituyentes de metilo casi al azar en las regiones ramificadas de los almidones metilados, y en cuyos resultados exhiben



una distribución aleatoria de los sustituyentes de metilo sobre las regiones ramificadas durante la metilación.



**Fig. N°4.** Porcentaje de sustitución en amilopectina (almidón metilado). Los porcentajes indicados se refieren a sustituir residuos de glucosa solamente. El importe de las glucosas no sustituidas varía con la sustitución molar. Fuente: (Van der Burgt y col. 2000).



**Fig. N°5.** Esquema de una parte de amilopectina desnaturalizado, propuesto por Imbert y Pérez, (1989). Tamaño total de la molécula de amilopectina es 100-500 nm. Las flechas indican la posición preferente de sustituyentes de metilo.

La metilación de los gránulos de almidón en un medio acuoso, utilizando una suspensión de sulfato de dimetilo tiene lugar preferiblemente en las regiones ramificadas de la amilopectina. Por otro lado, las regiones lineales de la amilopectina presentan una sustitución más heterogénea (no aleatoriamente) que las regiones ramificadas. La amilosa está en un nivel de sustitución más alto en las regiones lineales que las regiones lineales de la amilopectina y esto se puede

concluir por las diferencias en el nivel de sustitución entre el almidón metilado y la amilopectina (Van der Burgt, y col. 1998).

Los cambios en la estructura y tamaño granular estudiados en la modificación química fosfatodoacetilado por Sívoli y col. (2005) con observación de tres replicas de los campos microscópicos, empleando técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía de Luz Polarizada, señalan que las imágenes del almidón en su forma nativa (sin ningún tipo de tratamiento químico), revelaron la forma característica de huevo truncado, ovalada y esférica de este tipo de almidón con tamaño promedio de 7.5  $\mu\text{m}$ , lo que concuerda con los valores promedios de tamaño granular para el almidón de yuca reportado en la bibliografía (Mestre, 1996; Srichuwong, y col. 2005; Tester y col. 2001). Al iniciarse el proceso de modificación (introducción de grupos químicos dentro de la molécula), observaron un aumento de tamaño en el gránulo que alcanzó en promedio 19  $\mu\text{m}$ . Resultados similares fueron reportados (Sitohy y Ramadan, 2001).

## 2.6- Modificaciones realizadas en Venezuela

En Venezuela se han realizado diversos estudios en almidones convencionales como arroz, trigo, maíz, yuca y no convencionales, entre los cuales se tiene el amaranto, sorgo, platano, zulú, sagú y lenteja; se iniciaron estos estudios estableciendo criterios de extracción y purificación para luego aplicar los métodos de modificación físicas y químicas (Paredes, 2004).

González, (1997) realizó las evaluaciones de los almidones de arroz y trigo modificados por métodos químicos de acetilación y oxidación. En dicha investigación, la acetilación de los almidones de arroz y trigo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología sugerida por Wuzburg, (1964), con algunas modificaciones en las fases finales del proceso, es decir, durante la recuperación y secado de los almidones acetilados, los cuales se realizaron por centrifugación y lavado en espuma, respectivamente.

Sívoli, (1995) realizó la modificación química por metilación en almidones de maíz y de papa respectivamente; señaló que las características reológicas del almidón metilado variaron drásticamente, especialmente en el almidón de maíz en el cual no hubo respuesta amilográfica.

La modificación por metilación cambió totalmente las propiedades y morfometría del almidón nativo, concluyendo que aunque este almidón no puede ser utilizado en la industria de alimentos, más con las características adquiridas este puede tener una aplicación en otra industria (Sívoli, 1995).

Matos, (1996) realizó modificación por métodos químicos de fosfatación, acetilación, y doble derivación (combinación de ambas). En el caso de modificación por fosfatación, para obtener el almidón de yuca de bajo grado de sustitución ( $GS \leq 0,2$ ) se aplicó la metodología descrita por Paschall (1964), utilizando tripolifosfato de sodio (TPFS) como agente de entrecruzamiento. Para el almidón acetilado (estabilizado) se aplicó la metodología descrita por Wurzburg (1964), para bajo grado de sustitución (aprox. 0,07 GS) utilizando anhídrido acético como agente estabilizante.

El uso de almidones modificados químicamente está regulado en los Estados Unidos por la Ley Federal sobre Comestibles, Drogas y Cosméticos; permite utilizar en la industria alimentaria dos tipos de almidones modificados, que son el “almidón modificado para comestibles” y el “almidón modificado para aplicaciones industriales” (CPE, 1999). El almidón modificado para productos alimenticios debe respetar determinados límites de tratamiento, y el almidón modificado para aplicaciones industriales puede ser utilizado en artículos tales como envases que entren en contacto con alimentos, y debe satisfacer también exigencias específicas en cuanto al tratamiento. Esta normativa limita el grado de modificación química y define la cantidad máxima de reactivo químico que puede ser utilizado en los pasos de modificación. Son también regulados los niveles de subproductos en el almidón resultantes del proceso de modificación. Por ejemplo, preocupan especialmente los residuos de clorhidrina de propileno en el almidón hidroxipropílico.

## 2.7- ENVASES Y EMBALAJES DE ALIMENTOS

El empaque juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad y en la extensión de la vida útil del producto, sea fresco o manufacturado. El empaque contiene y protege el producto a través de su distribución hasta el consumo final; facilita el uso, manejo y transporte, entre otros; identifica el contenido y promueve la comercialización (Brennan y col. 1990).

Para la mayor comprensión de las secciones subsiguientes de este trabajo, conviene presentar los siguientes términos y definiciones: El código Alimentario Español establece las siguientes definiciones (Madi, 1984):

**Envase:** es todo recipiente destinado a contener un alimento, y protegerlo de su deterioro, contaminación o adulteración. En la práctica se utiliza este término como sinónimo de empaque.

**Embalaje:** todo material utilizado para proteger el envase y el alimento de los daños físicos y agentes exteriores durante el almacenamiento y transporte.

Según la funcionalidad y proximidad al producto, los envases se clasifican en:

**Envase Primario:** es aquel que se mantiene en contacto directo con el alimento; es la primera envoltura o el primer continente.

**Envase Secundario:** es aquel que contiene el producto ya envasado, mejorando su presentación y protección.

**Envase Terciario:** es aquel cuya función es agrupar los envases para la expedición, almacenamiento y manejo del producto.

Los empaques primarios a su vez se subdividen en rígidos, semirrígidos y flexibles, cuyas definiciones citadas por Von Boc Kelmann, y col. (1986), son las siguientes:

**Rígido:** significa que la forma o contorno del recipiente, llenado y cerrado no es afectado por el producto contenido, ni deformado por una presión externa de 70 KPa (0,69 atm).

**Semirígido:** significa que la forma o contorno del recipiente no es afectado por el producto contenido bajo presión y temperatura normal, pero que puede ser deformado por una presión externa no mayor de 70 KPa.

**Flexible:** significa que la forma o contorno del recipiente, llenado y cerrado son afectado por el producto contenido.

Entre los primeros incluyen los envases de metal, vidrio; los semirrígidos incluyen papel, películas plásticas, bolsas, “foil” de aluminio, tubos colápsibles, entre otros.

Gracin y Brozowska, (1987) señalan los criterios que deben emplearse en la selección de un sistema para el empaquetado de alimentos:

1.- Estabilidad del alimento, lo cual puede involucrar la reacción de sus componentes tales como lípidos, proteínas y ciertas vitaminas con el oxígeno, la luz y cambios en la actividad del agua (aw) del producto.

**2.-** Las condiciones ambientales prevalecientes a las cuales el producto estará expuesto durante la distribución y el almacenamiento. Condiciones tales como la temperatura y la humedad relativa del ambiente dictaran las propiedades de barreras exigidas por el empaque.

**3.-** Compatibilidad del empaque con el método de preservación seleccionado para el alimento.

**4.-** El material de empaque en particular y su efecto potencial sobre la calidad intrínseca y seguridad del producto empacado, debido a la migración desde el material de empaque a la fase de contacto.

Esta última consideración, de componentes potencialmente tóxicos de los materiales de empaque al alimento es el de mayor interés en la selección y uso de empaques comestibles y posible efecto en la salud. A este respecto (Harte y Gray, 1987) agregan que el uso de los materiales no está excepto a riesgos a la salud y/o a la pérdida de la calidad del alimento contenido. La calidad de los productos alimenticios puede deteriorarse debido a fallas en el empaque y/o a la interacción producto empaque.

Gilbert (1985); Harte y Gray, (1987), se refieren al concepto de “compatibilidad producto/empaque”, el cual incluye la migración desde el material de empaque al producto contenido, la absorción o deserción de productos del flavor del alimento por el material de empaque y la violación intencional del producto durante su comercialización.

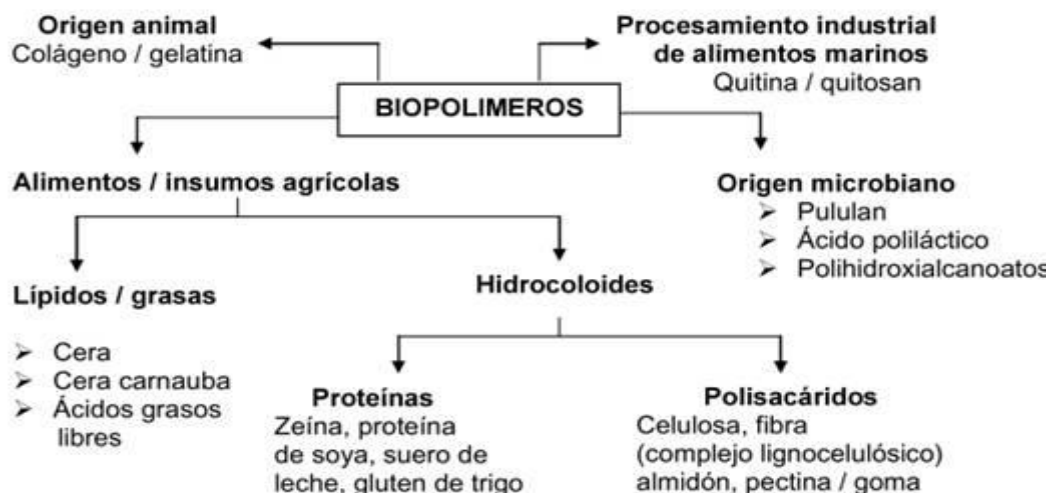
La elaboración de películas biodegradables de almidón es importante debido a los problemas de contaminación generados por el uso generalizado del polietileno.

Las películas plásticas se usan principalmente para extender la vida de anaquel y la calidad de los alimentos ya que proporcionan una barrera al oxígeno, ayudando a prevenir los cambios de aroma, sabor, apariencia y las características de textura. Las películas biodegradables a menudo contienen componentes hidrofílicos como proteínas o polisacáridos.

Estas películas proveen, bajo ciertas condiciones de humedad relativa (HR), buenas propiedades de barrera de transmisión a los gases pero pobres propiedades de barrera al vapor de agua (Guilbert, 1986; Kester y Fennema, 1986). Se ha reportado varios tipos de películas y cubiertas compuestas que contienen una base de polisacárido (García y col. 2000; García y col. 2004; Mali y col. 2005). El almidón es la materia prima más usada en la elaboración de películas biodegradables, debido principalmente a que es renovable, barato, abundante y relativamente fácil de manejar (Lourdin y col. 1995). Las películas de almidón se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el alimento, más que retardar la pérdida de humedad debido a sus características hidrofílicas (Krochta y Mulder, 1997). El carácter hidrofílico de estas películas les confiere un aspecto quebradizo causado por las altas fuerzas intermoleculares. Los plastificantes como glicerol, sorbitol, polietilen glicol, aumentan la flexibilidad de las películas debido a su capacidad para reducir los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de los polímeros mientras



aumentan el espacio molecular. Los plastificantes más usados en las películas de almidón son el sorbitol y el glicerol (Mali y col. 2005).



**Figura N°6.** Biopolímeros naturales usados en empaque Biodegradables tipo películas. Fuente: Tharantahan, (2003).

Con el propósito de atenuar los problemas de la contaminación, se han realizado numerosos estudios para valorar algunos materiales alternativos. En ese sentido, surgió el concepto de plástico biodegradable asociado al uso de materias primas renovables que ofrecen un buen control en el medio ambiente después de diversos usos. Los biopolímeros, como también se llama a esas materias primas, son macromoléculas sintetizadas por procesos biológicos o por vía química a partir de monómeros naturales o idénticos a los naturales.

Por fortuna, algunos países están preocupados por evitar la contaminación ambiental y tratan de desarrollar materiales plásticos biodegradables para reducir

la basura provocada por los terribles plásticos sintéticos y eliminarlos en un tiempo no muy lejano

## 2.8- Algunas aplicaciones Biomédicas

Actualmente el uso de biomateriales para el tratamiento de heridas es un área de interés para los investigadores y personal médico, a tal punto que la ingeniería de tejidos busca soluciones mediante la utilización de estos productos en interesantes aplicaciones en cirugía y reparación de tejidos dañados.

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha permitido su aplicación dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de drogas, debido tanto a sus propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación (Rojas y col. 2004). Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular. En aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento (Roh y Kwon, 2002).

El quitosano (Figura 2) es el producto parcialmente desacetilado de la quitina. Es un polisacárido catiónico líneal compuesto por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) (Sastre y col. 2004); presenta una

configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo forman (Andradel y col. 2003).

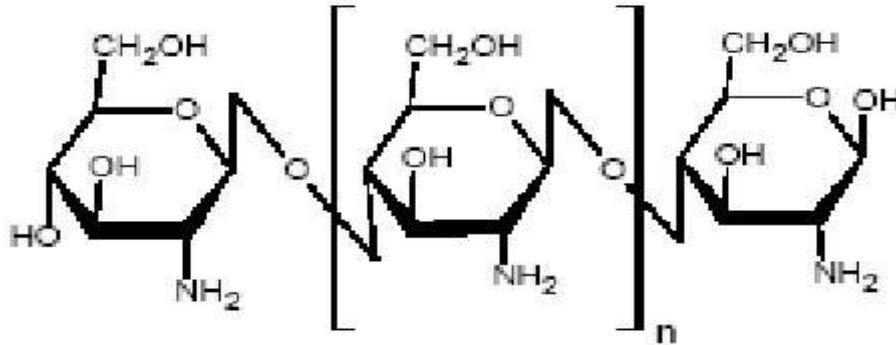


Fig. N°7. Estructura molecular del quitosano. Fuente Sanchez y col. (2007).

Los hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos, actúan como guía para el desarrollo de tejidos *in vitro* e *in vivo*, los polímeros utilizados para la fabricación de los soportes deben asemejar las matrices extracelulares presentes en los tejidos.

Las ventajas que presentan los hidrogeles es su capacidad de brindar un ambiente favorable para las proteínas, la capacidad de moldearse en diferentes formas y su alta biocompatibilidad; sin embargo presentan limitaciones como baja resistencia mecánica y dificultad para esterilizar.

Los hidrogeles al igual que otro tipo de soporte deben de cumplir ciertos criterios para ser utilizados en ingeniería de tejidos, los cuales se mencionan a continuación (Sánchez, 2007):

- ✓ Habilidad para restaurar la regeneración normal de tejido

- ✓ Facilidad en diseño, modificación y manipulación
- ✓ No tóxico y que interaccione específicamente con las células
- ✓ Fácil de esterilizar
- ✓ Que tenga una mínima respuesta inmune e inflamatoria
- ✓ Fácil de escalar el proceso de obtención del soporte
- ✓ Propiedades físico-químicas deseables
- ✓ Adecuada difusión de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento
- ✓ Permeabilidad macromolecular
- ✓ Variación espacial en la morfología porosa
- ✓ Modo de degradación del hidrogel

Actualmente los fibroblastos son utilizados para la evaluación de biomateriales en ingeniería de tejidos, gracias a la utilización de líneas celulares aisladas de cualquier parte del cuerpo humano, las cuales tienen la capacidad de permanecer cultivadas por largos períodos de tiempo.

Otra característica que presentan estas células es que son dependientes de soporte para su crecimiento; estudios indican que este tipo de células tienen preferencia por superficies catiónicas como la del quitosano; Los fibroblastos son el principal tipo de célula presente en la dermis y es el encargado de producir fibras colágenas, reticulares y elásticas, y de la síntesis de los glicosaminoglicanos, glucoproteínas y ácido hialurónico de la sustancia intercelular

amorfa. Adicionalmente los fibroblastos son las células de mamíferos más fáciles de cultivar (Katalinich, 1997).

Hoy en día la mayoría de los polímeros son materiales sintéticos, su biocompatibilidad y su biodegradabilidad son mucho más limitadas que en los polímeros naturales como la celulosa, quitina, quitosano, gelatina, dextrano, etc., estos polímeros naturales tienen excelentes propiedades tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, no-toxicidad, propiedades de adsorción, que individualmente han sido ya estudiados y utilizados en la síntesis de materiales con propiedades superabsorbentes, como soportes para tejido interconectivo (piel) y como liberadores graduales de drogas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

- ✓ Modificar el almidón de yuca químicamente (metilación) para su uso en un empaque tipo comercial, y con aplicaciones biomédicas.

### Objetivos específicos:

- ✓ Determinar la composición proximal y pureza del almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) comercial.
- ✓ Caracterizar las propiedades físicas y funcionales del almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) comercial.
- ✓ Modificar con un método químico (metilación) el almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) comercial.
- ✓ Formular y definir películas a base de almidón modificado de yuca (*Manihot esculenta C.*).
- ✓ Optimizar las formulaciones para películas rígidas a base de almidón modificado de yuca (*Manihot esculenta C.*).
- ✓ Optimizar las formulaciones para películas flexibles a base de almidón modificado de yuca (*Manihot esculenta C.*).
- ✓ Determinar la composición proximal y pureza del almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) modificado.
- ✓ Caracterizar las propiedades físicas y funcionales del almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) modificado.
- ✓ Evaluar la biocompatibilidad del almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) modificado *in vitro*, utilizando una línea celular establecida.

## 4- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1- MATERIA PRIMA:

Para el estudio, el almidón de yuca (*Manihot esculenta C.*) fue suministrado por la Empresa Alfonzo Rivas & Cía. La Encrucijada de Turmero, Edo. Aragua, Venezuela; se dispuso de una muestra representativa de 5 kg.

Reactivos: todos los reactivos empleados presentaban grado comercial.

### 4.2- Determinación de los parámetros del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta Crantz*)

#### 4.2.1- Determinación proximal del almidón de yuca:

La determinación de la composición proximal y los análisis químicos en el almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) se realizaron evaluando lo siguiente: cuantificación del contenido de humedad, cenizas, proteína cruda (%N X 6,25) método de MICRO-KJELDAHL, se realizarán de acuerdo a los métodos oficiales N°44-19; 08-17 y 46-13, respectivamente, descritos en la Técnica: AACC, (2003).

La determinación del contenido de grasa en almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), se realizó según el método de Schoch, (1964).

La determinación de la pureza se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de pureza} = 100 - (\% \text{ proteína cruda} + \% \text{ grasa cruda} + \% \text{ ceniza})$$

#### 4.2.2- Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón.

La determinación del pH y la acidez del almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) se realizó de acuerdo al método de Smith, (1967). Para ello se pesaron 10g de almidón nativo en un beacker de 250mL, se le añadió 100mL de agua destilada, agitando con una varilla de vidrio hasta suspensión homogénea; se dejó en reposo por 30min (agitación ocasional). Se decantó el sobrenadante y se determinó en pH en un pHmetro; se tituló el sobrenadante con NaOH 0,01N con fenoftaleína y se cuantificó en contenido de acidez.

La determinación del amilograma, viscosidad y consistencia del gel del almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), se realizaron de acuerdo a los métodos descritos en AACC, (2003), sección N°22-10 y Smith y col. 1967.

Color: Método de Giese, (1995) y Manual Hunter Lab. (2001), se empleó el Colorímetro Triestímulo, modelo Color Flex, bajo el Software Color Universal Cielab. Se determinarán los parámetros:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , para describir el color reflejado, utilizando el iluminante D65.

Parámetros: L: Índice de claridad y luminosidad (Blanco 100%, Negro 0%).

$a^*$ : Matiz, indica lo longitud de onda predominante (Rojo + Verde-).

$b^*$ : Intensidad del color (Amarillo +, Azul-).

Se calculó además el índice de blanco (IB), el cual representó la blancura total de la muestra y se calculó de acuerdo a la ecuación usada por Chin-Lin (2003):

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



#### 4.2.3- Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón.

Se realizó según la metodología descrita por Whistler, (1964); para ello se pesaron 4g de almidón en un balón y se le añadió 200mL de agua destilada, seguidamente se le introdujo un agitador magnético y se colocó en una manta de calentamiento, se ajustó el termostato para que la temperatura aumentara 1,5°C/min.

Se identificó y peso los tubos de centrifuga, así como las cápsulas de porcelana, llevadas a peso constante. A intervalos de 5°C entre 60°C y 90°C, se tomaron alícuotas de 10mL de la suspensión y se colocaron en los tubos de centrifuga. Se dejó enfriar en agua corriente, los tubos se secaron con papel de seda y se procedió a pesar (A) cada uno de los tubos; se centrifugó a 12000 rpm durante 20min, en una centrifuga con cabezal en ángulo. Se decantó el liquido sobrenadante de cada uno de los tubos y se colocó en cápsulas taradas, para evaporar a sequedad (hasta que no se observara humedad visible) y después se colocó en una estufa a 60°C durante 16h, luego de ello se dejó enfriar en un desecador a vacío y se procedió a pesar (b). Pesó asimismo el sedimento dejado en el tubo (a).

Cálculos:  $W_1 = (\text{peso (g) almidón (b.s.)} / \text{peso (g) almidón (b. h.)} + 200) \times 100$

$$W_2 = A \times W_1 / 100$$

$$W_3 = W_2 - b$$

$$\text{S.S.} = \text{sólidos solubles (g/g almidón)} = b / W_2$$

$$\% \text{S.S.} = \text{sólidos solubles (g/g almidón)} = (b / W_2) \times 100$$

$$\text{A.A.} = \text{absorción de agua} = (a - W_3) / W_3$$

$$\text{P.H.} = \text{poder de hinchamiento} = [(a \times 100) / \text{peso almidón (b.s.)}] \times (100 - \% \text{S.S.})$$

#### 4.2.4- Microscopia de luz polarizada

La Microscopía de Luz Polarizada (MLP) fue realizada en un equipo marca Nikon modelo Optihot 2, con cámara acoplada Nikon FX-35DX, y filtro de luz polarizada (Wang y White, 1994). Los almidones pudieron ser vistos bajo el microscopio colocando una pequeña cantidad sobre el portaobjetos, adicionando una gota de agua y una lámina cubreobjetos a fin de incrementar el índice de refracción de las mismas (Pérez y col. 2005).

#### 4.3- Modificación química del almidón (*Manihot esculenta Crantz*).

##### 4.3.1- Metilación

Para la modificación del almidón por la técnica de metilación se empleó el método descrito por Whistler y Paschall, (1964); con ciertas modificaciones.

Se procedió de la siguiente manera (Fig. N°9): primeramente se formó una pasta suave con 6 gramos de almidón y 8 mL de agua destilada, luego a esta pasta se le añadió una solución preparada con 3,3 gramos de hidróxido de bario

que han sido previamente disueltos en 8 mL de agua destilada; posteriormente se le fue añadiendo gota a gota y con continua agitación, 1mL de dimetil sulfato ( $\text{DMSO}_4$ ) y calentar esta muestra por 24h en un baño de agua a 45°C para obtener la máxima conversión del metil sulfato de bario a sulfato de bario.

Transcurrido este tiempo resuspender el almidón con agua destilada a 55°C, centrifugar a 2500 rpm por 15 min (varias veces) a fin de descartar el exceso de sulfato de bario. Se reunió todo el precipitado en un beacker, se mide el pH; esta suspensión fue netralizada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5N para destruir el exceso de bario adherido y para disolver algún precipitado de almidón. Nuevamente se centrifugó la solución bajo las mismas condiciones y se reúne todo el precipitado en un recipiente sellado; esta se guarda bajo condiciones de refrigeración para los ensayos posteriores.

**4.3.2- Obtención de películas Rígidas:** Se midieron 50 mL de solución de almidón modificado (AM) en beacker y se homogeneizó en ultaturrax, evitando la formación de burbujas; se sirvieron 14mL de la solución por placa de Petri y se colocaron en la estufa a 45°C hasta sequedad. Moler para los análisis requeridos.

**4.3.3- Obtención de películas Flexibles:** Se midieron 45,5mL de solución de almidón modificado (AM) en beacker y se le adicionaron 0,5mL glicerol, se homogeneizó en ultraturrax por 3min; se midieron 14mL por cápsulas de petri y colocar en estufa a 45°C hasta sequedad.

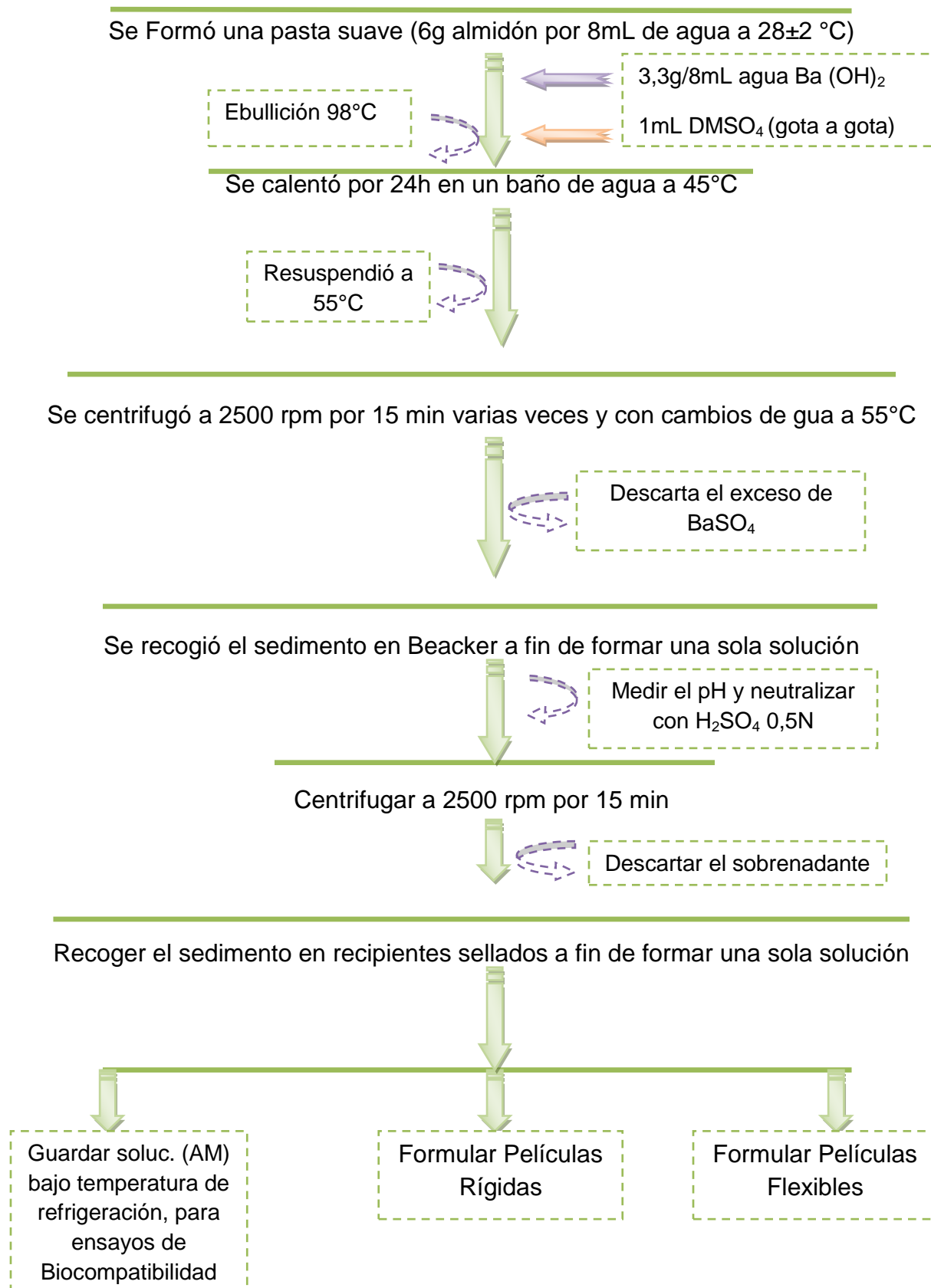


Figura N°8: Esquema secuencial para la modificación química (metilación) del almidón.

#### **4.3.4- Evaluación de los parámetros de calidad del almidón modificado**

El almidón modificado por metilación, se evaluó a través de un análisis proximal junto con sus respectivas estimaciones en sus parámetros físicos y fisicoquímicos, siguiendo las metodologías descritas anteriormente para la evaluación del almidón nativo (no modificado). Además, se observó bajo microscopio de luz polarizada la estructura del almidón modificado y se determinó la absorción de agua, solubilidad y poder de hinchamiento de los gránulos de almidón, siguiendo la metodología descrita para el almidón nativo.

#### **4.4- Caracterización de las Películas a base de almidón modificado**

##### **4.4.1- Prueba de Textura.**

Se determinó la textura a las películas flexibles (almidón modificado/glicerol) mediante un analizador de textura modelo TA-TXT2 (Texture Technologies Corp. New York, USA.), Se cortaron diferentes películas de 4,5cm de largo por 2cm de ancho, cada muestra fue sujeta con la sonda A/TG Tensile Grips o pinzas de tensión, esta se movió verticalmente ejerciendo una fuerza sobre la película, a una velocidad Pre-ensayo=1 mm/seg.; Velocidad del Ensayo= 1,5 mm/seg.; velocidad del Post-ensayo= 10,0 mm/seg.; Distancia= 100mm; Célula de carga= 2Kg. La curva de la fuerza de deformación, fue procesada con el Software del equipo para determinar la fuerza de deformación y ruptura (Yan y Paulson, 2000).

#### **4.4.2- Grosor de las películas**

El grosor de las películas se midió por triplicado con un micrómetro digital (electronic Digital Micrometer Symmetry Especialidades, S.A.) con una escala de calibración de 0-25mm y de 0,001mm de precisión. Para ello se tomaron 5 medidas en diferentes posiciones en cada película y se obtuvo un promedio de ellas.

#### **4.4.3- Propiedad de barrera: Permeabilidad del vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimétricamente a 25°C, utilizando una modificación del método E96-93 de la ASTM (Tapia y col. 2007). Se tomaron cápsulas de metacrilato de 3cm de diámetro interno, 4,5cm de diámetro externo y 2cm de profundidad, y se llenaron con 5 mL de agua destilada. Asimismo, se cortaron 2 películas en forma circular de las formuladas con almidón modificado/glicerol (películas flexibles) y se colocaron sobre las cápsulas. Luego se sellaron con una tapa que se ajustó a presión mediante una goma tipo O-ring, dejando un espacio de 1 cm aproximadamente entre la película y el agua, y se pesaron. Estas tapas son huecas de manera de dejar un área expuesta para el intercambio de vapor de agua. El sistema formado por las cápsulas, el agua y las películas se colocó en desecadores sellados herméticamente, que contienen en el fondo una solución de  $MgCl_2$  (esta solución saturada genera una humedad relativa de 33%). El peso de las cápsulas fue registrado cada hora durante 6h. Estos puntos fueron utilizados para graficar la variación de peso de las cápsulas en función del tiempo. La pendiente de esta curva es la tasa de pérdida de agua, la

cual se estimó mediante un análisis de regresión lineal, realizada con el programa Microsoft® Office Excel 2003.

La velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) a través de las películas y la permeabilidad al vapor de agua fueron obtenidos según la descripción de Kaya y Kaya, (2000) y Chinnan y Park, (1995), respectivamente, usando las siguientes fórmulas:

$$VTVA = \text{Pendiente} / \text{área expuesta de la película (g/Cm}^2 \cdot \text{S.)}$$

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

Donde  $p_a$  es la presión externa de la capsula y es igual a 1,046 Kpa;  $p_i$  es la presión interna de la capsula y es igual a 3,17 Kpa (Tapia y col. 2007); y L es el grosor promedio de las película es mm. La PVA se expresó como g/m.s.Pa.

#### **4.4.4- Propiedad Estructural: Solubilidad en agua y Retención de agua**

La solubilidad en agua (SA) y la capacidad de retención de agua (RA) de las películas fue determinada de acuerdo a Gontard y col. (1992); Rhim, (2004). Se tomaron al azar seis muestras de las películas flexibles, tres de ellas se secaron a 105°C por 24h para obtener la materia seca inicial. Las otras tres se colocaron individualmente en beacker de 50 mL con 30mL de agua destilada, los beacker fueron sellados con parafilm y colocados en una estufa de secado a 25°C por 24h, agitando ocasionalmente. Las películas fueron retiradas cuidadosamente y lavadas suavemente con agua destilada y colocadas en una

estufa a 105°C por 24h para determinar finalmente la materia seca remanente (no solubilizada).

La siguiente formula se utilizó para determinar SA:

$$SA = (S_0 - S) / S_0 = \text{g Sólidos solubles} / \text{g Sólidos totales}.$$

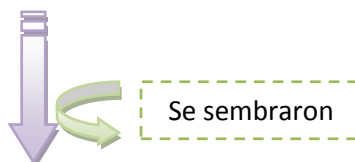
Donde  $S_0$  es la muestra seca inicial y  $S$  es la materia seca final (no solubilizada). La capacidad de retención de agua se determino de acuerdo a Lee y col. (2004) y Rhim, (2004). Para ello, muestras de películas pre-pesadas (por triplicado) fueron sumergidas en agua a 25°C por 10min, secadas suavemente con papel secante por 1min de manera de remover el agua superficial y así determinar el peso final de las muestras hinchadas. La RA fue expresada como la fracción de agua (g) vs los sólidos totales en la película (g).

#### **4.5- Evaluación de la Biocompatibilidad del almidón de yuca modificado**

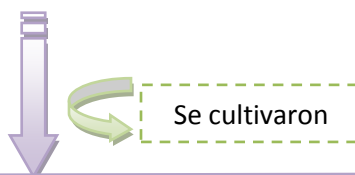
Para los estudios de la biocompatibilidad del almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) modificado, se empleó las metodologías descritas por: Microscopia Óptica según Álvarez y col. (2007). Ensayo MTT descrito por Nam y col. (1999).



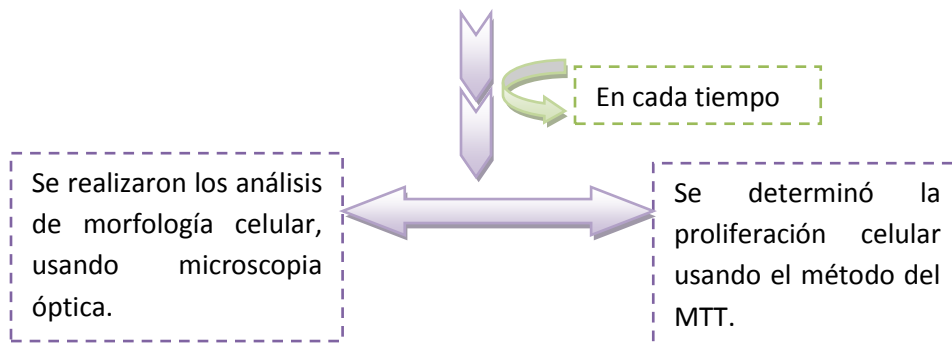
Se prepararon hidrogeles con almidón modificado/quitosano/glutaraldehido (1:1(200µL)/50 µL) en placas de 24 pozos, lavadas extensivamente, secadas y esterilizadas con Etanol 70%.



Células primarias (fibroblastos) previamente cultivadas; a una densidad de  $20 \times 10^3$  cel. /pozo



Las células por 3 y 5 días, a 37°C en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.



**Figura N° 9.**Esquema secuencial para el análisis de biocompatibilidad del almidón modificado

#### 4.5.1- Preparación de Muestras para Cultivo Celular

Para las pruebas de bio-compatibilidad, películas de hidrogeles compuestos de quitosano con almidón metilado fueron preparadas en placas estériles de 24 pozos. Para esto, la metilación del almidón fue previamente realizada bajo condiciones de esterilidad. Separadamente, el quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético al 1% v/v, con una concentración final de quitosano de

1% p/v. La suspensión del almidón y la solución de quitosano fueron mezcladas en una relación 1:1. 200µL de la mezcla fueron añadidos a cada pozo, seguido por la adición de 50µL de glutaraldehído a fin de promover el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano, el cual fue llevado a cabo por 15 min. Luego del entrecruzamiento, los hidrogeles fueron esterilizados por 15 min con etanol al 70%, el cual también sirve para la extracción del glutaraldehído sin reaccionar. Luego de esto, el etanol fue removido y se prosiguió a realizar tres lavados con solución tampón fosfato-salina (PBS). Las condiciones de cultivo fueron: placa con medio de crecimiento (C1), además de quitosano sólo (C2) y almidón sólo (C3), siendo estos comparados con la mezcla (M) de quitosano y almidón modificado. Los cultivos se realizaron por 3 y 5 días, en los cuales se realizaron ensayos de actividad metabólica para evaluar la viabilidad celular.

#### **4.5.2- Fibroblastos epidérmicos humanos.**

Los cultivos primarios de fibroblastos epidérmicos humanos fueron donados por el Dr. Francisco Arvelo y en colaboración del Lic. Felipe Sojo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias. Estos fueron obtenidos a partir de muestras humanas y fueron cultivados en medio DMEN suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100U/mL penicilina y 100U/mL estreptomina incubados a 37°C en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### 4.5.3- Medición de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT-ELISA.

- Se cultivan las líneas celulares (fibroblastos) en medio DMEN suplementado con 10% SFB, 1% Glutamina y 1% antibiótico (penicilina-estreptomicina). Se incuban a 37°C en atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se retira el medio de cultivo y se lava con poca tripsina ó PBS.
- Se tripsinizan las células colocando un volumen que cubra la monocapa con 1X tripsina.
- Se colocan en la estufa (incubar) por 2-5 min aproximadamente.
- Se “repipetea” y se lava la placa hasta desprender la mayor cantidad de células presentes.
- Se retiran las células y se colocan en tubo cónico (15 mL) con una alícuota de medio suplementado para neutralizar la acción de la tripsina. Se puede lavar la placa igualmente con medio para neutralizar la acción de la tripsina restante.
- Se centrifugan las células a 2400 r.p.m por 5 min.
- Se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1-2 mL de medio suplementado.
- Se toman 20 µL del pool de células para contar y se diluyen en un volumen igual de azul tripano.
- Se coloca una alícuota en una cámara de Neubauer para contar.
- El número de células se determina de acuerdo a la ecuación:  
$$\text{N}^{\circ} \text{ células} = n^{\circ} \text{ células contadas} \times \frac{1}{4} \text{ (cuadrantes)} \times 2 \text{ (factor de dilución)} \times 10.000 \text{ (factor de la cámara).}$$

- Se colocan por pozos 50.000 células y se completa en un volumen de 250  $\mu$ L sobre las placas sensibilizadas previamente con los tratamientos correspondientes ejemplo: almidón, quitosano, y quitosano+glutaraldehído.
- Se incuban por 72h y 120h en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad a 37°C.
- Luego, se retira el medio y se coloca 250  $\mu$ L del reactivo MTT diluido en solución salina o Buffer fosfato (PBS) estéril.
- Se incuban por 2h en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad a 37°C.
- Seguidamente, se descarta el MTT y se revela los cristales violetas de formazan que se hayan formado con 250  $\mu$ L DMSO (dimetilsulfóxido).
- La lectura de se realiza a una  $\lambda$  .570 nm utilizando un lector de microplacas modelo TECAN infinite M200.

## **5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados obtenidos para las muestras de almidón nativo así como para el almidón modificado (gránular o formando películas), fue evaluado estadísticamente usando el paquete estadístico Statigraphis Vs. 8 (Graphis SoftwareSystems Inc., USA, 1997) para establecer si existía diferencias significativas entre las muestras se realizó un análisis de varianza de una y de dos vías (según los resultados), así como una prueba t-student a una  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6- Determinación de los parámetros del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta Crantz*)

#### 6.1.1- Determinación proximal del almidón de yuca

Tabla N°1. Análisis proximal y pureza del almidón nativo de yuca

Análisis	Almidón Nativo
Humedad	10,45±0,03
Cenizas <sub>a</sub>	0,22±0,01
Proteína cruda <sub>a,b</sub>	ND
Grasa cruda <sub>a</sub>	0,09±0,01
Pureza <sub>a</sub>	99,69±0,02

Media ± desviación estándar n=3; a = % base seca; b = N x 6,25; ND= no detectada

En la tabla N°1, se muestran los resultados obtenidos de la composición proximal del almidón nativo de yuca, en el cual se obtuvo un contenido de humedad de (10,45±0,03)%, un valor superior reportado por Matos (1996), de 8,25%; similar a los señalados por Wistler y Paschal (1967), de 10-12% y Pérez (1994) de 10,13%. Wistler y Paschal, (1967) destacan que la humedad puede variar hasta alcanzar valores de 15% dependiendo de las condiciones de almacenamiento. Así mismo, la humedad de equilibrio de los mismos depende del tipo de almidón.

Bajo las condiciones atmosféricas normales, muchos almidones comerciales nativos contienen entre 10 y 20% de humedad (Swinkels, 1985); según Thomas y col. (1999), la humedad en almidones típicamente se equilibra al alcanzar 12 %. Estos valores de humedad son los adecuados para lograr que el

producto tenga un mayor y estable período de almacenamiento, debido a que sobre estos valores el desarrollo microbiano es muy lento (Jay, 1996).

El contenido de humedad de los alimentos se utiliza frecuentemente como índice de calidad y estabilidad. Así mismo, este parámetro condiciona el tiempo de vida de un producto en almacenamiento, el tipo de empaque a utilizar, el tipo de procesamiento que se puede aplicar al producto, etc. (Joslyn, 1970; citado por Becerra, 1983).

La determinación de cenizas en los alimentos permite conocer la cantidad y tipo de residuos inorgánicos. Indica, además, la calidad de los almidones y de los productos obtenidos a partir de él, así como su pureza. En la Tabla N°1 se muestran el resultado de cenizas obtenido para el almidón nativo de yuca de  $(0,22 \pm 0,01)$  % el cual fue superior al reportado por Pérez, (1994) de 0,11% y coincidiendo con el de Whistler y Pascall, (1967) de 0,2%.

Para cuantificar el nitrógeno total en los alimentos y en la materia orgánica en general se requiere la conversión completa del nitrógeno en su forma nativa a nitrógeno gaseoso o a una sal inorgánica de amonio (estado totalmente reducido del nitrógeno). Según Vender (1966), las proteínas no sólo se relacionan con el nitrógeno total, sino también con los aminoácidos esenciales. La capacidad de la proteína para satisfacer estas necesidades y la eficiencia con que puede hacerlo dependen de su combinación de aminoácidos, puesto que el valor nutritivo de las proteínas está correlacionado con su contenido de aminoácidos esenciales. Sin embargo, en los ensayos realizados no se detectó la presencia de las mismas

para el almidón nativo de yuca por lo que se inferiré que el método de extracción fue eficiente o quizás el equipo para la determinación de las mismas no mostró la sensibilidad necesaria para su cuantificación, por otra parte también se puede hacer énfasis en que quizás, el almidón en estudio no presentaba ningún tipo de impurezas que incidieran en los resultados obtenidos. Esto concuerda con Pérez, (1994) donde se señaló que el contenido de proteínas no pudo ser detectado por el método empleado.

Pérez, (1994) obtuvo un contenido de grasas de 0,12% el cual es superior al obtenido en el presente estudio de  $(0,09 \pm 0,01)$  %, cuya disminución observada podría explicarse por una extracción incompleta del material lipídico presente, el cual, de por sí, está en una cantidad limitada. Es importante mencionar, en este punto, la importancia de la selección del solvente a utilizar ya que este debe reunir ciertas características que hacen un método eficiente. El solvente, por lo tanto, debe ser selectivo; es decir, debe ser capaz de no solubilizar compuestos que no sean de interés, así como también considerar el grado de volatilidad de los mismos.

La composición proximal permite calcular la pureza del almidón nativo, y su consideración es importante al momento de evaluar las propiedades funcionales, ya que estas pueden verse afectadas por ciertas impurezas presentes. El grado de pureza está determinado por el contenido de almidón, que para la muestra en estudio fue de  $(99,69 \pm 0,02)$  %, el cual se encuentra superior a los reportados por Pérez, (1994) de 99,5% y Matos, (1996) de 98,12%; sin embargo cada uno de los

resultados señalados mostraron un elevado porcentaje de pureza respecto al almidón de yuca de interés.

### **6.1.2- Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón nativo de yuca.**

Las características físicas y fisicoquímicas evaluadas en el almidón nativo de yuca se presentan en la tabla N°2; el valor de pH obtenido fue bajo (4,22) e inferior a lo reportado por Pérez, (1994) de 5,4; ambos resultados indican que el almidón estudiado se caracterizó por presentar un valor de pH relativamente bajo.

Por otra parte el valor de la acidez titulable obtenido para el almidón de yuca es considerablemente bajo, por lo que se puede caracterizar como un almidón de alta acidez; esto concuerda con lo señalado por Pérez, (1994) donde se refiere un valor de acidez de  $6,8 \times 10^{-3}$  meq NaOH/g para el almidón de yuca nativo.

Diferentes metodologías son empleadas para evaluar la consistencia de los geles en los almidones; en este caso se utilizó el método descrito por Cagampang y col. (1973), estos autores señalan que la prueba de consistencia del gel es rápida, simple y un indicador sensible de la viscosidad de la pasta fría.

La consistencia está asociada con la cantidad de amilosa y de amilopectina. La amilosa es el componente principal implicado en la producción de la estructuras de la red que da a los geles la firmeza durante el proceso de



enfriamiento Zhou y col. (1998), entre más cantidad de este componente esté presente más consistencia tendrá el almidón. En los gránulos de almidón este polímero está presente bajo la forma cristalizada, debido principalmente al gran número de enlaces de hidrógeno existente entre los grupos hidróxilo. Los enlaces de hidrógeno de la amilosa también son responsables de la absorción de agua y de la formación de geles (originan redes tridimensionales), en el curso de la retrogradación después de la gelatinización. El almidón en estudio presentó una fluidez menor (92,33 mm) comparado con el obtenido por Pérez, (1994) de 115mm a temperatura ambiente, cuyas diferencias pueden estar relacionadas o afectadas por el tratamiento alcalino al cual fue sometido; así como también, a su composición de amilosa y amilopectina como se señaló anteriormente. Según Cheftel, (1976), la yuca presenta un 20% de amilosa y un 80% de amilopectina.

**Tabla N°2.** Características físico-químicas del almidón nativo de yuca.

Análisis	Almidón Nativo
pH	4,22±0,02
Acidez <sub>a</sub>	$2,00 \times 10^{-04} \pm 1,10 \times 10^{-08}$
Consistencia del Gel <sub>b</sub>	92,33±0,58

Media ± desviación estándar n=3; a=expresado como porcentaje de ácido málico; b=referido en mm

El color es un parámetro de identidad de los almidones con el cual se puede predecir la efectividad del proceso de extracción y la presencia de algunos contaminantes.

Good, (2002) define al parámetro  $L^*$  como la luminosidad donde el valor 100 representa al blanco, mientras que el 0 representa el color negro. El parámetro  $a^*$  lo relaciona al matiz rojo o verde, en donde los valores positivos representan al rojo, los negativos al verde y el cero es neutro. El autor señala que el parámetro  $b^*$  refleja el matiz amarillo y azul, siendo los valores positivos correspondientes al amarillo y los negativos al azul siendo cero neutro. El valor de  $L^*$  encontrado en el almidón de yuca nativo fue de 97,10 indicando que el almidón es de color blanco. Sin embargo para  $a^*$  el valor es positivo y de  $0,03 \pm 0,01$  lo que indica un matiz rojizo en el almidón. Por otra parte, se tiene, que para  $b^*$  el valor mostrado en la tabla N°3 es positivo e igual a  $2,38 \pm 0,01$  reflejando un matiz amarillo. Por último y considerando al índice de blancura como un factor importante de la calidad se tiene que este presentó un valor de  $97,42 \pm 0,23$ , indicando que el almidón está muy cercano al blanco. Estos resultados difieren un poco con los obtenidos por Pérez, (1994) respecto a los valores obtenidos para los diferentes parámetros ( $74,7L^*$ ;  $2,2a^*$ ;  $14,2b^*$ ) sin embargo reflejan los mismos matices que los antes señalados, es decir tiende al blanco, refleja un matiz rojizo y amarillo respectivamente. Es importante destacar en este punto la diferencia obtenida en el parámetro  $L^*$  ya que se puede deber a la eficiencia en el método de extracción del almidón en estudio.

**Tabla N°3.** Parámetros para describir el color del almidón nativo de yuca.

Parámetro	Almidón Nativo
L*	97,10±0,04
a*	0,03±0,01
b*	2,38±0,01
IB	97,42±0,23

Media ± desviación estándar n=3, L\*: negro=0, blanco=100; a\*: + = rojo, - = verde; b\*: + = amarillo, - = azul; IB: índice de blanco

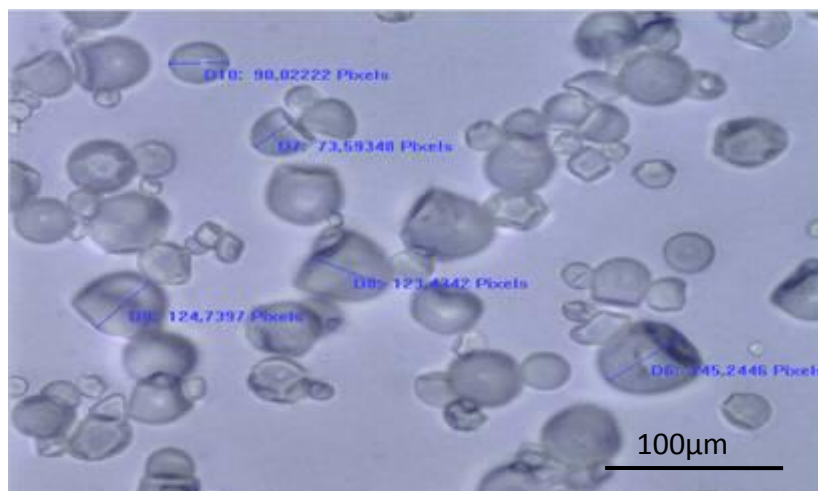
### 6.1.3- Características morfométricas del almidón nativo de yuca.

#### 6.1.3.1- Microscopia de Luz polarizada

El estudio microscópico de los gránulos de almidón puede ser empleado para juzgar la calidad (presencia de granos dañados) y grado en la gelatinización. Gregová y col. (2006) reportaron que, todas las características de los almidones nativos, incluyendo tamaño y forma, exhiben una relativa variabilidad, que depende además del proceso de extracción del almidón, del tipo genético de la planta y de las condiciones de siembra (clima y humedad entre los más importantes). Aún cuando los almidones de varias fuentes exhiben estructuras fundamentales similares, Huber y Miller, (2001) difieren en detalles específicos de su micro y ultraestructura.

Las imágenes del almidón en su forma nativa (Fig. N°10), revelaron la forma característica, de acuerdo a la bibliografía, de huevo truncado, ovalada y esférica, con un tamaño promedio de 20  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ . Se ha reportado que los almidones

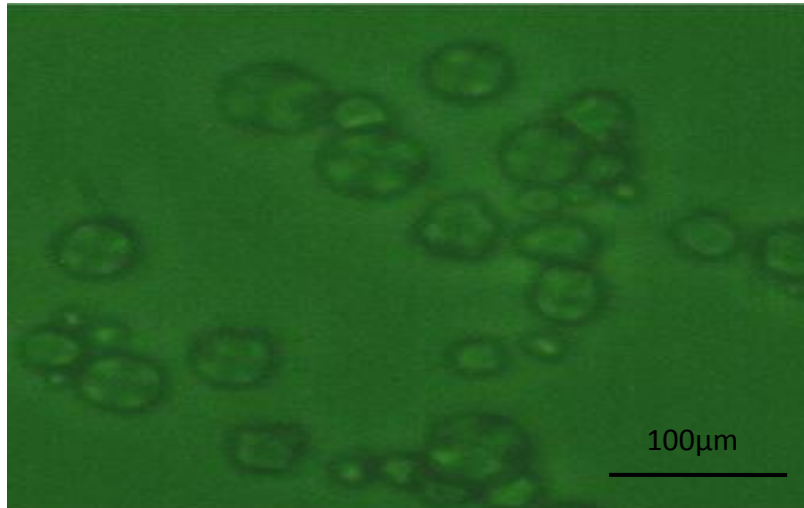
con tamaño de gránulo grande presentan un grado más bajo de modificación (Huang y col. 2007).



**Fig. N°10.** Almidón nativo de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).

Por otra parte, la observación microscópica bajo luz polarizada suministra información más detallada en relación a la organización molecular de los gránulos de almidón. La disposición espacial y ordenada de las moléculas de almidón en un gránulo resulta evidente al observar la cruz de polarización (cruz blanca sobre un fondo negro) en un microscopio de polarización cuando se colocan los polarizadores a 90° entre sí. El centro de la cruz se corresponde con el hilum, el centro de crecimiento del gránulo. La naturaleza birrefringente del almidón indica el alto grado de orientación molecular dentro de los gránulos. En la micrografía con MLP se observó una cruz de malta bien definida, al igual que los bordes de los gránulos y pequeñas aglomeraciones, formas redondas y en forma oval- truncada

con hilum definido y céntrico, indicando que el almidón no está gelatinizado, esta es una técnica rápida para ver el grado de gelatinización del almidón (Fig. N°11).



**Fig. N°11.** Cruz de malta del Almidón nativo de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).

#### **6.1.4- Características Reológicas.**

La evaluación reológica del almidón consistió en el análisis de viscosidad aparente mediante un viscosímetro Brookfield, y del comportamiento viscoamilo gráfico empleando un viscoamilo grafo Brabender. Los resultados de la viscosidad aparente, medida a 30 y 50° C con una aguja n°4 a diferentes tasas de corte (rpm), se muestra en las figura N°12, para el almidón de yuca nativo.

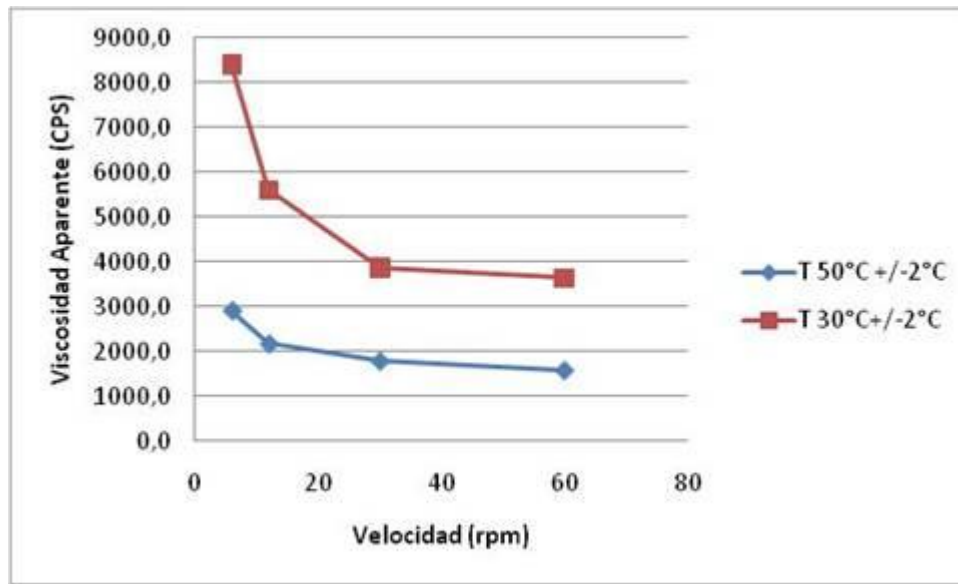


Fig. N°12. Curvas de viscosidad aparente del almidón nativo de yuca.

Hegenbert (1996), citado por Clemente, (2007) señala que la viscosidad es una función del poder molecular y la estructura ramificada de la amilopectina, que con todas sus cadenas unidas posee una molécula mucho más grande que la amilosa, por lo tanto más pesada. La viscosidad aparente incrementa después que los gránulos de almidón son sometidos a un hinchamiento inicial, y depende de la especie botánica y los tratamientos previos; así como, de la presencia de otras sustancias circundantes en el medio acuoso (Juliano, 1985).

La viscosidad es el principal parámetro que caracteriza las propiedades de los fluidos tales como líquidos, semisólidos y gases. Los fluidos no newtonianos se caracterizan porque su viscosidad no permanece constante cuando la temperatura y la composición permanecen invariables, sino que depende del esfuerzo cortante o gradiente de velocidad y, a veces, del tiempo de aplicación del esfuerzo y de la historia previa del producto o muestra. Ello es debido a que la

constitución física varía al someter el producto a los efectos de rozamiento a lo largo del tiempo (Fennema, 2000).

El análisis de la viscosidad del almidón nativo de yuca (fig.Nº12) presentó una disminución de la viscosidad respecto al aumento de la tasa de corte (rpm), medido a 30 y 50°C; los valores de viscosidad son mayores a temperaturas menores con lo cual se puede inferir o caracterizar el tipo de fluido en base al comportamiento de este tipo de almidón, como un fluido característico de líquidos no newtonianos pseudoplásticos (Singh y Heldman, 1998), ya que su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Este comportamiento indica una ruptura o reorganización continua de la estructura, dando como resultado una menor resistencia al flujo, y es debido a la presencia de sustancias de alto peso molecular del almidón así como a la dispersión de sólidos en la fase sólida.

Los resultados obtenidos en la viscosidad aparente fueron comparados con el trabajo de Pérez, (1993) quien observó valores de viscosidad en el almidón nativo de yuca que disminuían cuando aumentaba la tasa de corte medidos a las mismas temperaturas de 50°C y 30°C, lo cual revela el carácter pseudoplástico de este fluido. Así mismo, Pérez, (1994) señaló que dentro del grupo de raíces y tubérculos, el almidón de yuca es el que desarrollo mayor viscosidad comparado con el de papa.

El análisis amilográfico se basó en medir los cambios de viscosidad que ocurren durante la gelatinización. El amilografo registra la fuerza de corte, como una función del tiempo y la temperatura, cuando el almidón en forma de pasta es

agitado. La pasta se calienta a una tasa de 30-150 rpm, los gránulos se hinchan e interfieren unos con otros, incrementando la viscosidad de la pasta (Lund, 1984).

**Tabla N°4.** Análisis amilográfico del almidón nativo de yuca.

Parámetros	Almidón Nativo
Viscosidad inicial (UB) (A)	11
Temperatura de gelatinización (°C)	63,3
Pico de viscosidad máxima (B)	647
Temperatura pico máximo de viscosidad	86.5
Viscosidad a 90°C	645
Viscosidad a 90°C x 30 min (D)	336
Viscosidad a 50°C (E)	336
Breakdown o estabilidad (B-D)	311
Set back o asentamiento (E-D)	0

La forma del amilograma obtenida para el almidón nativo de yuca (Fig. N°13), presenta un primer registro de temperatura de 63,3°C, similar al de González y Pérez, (2003) de 60,8°C; seguido de un aumento considerable de la misma a lo largo de todo el registro; estas temperaturas representan un colapso o rompimiento del orden molecular dentro del gránulo de almidón (Gelatinización), con cambios irreversibles en las propiedades, tales como hinchamiento granular, disolución de los cristales nativos, pérdida de birrefringencia y solubilización de los almidones.



El “pasting”, o fenómeno siguiente a la gelatinización (pérdida del orden molecular) cuando el almidón está en disolución, incluye al hinchamiento del gránulo, exudación de sus componentes moleculares y eventualmente el rompimiento total de los mismos. Esto se ve reflejado en el incremento de la viscosidad como resultado de la absorción de agua por parte de los gránulos de almidón con el subsecuente hinchamiento, deformación de los mismos y liberación de la amilosa. Este fenómeno de “pasting” puede mantenerse según Hosney (1986), durante una hora y cuya intensidad depende del tipo de almidón utilizado, debido a que las moléculas de almidón soluble se orientan por sí mismas en la dirección en que el sistema está siendo agitado fenómeno llamado “shear thinning”; el mismo autor relaciona un pronunciado de este fenómeno con almidones más solubles.

La tabla N°4 muestra el valor de Breakdown, definido por Juliano, (1981) como el índice de la fragilidad de los gránulos de almidón, este valor fue de 311 un valor bastante elevado por lo que se concluye que el gránulo de almidón nativo de yuca posee débiles fuerzas internas por lo que son bastante frágiles. Los gránulos de almidón frágiles producen un pico de viscosidad agudo como el que se puede ver en la Fig. N°13, esto producto de la caída rápida de la viscosidad; este comportamiento o respuesta amilográfica es similar a la obtenida por Pérez, (1994) quien señala una alta fragilidad del almidón de yuca y papa cuyos valores fueron de 670 y 370 de breakdown. Si por el contrario los gránulos son muy resistentes, estos hinchan progresivamente, hasta que el sistema alcanza su mayor temperatura. La solubilidad de los almidones sólo depende de la

temperatura y no del tiempo en que se aplica el calor, por esto una vez que los almidones de gránulos resistentes alcanzan la máxima temperatura, la viscosidad se mantiene constante. La fragilidad de los almidones es un parámetro muy importante, en la predicción de los regímenes de cocción aquellos en los cuales debe ser sometido el gránulo de almidón e inclusive podría predecir el grado de digestibilidad de los mismos, sino se aplica el tratamiento calórico adecuado.

El almidón nativo presentó un valor de “set back” o tendencia a retrogradar igual a cero. Este parámetro es causado por la disminución de la energía del sistema, permitiendo la formación progresiva de puentes de hidrogeno entre las cadenas de almidones, las cuales quedan unidas fuertemente, originándose el gel y sucesivamente la retrodegradación o cristalización del sistema. Este bajo valor de “set back” también fue reportado por Pérez, (1994).

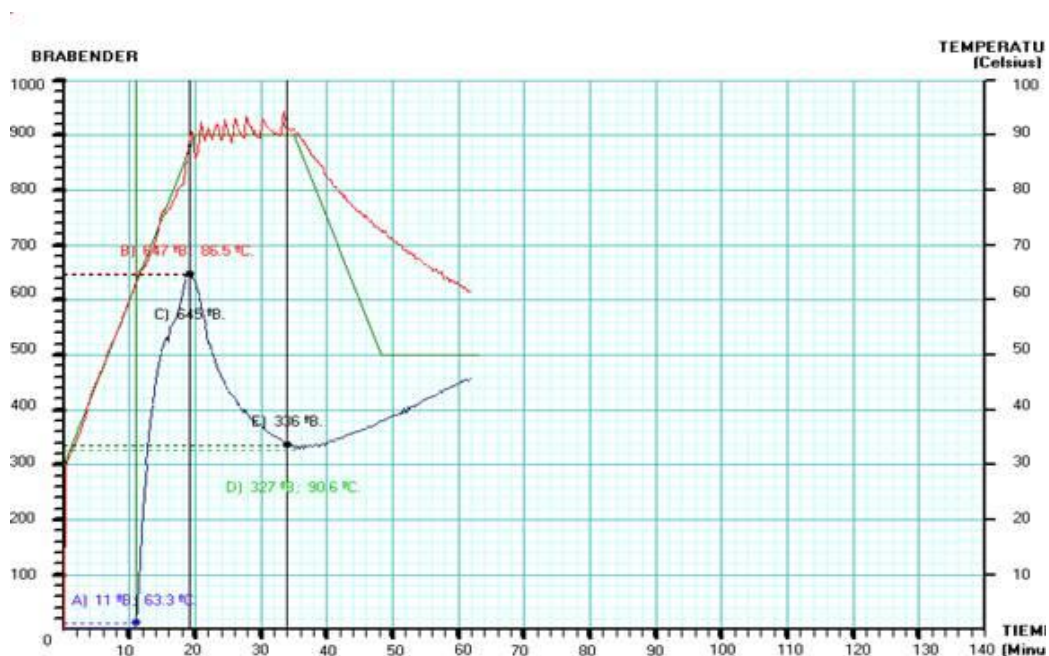
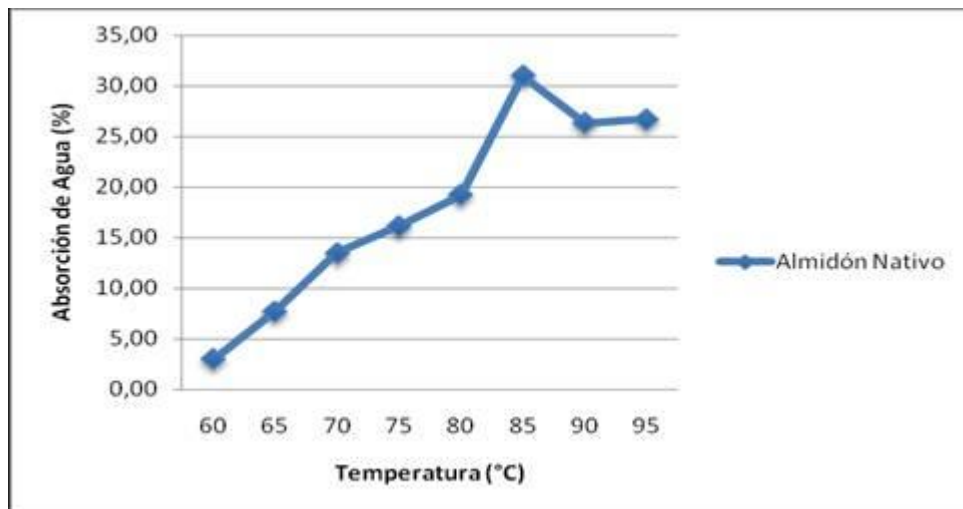


Fig. N°13. Amilograma del almidón nativo de yuca.

### **6.1.5- Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón Nativos**

Akalu y col. (1998), define al índice de absorción de agua como una medida de la cantidad de agua que puede retenerse dentro de los gránulos de almidón. Por esto, si se aumenta la temperatura de una solución de almidón aumentará la cantidad de agua absorbida con la consecuente hidratación de los gránulos de almidón, la liberación de su contenido interno al medio circundante, esto debido a la disolución de la molécula de amilosa y a la destrucción de la región cristalitos. La distribución del agua dentro del gránulo de almidón no es homogénea, ya que se encuentra una mayor cantidad de la misma en las regiones amorfas, que en la región de los cristalitos. En la Fig. N°14 se tiene un incremento de la absorción del agua a lo largo de todo el ensayo y que es proporcional al aumento de la temperatura. Este efecto podría relacionarse a la presencia de las zonas amorfas además de la fuerza de las uniones intramoleculares en el gránulo de almidón nativo; esto también se encuentra relacionado con el tamaño del gránulo de almidón puesto a que a menor tamaño del gránulo, mayor será la absorción del agua Niba y col. (2001).

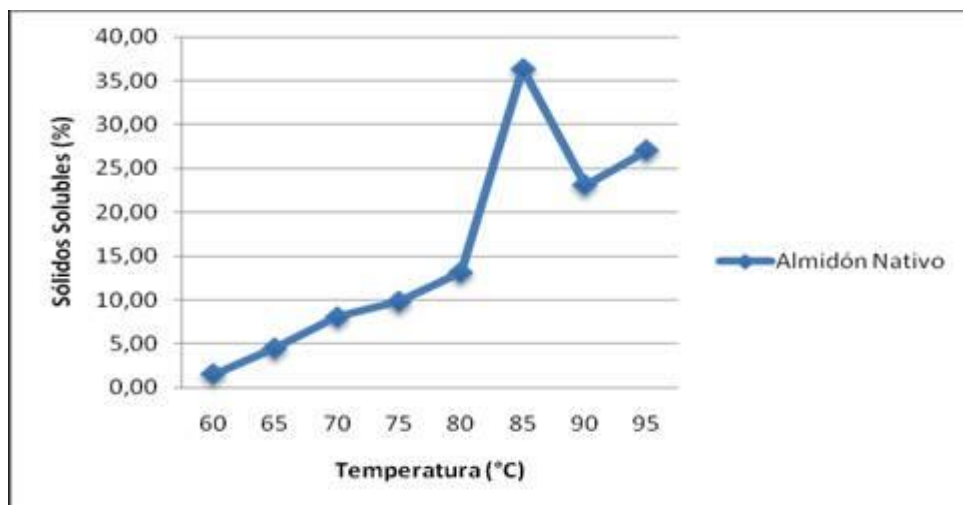
Requena y col. (2003) citado por Clemente, en el (2005), señala que la cantidad de agua que puede ser absorbida y retenida por las moléculas de almidón dependen de varios factores, como son la estructura química, el tamaño granular, la temperatura, así como el grado de entrecruzamiento y asociación molecular.



**Fig. N°14.** Absorción de agua (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.

Akalu y col. (1998), definen al índice de solubilidad, de acuerdo al nivel de solubilidad de los constituyentes disueltos en una solución. Yeh y Yeh, (1993) la utiliza para medir la estructura gránular. Durante el calentamiento, al mismo tiempo que la absorción de agua, el material se lixivia fuera de los gránulos de almidón; y esto va a depender de la cantidad de almidón y de las condiciones de calentamiento (Eliasson y Gudmundsson, 1996).

En la Fig. N°15 se evidencia el incremento de la cantidad de sólidos solubles en el medio, al incrementar la temperatura, cuyo compartamiento se puede relacionar también con el tamaño del gránulo de almidón ya que de este dependerá, en cierto modo, la facilidad de absorber agua del medio circundante, y con esto de disolver sus constituyentes (amilosa y amilopectina).

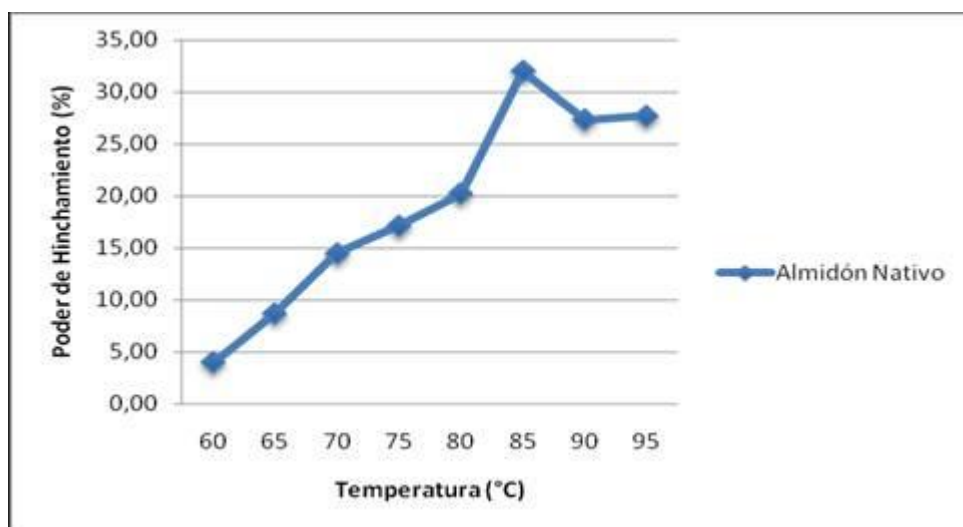


**Fig. N°15.** Sólidos solubles (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.

El poder de hinchamiento, es una propiedad que la amilopectina le confiere al gránulo y que la amilosa actúa como un diluyente e inhibidor de este proceso (Testor y Morrison citado por Yeh y Li, 1996). El hinchamiento del gránulo de almidón se evidencia por el aumento de volumen del mismo y las regiones amorfas adyacentes a la zona cristalina (Yeh y Li, 1996).

El hinchamiento comienza en las regiones intercristalinas amorfas y menos organizadas. A medida que esta fase progresa, se ejerce una tensión sobre los cristales vecinos y los mismos tienden a desorganizarse. El calentamiento adicional conduce a la disociación de las regiones con doble hélice y se rompe la estructura cristalina de la amilopectina. Las cadenas liberadas de la amilopectina se hidratan e hinchan lateralmente, causando la desorganización adicional de la estructura cristalina (Hari y col. 1989 citado por Pereira (2004) y por Clemente, (2005).

En la Fig. N°16 se distingue un incremento del poder de hinchamiento de los gránulos de almidón con el aumento de la temperatura y con un mayor incremento de la misma a partir de los 80°C, un comportamiento similar al de la solubilidad del mismo. Wankede y Umadevi, (1981), señalan que la solubilidad y el hinchamiento, incrementan debido a la disociación de los enlaces de H<sub>2</sub> de la molécula líneal del almidón; al elevarse la temperatura se acelera la relajación de las fuerzas dentro del gránulo, la molécula adquiere una disposición que facilita la penetración del agua dentro de la matriz gránular, lo que resulta en un incremento del poder de hinchamiento del almidón.



**Fig. N°16.** Poder de Hinchamiento (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo de yuca.

## 6.2- Modificación química del almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*).

### 6.2.1- Formulaciones

Varios estudios se han enfocado en la utilización del almidón no modificado, por ser un producto biodegradable, con características no tóxicas, de naturaleza abundante y de bajo costo. El almidón nativo es usado actualmente en la industria como recubrimientos, textiles, alfombras, aglutinantes, absorbentes, entre otros (Whistler y BeMiller, 1984; Whistler y col. 1984).

Sin embargo, el uso del almidón sin modificar es limitado debido a: su alta higroscopicidad, las escasas propiedades para ser procesado, debido a su alta viscosidad, así como su incompatibilidad con algunos solventes y polímeros (Fang y col. 2002; Gong y col. 2006; Jyothi y col. 2005; Santayanan y Wootthikanokkhan, 2003). Debido a las limitaciones de los almidones en cuanto a propiedades mecánicas y químicas, y su fácil degradación, se realizan modificaciones, que pueden por tres métodos: reacciones de cambios de tipo físicos, químicos y microbianos o por una combinación entre estas.

Teniendo en cuenta los parámetros establecidos en la metodología descrita por Whistler y Paschall (1964), se modificó el almidón químicamente (metilación). Para ello se partió de una relación de 1mL/3g respecto a la cantidad de Dimetil sulfóxido (DMSO) en primera instancia, además de Dimetil Sulfato ( $\text{DMSO}_4$ ) y de almidón respectivamente, esto con el fin de establecer una relación acorde con lo señalado por los autores antes mencionados. En segunda instancia y siguiendo la metodología descrita para tales fines, se incrementó la cantidad de reactivo

manteniendo constante la cantidad en gramos de la muestra a modificar, esto con el fin de poder establecer diferencias entre las formulaciones y de tal forma, de tener una base inicial para conocer las variables que se van a cambiar a fin de obtener la mejor formulación, para así cumplir con los objetivos establecidos.


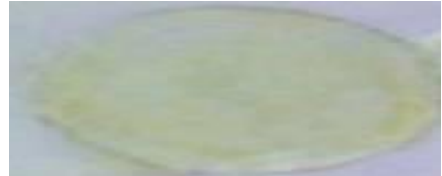

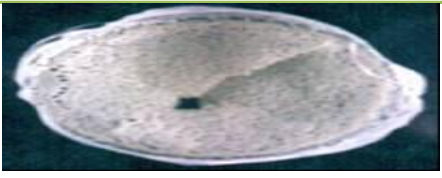

### **6.2.2- Formulaciones con Dimetil Sulfóxido (DMSO)**

Se trabajó con varias formulaciones variando tanto la cantidad en gramos del almidón a modificar como el volumen del reactivo requerido; los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas de forma detallada. Cabe señalar que en los tres primeros ensayos (a, b, c) se trabajó con papel de cera como medio de soporte para el secado del almidón modificado a fin de evitar que la película formada se adhiriera a la cápsula de plástico, pero los resultados obtenidos no fueron aceptables ya que se obtuvo una fuerte unión entre la película y el papel no pudiéndose distinguir entre el almidón modificado y el papel empleado. De acuerdo a los primeros resultados obtenidos y señalados en la Tabla N°5; se repitió nuevamente el ensayo con la diferencia de que no se utilizó el papel para el secado del almidón modificado; es decir, 14mL de la solución obtenida una vez metilado el almidón se añadió directamente sobre la cápsula de secado. Se obtuvo, bajo estas condiciones, una película (d) muy frágil, con presencia de burbujas de aire, esto posiblemente debido a la cantidad de cloroformo utilizado, puesto que debido a su alta volatilidad, tiende a evaporarse formando un número considerable de burbujas quedando algunas atrapadas entre




la película de almidón modificado. El color apreciable fue amarillo el cual se mantuvo para cada una de las formulaciones antes señaladas. No obstante cabe destacar que para la formulación de 3g/9mL de almidón y de dimetil sulfóxido respectivamente: se obtuvo una película con las características de plasticidad que se esperaba ya que a pesar de las observaciones antes mencionadas, ésta presentó una apariencia semejante a un plástico, que se desprende fácilmente de la cápsula aunque todavía bastante frágil como se puede observar en la imagen referente a este ensayo (e).

**Tabla N°5:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL y 9mL Dimetil Sulfóxido.

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
a	3	1	10	10,60	
b	3	9	10	10,67	
c	6	9	10	10,77	
d	3	1	10	10,67	
e	3	9	10	10,56	

Teniendo en cuenta la fragilidad de la película del almidón modificado formada en los ensayos anteriores (b) se realizó un duplicado de una de las formulaciones iniciales realizadas en papel (6g/9mL) como se señala en la tabla N°6 (imagen f) esto con el fin de establecer diferencias por la ausencia del papel. Se obtuvo una película no homogénea, de color blanco, con el almidón formando grumos. Lo que permite inferir que tiende a haber un exceso de almidón por lo que no se alcanza un nivel de sustitución que produzca una película rígida y de carácter plástica; también producto de la formación de una pasta muy viscosa que impidió la agitación de la mezcla a fin de garantizar una buena homogenización.

**Tabla N°6:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca con 9mL Dimetil Sulfóxido, aumentando la cantidad en gramos de almidón.

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
f	6	9	10	13,97	
g	6	9	10	13,96	

Resulta de gran importancia mantener una agitación rigurosa y constante de las mezclas al momento de establecer una reacción de este tipo (metilación), ya que garantizará que la reacción se produzca de manera eficiente. Es igualmente importante que la mayoría los gránulos de almidón estén en contacto con un gran número de moléculas del reactivo, a fin de establecer un mayor número de enlaces entre dichas moléculas y los grupos hidróxilos expuestos en la

molécula de almidón. Se puede notar una diferencia marcada en la tabla N°7 respecto a la imagen (j) de la formulación de 6g/9mL, y la correspondiente a la misma formulación (f) en la tabla antes discutida (tabla N°6), con lo cual se pone de manifiesto una mayor homogenización de la mezcla; no presentando ésta, grumos ni burbujas en la película obtenida; sin embargo, la misma era muy frágil y difícil de separar de la cápsula de secado.

Al incrementar la cantidad de reactivo (DMSO) manteniendo la cantidad en gramos iniciales del almidón (3g/12mL) como se puede ver en la imagen (i) de la tabla N°7, este tendió a formar una fuerte adherencia entre la película y la cápsula, no pudiendo desprenderla de la misma, además de observarse una pequeña deformación en la cápsula de secado, esto pudo ser debido a que se produjo algún tipo de reacción entre el reactivo empleado y la cápsula de secado o por la adición en exceso de uno de los grupos activos.

Por otro lado al repetir la formulación (e) que arrojó los resultados esperados inicialmente (3g/9mL), se obtuvo un mejoramiento de esta formulación, produciéndose una película (h\*) con mejores características: fue translúcida, fácil de despegar, además de una gran semejanza a una película de acetato pero con una alta fragilidad.

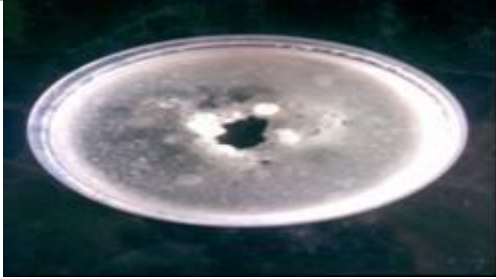
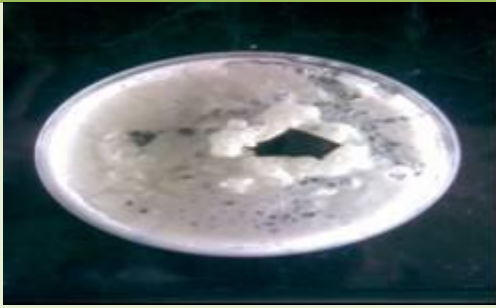
**Tabla N°7:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a un alto volumen (9 y 12mL) de Dimetil Sulfóxido.

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
h*	3	9	10	10,18	
i	3	12	10	10,31	
j	6	9	10	10,64	

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (rígidas) para el reactivo empleado.

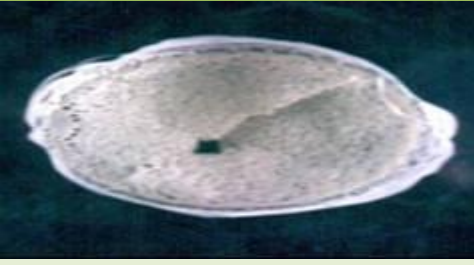



La tabla N°8 muestra la ruptura de las cápsulas de secado para el almidón metilado, esto debido al incremento del volumen del reactivo, pudiéndose afirmar que se está produciendo, tal y como se mencionó anteriormente, algún tipo de interacción entre el reactivo empleado (DMSO) y la cápsula de secado, además de la presencia del cloroformo, un solvente orgánico del poli-estireno (material de las cápsulas).

**Tabla N°8:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca variando el volumen (2 y 10mL) de Dimetil Sulfóxido.

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
k	3	2	10	10,80	
l	3	10	10	10,76	
m	6	10	10	10,97	

Si bien el tiempo y temperatura de reacción influyen sobre la modificación de los gránulos de almidón; también la película, se puede ver afectada por la temperatura de secado (45°C); un incremento en el tiempo de exposición bajo dichas condiciones de temperaturas influye considerablemente en la apariencia de la película obtenida (quemándose), lo que afecta la textura. Se concluye que se debe ser muy rigurosos con el tiempo de secado de las mismas, esto se puede evidenciar en la imagen (n) referente a la formulación 6g/9mL en la tabla N°9 y cuya formulación se ha discutido previamente.

**Tabla N°9:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a volúmenes iniciales (9 y 1 mL) de Dimetil Sulfóxido




Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
n	6	9	10	13,46	
ñ	6	1	10	13,72	
o	3	1	10	13,78	
p	3	1	10	13,96	

Por otra parte, teniendo en cuenta la adherencia del almidón modificado con las cápsulas de plástico, para el secado de las mismas se trabajó con cápsulas de vidrio en las siguientes formulaciones (ñ, o, p) y señaladas en la tabla N° 9. Se obtuvo una mayor adherencia con el vidrio siendo muy difícil separar la película de almidón formada, además de que no se observó en este ensayo una película

homogénea luego del secado. Aquí es interesante, señalar que se originaron reacciones entre la solución del almidón modificado y el vidrio durante el secado, lo que es muy importante investigar.

Como se ha mencionado con anterioridad, el tiempo de secado juega un papel importante en la obtención de las películas de interés, como se observa en las imágenes de la tabla N°10. Las películas obtenidas presentaron una coloración marrón, pudiéndose separar de las cápsulas con una gran dificultad y no se pueden establecer diferencias entre las mismas.

**Tabla N°10:** Formulaciones probadas para la modificación del almidón nativo de yuca a con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfoxido.

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
q	3	1	10	13,73	
r	6	1	10	13,80	
s	6	9	10	13,95	

### 6.2.3- Formulaciones con Dimetil Sulfato (DMSO<sub>4</sub>)


En las siguientes formulaciones se trabajó con Dimetil Sulfato bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, variando en este caso la cantidad de cloroformo empleado, ya que por los resultados obtenidos en los experimentos realizados con DMSO y señalados al inicio, este tiene un efecto considerable sobre la cápsula de secado, como se puede observar en las imágenes anteriores (Tabla N°8), en donde se nota perforaciones y deformaciones de las mismas. Además que el cloroformo por ser un compuesto muy volátil y bajo las condiciones de temperatura a la cual es expuesta la película, tiende a formar una gran cantidad de burbujas producto de su evaporación, quedando en su mayoría atrapadas dentro de la estructura de la película formada.

Se realizaron diferentes formulaciones, repitiendo las mismas condiciones iniciales, donde se obtuvieron diferencias bien marcadas respecto a la cantidad en gramos del almidón empleado y del volumen del reactivo, esto se puede ver reflejado en las imágenes de la tabla N°11, donde para la formulación (A) de 3g/1mL del almidón nativo y de DMSO<sub>4</sub> respectivamente, la película obtenida presentó una apariencia algo plástica pero con una fuerte adherencia a la cápsula utilizada, como medio de soporte para el secado. Adicionalmente, la película era muy frágil al tacto y con presencia de un número significativo de burbujas en toda su superficie. En la siguiente formulación (B), se puede notar claramente que al aumentar el volumen del reactivo (9mL) manteniendo la misma cantidad en gramos del almidón (3g) no se formó una película de apariencia plástica, sino por el contrario se obtuvo el almidón de apariencia semejante al almidón nativo (en



polvo). Se puede inferir que no se produjo una sustitución completa de los gránulos de almidón, por los grupos metilos presentes en solución. Esto se puede afirmar, ya que al momento de realizar los diferentes lavados, el reactivo se eliminaba por completo del medio de reacción, lo que se evidenció por el color del agua de descarte (amarilla) y en el pH obtenido. Se encontró que para las formulaciones de menor volumen del reactivo (1mL) presentó valores de pH básico a diferencia de los de mayor volumen de DMSO<sub>4</sub> (9mL) donde se obtuvo valores de pH ácido.



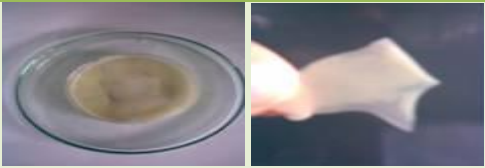

**Tabla N°11:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfato.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
A	3	1	1	13,68	
B	3	9	1	3,7	

Debido a los resultados obtenidos y señalados en la tabla anterior, se realizó un duplicado de los mismos (C,D), a fin de corroborar lo antes expuesto. Se puede ver el mismo comportamiento de las películas en las cápsulas de

secado; siendo estas muy difíciles de separar de las mismas; con alta fragilidad para la formulación de bajo volumen (1mL) de DMSO<sub>4</sub>, y de apariencia semejante al almidón nativo para un mayor volumen del mismo (9mL). Este comportamiento también se pudo observar en las otras dos formulaciones señaladas en dicha tabla (E, F), pero es importante resaltar que la película obtenida (E) con 6g/1mL de DMSO<sub>4</sub>, mostró una textura mucho más rígida comparada con las obtenidas hasta el momento, pero su apariencia no era característica de una película homogénea (tabla N°12). Se observaron gránulos de almidón poco dispersos, esto producto de una escaza agitación de la mezcla al momento de realizar la modificación del mismo.





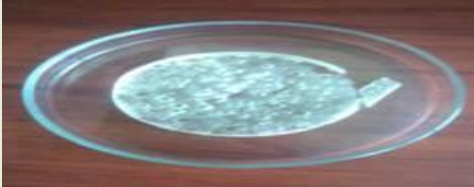
**Tabla N°12:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca duplicando la cantidad en gramos de almidón nativo con 1mL y 9mL de Dimetil Sulfato.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
C	3	1	1	12,84	
D	3	9	1	4,24	
E	6	1	1	13,87	
F	6	9	1	3,06	

En la siguiente tabla N°13 se pone de manifiesto los puntos discutidos hasta el momento; es decir, se puede ver claramente que para cada una de las formulaciones realizadas y cuyo volumen de DMSO<sub>4</sub> es >1mL (H, I, J) no se obtienen las películas esperadas (de textura plástica); sino que, por el contrario, se mantiene el almidón en polvo y de color blanco, característico del almidón nativo, ello también se ve reflejado en los valores de pH obtenidos, siendo estos de carácter ácido (pH<7), esto, tal y como se señaló anteriormente, pudo deberse a una mala homogenización de la mezcla de reacción, por lo que el reactivo tendió a extraerse por completo del medio de reacción al momento de realizar las diferentes centrifugaciones a fin de descartar el exceso de sulfato de bario.

Respecto a las formulaciones en las cuales el volumen de DMSO<sub>4</sub> empleado era igual a 1mL (G, K), se puede notar una clara diferencia respecto a las anteriores. Estas presentaron una apariencia plástica, pero difieren entre ellas; ya que cuando se aumenta la cantidad en gramos de almidón nativo, la mezcla tiende a tomar una consistencia bastante viscosa imposibilitando la agitación uniforme de toda la mezcla. Por lo que, se obtiene una película no homogénea; ya que los gránulos de almidón no se dispersaron adecuadamente a lo largo de la misma, como se puede apreciar en las imágenes de las dos formulaciones respectivas para tal volumen en la tabla antes señalada.

**Tabla N°13:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca variando tanto la cantidad en gramos de almidón nativo como el volumen (1mL, 9mL y 5mL) de Dimetil Sulfato.


Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
G	6	1	1	12,85	
H	6	3	1	2,31	
I	6	5	1	4,50	
J	3	5	1	4,51	
K	9	1	1	13,1	

Como se ha señalado previamente es indispensable mantener una agitación constante al momento de realizar la mezcla; ya que ello garantizará la homogeneidad de la película de almidón modificado (tabla N°14). Si se disminuye la cantidad de almidón a modificar (de 6g a 3g), se obtiene una película menos rígida. Por lo tanto, basado en los resultados obtenidos para las distintas formulaciones, se selecciona a la formulación (L) de 6g/1mL de almidón nativo y

DMSO<sub>4</sub> como la ideal para los fines establecidos en este trabajo (obtención de un material de empaque con aplicaciones biomédicas).

Por otra parte, teniendo en cuenta los rangos de pH obtenidos en las distintas formulaciones; así como también, la aplicabilidad del material de empaque obtenido (en alimentos), se consideró la neutralización con ácido sulfúrico 0,5N (Sívoli, 1995), para destruir el exceso de bario adherido y para disolver algún precipitado de almidón. Cabe destacar que la adición de esta solución no influye sobre la textura de la película obtenida, sino en el color de la misma, es decir tiende a ser un poco más translúcida.



**Tabla N°14:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con volumen constante (1mL) de Dimetil Sulfato y a pH neutralizado.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
L	6	1	1	6,76	
M	3	1	1	7,05	

Finalmente y considerando cada uno de los resultados obtenidos para las diferentes formulaciones, se afirma la escogencia de la formulación (N\*) de 6g/1mL de almidón nativo y de DMSO<sub>4</sub> respectivamente; ésta es la que nos proporcionaba los mejores resultados, los cuales se pueden observar en las

imágenes presentadas en la tabla N°15. En esta tabla se observan películas translúcidas, de textura semejante a un plástico, pero con poca flexibilidad. Es importante destacar en este punto, y de acuerdo con los resultados obtenidos con el empleo de cloroformo a lo largo de los ensayos, donde este por ser un compuesto de carácter volátil forma un número considerable de burbujas producto de su evaporación, se decidió eliminarlo de la formulación, permitiendo así, obtener películas más uniformes en toda su superficie, que se desprenden con suma facilidad de la cápsula de secado.

**Tabla N°15:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con cantidad en gramos de almidón nativo y volumen constante (1mL) de Dimetil Sulfato y a pH neutralizado; sin cloroformo.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Observaciones
N*	6	1	0	6,62	
Ñ	6	1	0	6,62	

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (rígidas) para el reactivo empleado.

La utilidad de las películas plásticas es extender principalmente la vida de anaquel y la calidad de los alimentos, ya que proveen una barrera al vapor de agua y al oxígeno, como también ayudan a prevenir cambios en su apariencia, textura, aroma y sabor. De acuerdo a las condiciones de humedad relativa (HR), estas películas proporcionan buenas propiedades de barrera de transferencia a los gases, pero pobres propiedades de barrera al vapor de agua (Guilbert, 1986; Kester y Fennema, 1986).

La materia prima más usada en la elaboración de películas es el almidón, ya que este reúne una serie de características específicas que lo hacen insumo importante, como lo es ser biodegradable, renovable, barato, abundante y relativamente fácil de manejar (Lourdin y col. 1995). Las películas de almidón se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el alimento, más que retardar la pérdida de humedad debido a sus características hidrofílicas (Krochta y Mulder-Johnston, 1997). El carácter hidrofílico de estas películas les confiere un aspecto quebradizo causado por las altas fuerzas intermoleculares; las cuales se pueden ver reducidas, con el empleo de plastificantes, ya que estos aumentan los espacios intermoleculares. Los plastificantes más usados en las películas de almidón son el sorbitol y el glicerol (Mali y col. 2005).

El glicerol mejora la movilidad de las cadenas de almidón, produciendo una disminución en las fuerzas moleculares que mantienen unidas las cadenas (García y col. 2000; Stading y col. 2001; Arvanitoyannis y Biliaderis, 1999).

Las propiedades de resistencia mecánica y flexibilidad del almidón, dependen tanto de la resistencia y carácter de la región cristalina, como del tipo

de planta, distribución del peso molecular, grado de ramificación y proceso de conformación (Lorcks, 1998; Chaléat, Halley y Rruss, 2008).

#### **2.2.4- Formulaciones con Glicerol**

En la tabla N°16 se presentan las distintas formulaciones realizadas con la adición de glicerol como plastificante, a fin de impartirles mayor flexibilidad a las películas obtenidas y señaladas con anterioridad, cabe destacar que se trabajó con el reactivo de interés Dimetil Sulfato ( $\text{DMSO}_4$ ), así como también se trabajó a pH básico, a fin de poder establecer diferencias con respecto a las películas rígidas obtenidas inicialmente.

Respecto a las tres primeras formulaciones (Fa, Fb, Fc) señaladas en la tabla N°16; en la primera de ellas (Fa) una vez obtenido el almidón modificado este se solubilizó (2,6g de almidón modificado/50mL de agua) calentando la solución, posteriormente a dicha solución se le añadió 3mL de glicerol y 0,2mL de aceite vegetal, se dejó secar 24h. La película obtenida como se puede ver en la imagen respectiva, se fragmentó formando grumos, con gránulos de almidón no homogéneos, fuerte adherencia a la cápsula de secado y además presentó un color marrón. De acuerdo a estos resultados en la segunda formulación (Fb) se pulverizó el almidón modificado (2,6g almidón modificado) y se añadieron en 50mL de agua calentando dicha solución a fin de garantizar la solubilización de los gránulos de almidón. A la solución formada se le añadieron 2mL de glicerol y no se le adicionó el aceite vegetal. De esta formulación, se obtuvo una película flexible, homogénea, pero muy pegajosa que tiende a deformarse al momento de



retirla de la cápsula de secado. La tercera formulación (Fc) presentó las mismas características de la anterior. Para las últimas tres formulaciones (Fd, Fe, Ff) se trabajó con un volumen menor de glicerol a fin de de obtener películas menos pegajosas, sin embargo, las películas obtenidas aún resultaron ser muy pegajosas; esto puede deberse a que la cantidad de glicerol empleado como plastificante no fue el indicado para dicha solución. El glicerol actúa como un agente lubricante, permitiendo que las moléculas deslicen unas sobre las otras libremente; así como también, la cantidad en exceso del mismo, tiende a exudar con el tiempo o a migrar de un plástico a otro. La actuación del plastificante puede ser como un solvente parcial de resina, rompiendo algunos de los enlaces polímero/polímero y sustituyéndolo por polímero/plastificante. Un plastificante normalmente es utilizado para polímeros que presenten fuertes enlaces polares, que tienden a tornarlos duros y quebradizos con dificultad de ser moldeados. La eficiencia de un plastificante está determinada por la concentración necesaria para conferir un cierto grado de flexibilidad.

**Tabla N°16:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 6 y 3 gramos de almidón, para volúmenes de 9mL y 1mL de Dimetil Sulfato, y en adición de 3, 2 y 1mL de glicerol.

Modificación del almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)  
por metilación para aplicaciones en alimentos y biomedicina. Caraballo, (2011)

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Glic. (mL)	Observaciones
Fa	6	9	10	13,95	3	
Fb	6	9	10	13,96	2	
Fc	6	9	10	13,46	2	
Fd	6	1	10	13,72	1	
Fe	3	9	10	10,18	1	
Ff	3	1	10	13,96	1	



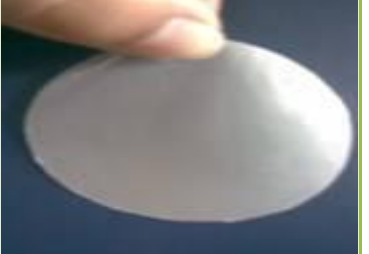
En las formulaciones señaladas en la tabla N°17 con DMSO<sub>4</sub> a pH neutro (pH≈7), se tiene que para la primera (Fg) formulación (3g almidón/1mL DMSO<sub>4</sub>) el

volumen empleado de glicerol (0,25mL) fue inferior comparado con las anteriores. Esto con el fin de obtener una película menos pegajosa, sin embargo esta no resultó ser la concentración adecuada ya que no se obtuvo el carácter de flexibilidad que se persigue con la adición de plastificante. En las dos últimas formulaciones (6g almidón/1mL DMSO<sub>4</sub>) si se obtuvieron las películas de carácter flexible (Fh, Fi), y de textura plástica no pegajosa, la cual mantiene su forma al momento de separarla de la cápsula de secado con suma facilidad, por lo que se concluye que ésta formulación (Fi) 6g almidón/1mLDMSO<sub>4</sub>/0,5mLGlic. como la idónea para obtener el material de empaque de carácter flexible que se persigue.

Cabe destacar que los plastificantes ideales deben ser permanentes, eficientes y compatibles con la resina, debe también ser inoloro, insípido, no tóxico, no inflamable, estable al calor y debe facilitar el procesamiento.

**Tabla N°17:** Formulaciones empleadas en la modificación del almidón nativo de yuca con 1mL de Dimetil Sulfato, a pH neutralizado y en adición de 0,25mL y 0,5mL de glicerol y a pH neutralizado.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Glic. (mL)	Observaciones
-------	-------------	------------------------	-----------------	----	------------	---------------

<b>Fg</b>	3	1	0	7,05	0,25	
<b>Fh</b>	6	1	0	6,76	0,5	
<b>Fi*</b>	6	1	0	6,62	0,5	

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (flexibles) para el reactivo empleado.

La modificación química de los almidones está directamente relacionada con las reacciones de los grupos hidroxilo libres de las unidades de anhidroglucosa que forman el polímero de almidón, estando éste formado por una mezcla de dos compuestos, amilosa y amilopectina, que sólo difieren en su estructura. Las propiedades y características del almidón de distintos cereales y tubérculos son función de la proporción relativa de su contenido en amilosa y amilopectina. La influencia de este último constituyente es importante; ya que cuanto mayor es el contenido de amilopectina, el producto resulta más adhesivo, característica que se aprovecha extensamente como agente espesante,

estabilizante y adhesivo tanto en la industria alimentaria como en otras industrias (Yufero, 1998).

La amilosa es un polímero lineal de residuos de D-glucosa, unidos por enlaces  $\alpha$  1,4. En los gránulos de almidón, este polímero está presente bajo forma cristalizada, debido principalmente al gran número de enlaces de hidrógeno existentes entre los grupos hidroxilo. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. La amilopectina se diferencia de la amilosa por ser un polímero ramificado de D-glucosa. Los enlaces son del tipo  $\alpha$ 1, 4, salvo a nivel de las ramificaciones, donde son del tipo  $\alpha$ 1, 6.

En la molécula de almidón, la unidad de anhídrido glucosa (UAG) tiene tres grupos hidroxilos (-OH) susceptibles de ser sustituidos en C2, C3 y C6, por lo que el grado de sustitución (GS) máximo es de tres (Wurzburg, 1964; Rutenberg y Solarek, 1984; Jarowenko, 1986). Los grupos -OH libres tienen diferente reactividad, el -OH en el C6 es el más reactivo en solución, (Rutenberg y Solarek, 1984; Mark y Mehlretter, 1972; Singh y col. 2007), pero en forma granular el C2 es el más reactivo. Los almidones con bajo GS son comúnmente utilizados en la industria de los alimentos ya que proporcionan consistencia, textura y estabilidad; los almidones con alto grado de sustitución son utilizados como sustitutos del acetato de celulosa termoplástico (Xu y col. 2004; de Graaf y col. 1995). En investigaciones recientes, los acetatos de almidón (con bajo y alto grado de

sustitución (GS) han sido utilizados como materiales de empaque biodegradables en alimentos y aplicaciones farmacéuticas (Heins y col. 1998; Santayanan y Wootthikanokkhan, 2003; Elomaa y col. 2004; Xu y Hanna, 2005; Chen y col. 2007). Durante la metilación; como en cualquier reacción química, tanto el número de grupos metilo que son incorporados a la molécula de almidón, así como la velocidad y eficiencia de la reacción, dependen de la concentración y tipo de reactivo, también del pH, presencia de catalizador, tiempo de reacción, origen botánico del almidón, características estructurales y tamaño del gránulo. Xu y col. (2004) evaluaron el GS y la eficiencia de la reacción como una función del tiempo, durante la acetilación de almidón de maíz con alto contenido de amilosa; el GS máximo (2.7) se obtuvo a 4 horas. El almidón de plátano acetilado tuvo menor GS que el almidón del maíz, pero se obtuvieron propiedades funcionales similares en ambos almidones (Bello y col. 2000). En nuestro estudio, por su parte no se puede hacer referencia sobre el grado específico de sustitución del almidón modificado obtenido, ya que para ello se deben realizar una serie de ensayos que permitan proyectar dicho valor; como por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta metodología es una buena herramienta para el estudio molecular, estructura y dinámica de los sólidos, tales como polímeros y biomateriales. Así mismo, se puede conocer los valores de sustitución molar (MS) por el método de Morgan Zeisel y por medio de un monoanálisis del sacárido. El ensayo de Morgan Zeisel se fundamenta en la ruptura del éter con yoduro de hidrógeno, resultando en la formación de yoduro de metilo. La formación del yoduro de metilo está regida por el flujo de  $\text{CO}_2^-$  dentro de una trampa con  $\text{Ag(I)}$ -metanol en solución, determinándose posteriormente el remanente de  $\text{Ag(I)}$ . Para el análisis de

monosacáridos, las muestras se someten a metanólisis y trimetilsililación, para determinar los monómeros metilados de glucósidos que finalmente son caracterizados por espectrometría de masas acoplados a cromatografía de gases (GLC-MS). Sin embargo, se estima que para el almidón modificado obtenido en nuestro caso, este presentó un bajo grado de sustitución, en un tiempo de reacción de 24h como se señaló en la metodología. Hug, citado por Whistler y Paschall, (1967) señalan que valores menores de 0,2 se consideran como bajo grado de sustitución. El grado de sustitución en la molécula de almidón indica el número promedio de sustituciones por unidad de anhídrido glucosa, lo cual se relaciona directamente con la modificación química. La esterificación de los polisacáridos con ácidos orgánicos y derivados del ácido es una de las transformaciones más versátiles de estos biopolímeros (Heinze y col. 2006). Este tratamiento, induce cambios en las propiedades mecánicas, térmicas y además en el carácter hidrofílico del polisacárido. Se obtienen esteres de almidón generalmente por la reacción del almidón con donadores de acilo anhídridos o la reacción con acilos clorados y en presencia de solventes orgánicos (Kapuśniak, 2004).

### **6.3- Determinación de los parámetros del almidón modificado de yuca (*Manihot esculenta Crantz*).**

#### **6.3.1- Composición proximal y pureza del almidón modificado de yuca**

Una vez obtenida la formulación característica para la modificación del almidón se realizaron películas (rígidas sin glicerol), las cuales se molieron a fin de obtener el almidón en polvo. Con este polvo de almidón modificado se realizaron los diferentes análisis que permitieron establecer diferencias estadísticas entre el almidón nativo y el modificado respectivamente como se señalan en las siguientes tablas y figuras.

**Tabla N°18.** Análisis proximal y pureza del almidón modificado de yuca, con comparación estadística con el almidón nativo.

Análisis	Almidón Nativo	Almidón Modificado
<b>Humedad</b>	10,45±0,03 <sub>c</sub>	8,56±0,31 <sub>d</sub>
<b>Cenizas</b> <sub>a</sub>	0,22±0,01 <sub>c</sub>	23,69±0,62 <sub>d</sub>
<b>Proteína cruda</b> <sup>*</sup> <sub>a,b</sub>	ND	ND
<b>Grasa cruda</b> <sub>a</sub>	0,09±0,01 <sub>c</sub>	0,26±0,34 <sub>d</sub>
<b>Pureza</b>	99,69±0,02 <sub>c</sub>	76,05±0,65 <sub>d</sub>

Media ± desviación estándar n=3; a = % base seca; b = N x 6,25; letras iguales (c,d) en la misma fila indica que no existe diferencias significativas al nivel ( $p \leq 0,05$ ). ND= no detectado por el método.

De acuerdo al tratamiento de modificación empleado, el contenido de humedad presentó una ligera disminución respecto al almidón nativo y con diferencia significativa entre ellos a un valor de significancia de  $p \leq 0,05$ , pasando de (10,45±0,03) % a (8,56±0,31) %. Esta disminución es debida al tratamiento de modificación al cual fue sometido el almidón, ya que una vez realizada la mezcla con los diferentes reactivos, esta solución fue sometida de nuevo a tratamiento térmico (secado por 24h a 45°C) lo cual influye de manera directa en la disminución del contenido de humedad, así como también en el grado de interacción de las moléculas de agua con la materia sólida. Esta disminución del



contenido de humedad obtenido concuerda con lo conseguido por Sívoli, (1995), quien reportó un contenido de humedad que va desde 11,47% a 6,71% en almidones de maíz y de 15,06% a 5,85% en almidones de papas ambos modificados por metilación. La humedad de los almidones es dependiente de la humedad relativa de la atmosfera, en el cual se almacenan y la humedad de equilibrio de los mismos depende del tipo de almidón.

El contenido de cenizas incrementó drásticamente por el tratamiento de metilación, alcanzando valores de  $(23,69 \pm 0,62)$  % esto es debido a la introducción en la estructura molecular del gránulo de almidón, de numerables grupos químicos, los cuales incrementan significativamente la composición mineral del gránulo. Un incremento similar fue reportado por Sívoli, (1995) con un contenido de cenizas que va desde 0,2% a 31,11% y de 0,37% a 65,50% en almidones de maíz y de papas metilados.

Respecto al contenido proteico, este al igual que en el almidón nativo no fue posible determinarlo debido a que el equipo no presentó la sensibilidad requerida para su determinación; es importante señalar en este punto, que con el tratamiento de modificación química, al cual fue sometido el almidón no se incrementará el contenido de proteínas. Sin embargo a diferencia de ello Sívoli, (1995) señaló un contenido proteína en almidones metilado que varió de 0,83% a 0,46% y 0,48% a 0,32% de maíz y papa respectivamente. El contenido de proteína puede depender del origen botánico y del la eficiencia del método de extracción.

De acuerdo con la determinación del contenido de grasas este mostró un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de  $(0,26 \pm 0,34)$  %, comparado con el almidón nativo. Este aumento se pudo deber a la solubilización de algún contenido graso producto de los solventes empleados durante la metilación, también como consecuencia del error indeterminado. Por su parte Sivoli, (1995) reportó un contenido de grasas en almidones modificados por metilación que varió de 0,52% a 0,21% en almidón de maíz y de 0,02% a 0,08% en almidón de papa (nativos y modificados).

La composición química indica la pureza del almidón, y su consideración es importante al momento de evaluar las propiedades funcionales, ya que éstas pueden verse afectadas por ciertas impurezas presentes. El grado de pureza está determinado por el contenido de almidón, que para las muestras en estudio fue de  $(99,69 \pm 0,02)$  % y  $(76,05 \pm 0,65)$  % para el nativo y el modificado respectivamente y con una alta diferencia estadística entre ambos ( $p \leq 0,05$ ) producto de la modificación.

### **6.3.2- Determinación de los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón modificado.**

El pH y la acidez en los almidones, son indicadores del uso de aditivos, fermentación o aplicación de algún tipo de modificación. Los ácidos orgánicos presentes en los alimentos influyen en el sabor, color y en la estabilidad de los mismos. Así mismo, la acidez es una de los índices comunes de la materia prima vegetal, y la misma se debe a la presencia de determinados ácidos orgánicos, en proporciones variables. Por tanto, la determinación de la acidez constituye un índice de calidad importante, además, permite determinar si algún producto ha sufrido o no algún deterioro, ya sea de tipo físico-químico o microbiológico.

**Tabla N°19.** Características físicas y fisicoquímicas del almidón modificado de yuca y comparación estadística con el almidón nativo.

Análisis	Almidón Nativo	Almidón Modificado
pH	4,22±0,02 <sub>c</sub>	7,75±0,11 <sub>d</sub>
Acidez <sub>a</sub>	2,00E-04±1,1E0-08 <sub>c</sub>	3,73E-03±2,31E-04 <sub>d</sub>
Consistencia del Gel <sub>b</sub>	92,33±0,58 <sub>c</sub>	96,33±1,53 <sub>d</sub>

Media ± desviación estándar n=3; a=expresado como porcentaje de ácido málico; b= referido en cm; Letras iguales (c,d) en la misma fila indica que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ).

El presente estudio y específicamente el análisis del almidón modificado presentó un pH de 7,75±0,11, un significativo ( $p \leq 0,05$ ) aumento de pH (Tabla N°19), se debe a que la muestra modificada fue neutralizada con ácido sulfúrico, con el fin de destruir el exceso de sulfato de bario adherido y para disolver algún precipitado de almidón. Por otra parte el valor de la acidez titulable obtenido para el almidón de yuca, es considerablemente bajo ya que presentó un valor de 3,73E-03±2,31E-04 meq NaOH/g, y a pesar de ser estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) diferente al obtenido para el almidón nativo este también presentó una alta acidez. Tanto el

pH como la acidez concuerdan con lo reportado por Sívoli, (1995) para almidones modificado de maíz y de papa pasando de un pH de 5,30 a 6,00 y de 5,10 a 6,20; y de acidez  $1,9E-4$  a  $6E-4$  meq NaOH/g en el maíz;  $11E-4$  a  $6E-4$  meq NaOH/g en papa.

Respecto a la consistencia del gel, este está relacionado con el contenido de amilosa, la cual da una idea de la capacidad de formar geles más rígidos a temperatura ambiente (Whistler y Paschall, 1967). En este estudio se encontró que para el almidón modificado, la fuerza del gel fue de  $96,33 \pm 1,53$  mm significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) a lo obtenido para el almidón nativo (ver tabla N°19), y esto se nota en su recorrido en milímetros (mm). Por otra parte, la modificación del almidón influyó en la pérdida del orden molecular de las regiones cristalinas y amorfas. Estos resultados son muy similares a los reportados por Sívoli, (1995) en el estudio de la modificación de almidones de maíz y papa los cuales variaron de 145mm a 146mm y de 60mm a 146mm.

La modificación química afectó considerablemente el color del almidón, esto se pudo percibir a simple vista en las películas obtenidas para el almidón modificado, que una vez pulverizado los gránulos de almidón reflejaron una apariencia más oscura respecto al almidón nativo, en la tabla N°20 se constata esta diferencia de acuerdo al análisis del color por el sistema Hunter. El valor de  $L^*$  de  $39,03 \pm 0,65$  sugiere una tendencia de este almidón hacia el negro, a diferencia del nativo que se observa muy blanco; el parámetro  $a^*$  reflejado fue de  $-1,43 \pm 0,06$  (un valor negativo) lo que indica un matiz verde para este almidón, distinto del nativo que como se mencionó anteriormente reflejó un matiz rojizo. Por otra parte

se tiene que para  $b^*$  el valor obtenido fue negativo, igual a  $-1,07 \pm 0,35$  lo que indicó un matiz azul.

El color es un parámetro muy importante de las películas obtenidas puesto que este le podrá permitir ver a los consumidores lo que está comprando, además será más llamativo para su adquisición debido a que este le permitirá apreciar al consumidor el estado o calidad del producto contenido.

**Tabla N°20.** Parámetros para describir el color del almidón modificado de yuca y comparación estadística con el almidón nativo.

Parámetro	Almidón Nativo	Almidón Modificado RÍGIDO	Almidón Modificado FLEXIBLE
$L^*$	$97,10 \pm 0,04_a$	$72,18 \pm 2,24_b$	$39,03 \pm 0,65_c$
$a^*$	$0,03 \pm 0,01_a$	$2,53 \pm 1,66_b$	$-1,43 \pm 0,06_c$
$b^*$	$2,38 \pm 0,01_a$	$15,08 \pm 2,44_b$	$-1,07 \pm 0,35_c$

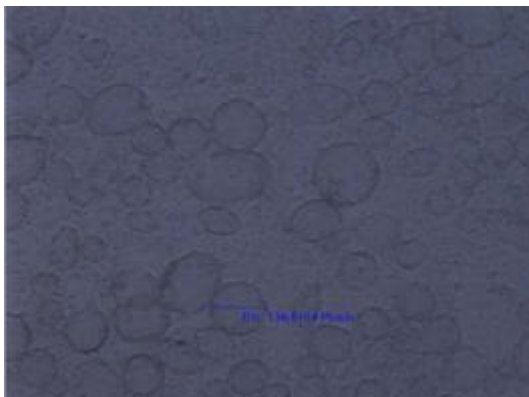
Media  $\pm$  desviación estándar  $n=3$ ;  $L^*$ : negro=0, blanco=100;  $a^*$ : + = rojo, - = verde;  $b^*$ : + = amarillo, - = azul. IB: índice de blanco; Letras iguales (a,b,c) en la misma fila indica que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ).

## 6.4- Características morfométricas del almidón modificado de yuca.

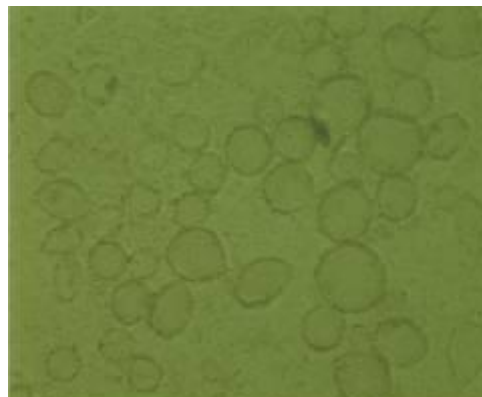
### 6.4.1- Microscopia de Luz polarizada

De acuerdo a la microscopia realizada para los almidones modificados de yuca, se observó (Fig., N°17) un ligero incremento de los gránulos de almidón con un promedio de 47  $\mu\text{m}$  a 72  $\mu\text{m}$ , esto debido a que al iniciarse el proceso de modificación (introducción de grupos metilos dentro de la molécula), se produce un aumento de tamaño en el gránulo. Estos incrementos son producto de la inclusión de los grupos metilo dentro de los gránulos de almidón, los cuales generan ciertas fuerzas de repulsión que pudieran aumentar los espacios inter e intra-moleculares permitiendo la inclusión de un mayor número de moléculas de agua. Igualmente se puede evidenciar que no hubo variación de la forma granular, ni lixiviación de material intra-granular por efecto del tipo de modificación al cual fue sometido. Sin embargo, y respecto a la disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón en el gránulo, específicamente el fenómeno de la cruz de malta, este no pudo ser observado en estos gránulos de almidones modificados, por lo que se infiere que desapareció durante la modificación, por tanto se presume que hubo alteración de la cristalinidad de los gránulos. Sívoli y col. (2008) señalaron que las características morfológicas, la estructura cristalina y la susceptibilidad a la hidrólisis fueron dramáticamente afectadas por el proceso de metilación y la MEB mostró gránulos más grandes sin integridad y con superficie rugosa debido a la exo-erosión, en estudios de modificación de almidón de maíz y papa. Resultados similares fueron reportados por (Sitohy y Ramadan, 2001).

a)



b)



100µm

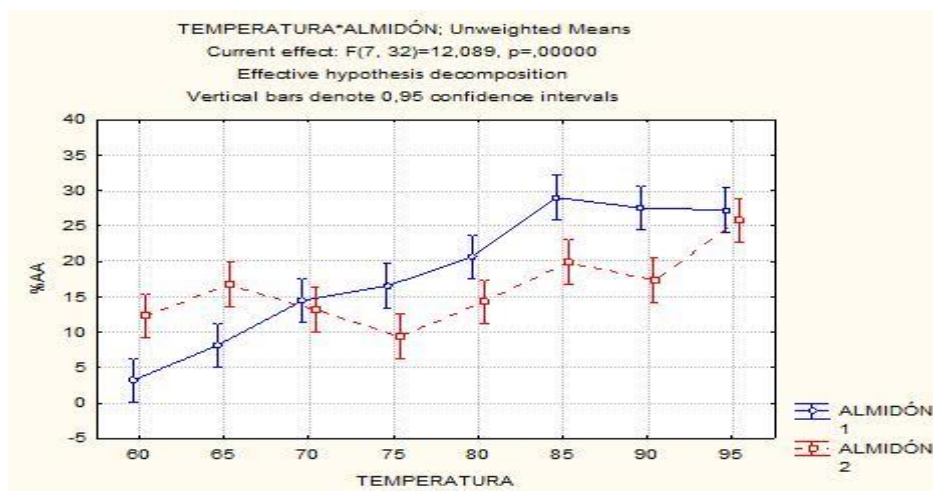
100µm

**Fig. N°17.** Almidón modificado de yuca visto por Microscopia Óptica con Luz Polarizada (100X).

Con la técnica antes señalada además de la microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia electrónica de transmisión entre otras, se evidencia el origen botánico de los gránulos de almidón. Los cuales tienen una forma y un tamaño definido atendiendo a su fuente. Es importante señalar que en algunas aplicaciones de almidones el tamaño y la forma definen el comportamiento del producto terminado. Por ejemplo en la Industria de cosméticos el tamaño es importante porque define la capacidad de mezclarse con los otros constituyentes del producto, otro ejemplo es en la aplicación de las técnicas de modificación, donde se ha evidenciado que los gránulos de menor tamaño son más fáciles de modificar. Por otra parte con estas técnicas podemos ver la pérdida de integridad de los gránulos reflejando la calidad del almidón por ausencia de gránulos dañados, almidón gelatinizado o retrogradado Sívoli y col. (2009).

#### **6.5- Absorción de agua, solubilidad y poder de Hinchamiento de los gránulos de almidón modificados.**

El tamaño estructural observado en estos gránulos de acuerdo a la técnica de microscopia, permitió diferenciarlos de los almidones nativos debido a su mayor tamaño. Si nos referimos al índice de absorción de agua, como se muestra en la fig. N°18, se puede observar como estos almidones modificados presentaron un menor porcentaje de la misma a los diferentes incrementos de temperatura, salvo al inicio donde este es mayor al almidón nativo debido a los efectos de la modificación. Kerr, 1950 señala, que para un relativo bajo grado de sustitución el metilalmidón es soluble en agua fría, pero insoluble en cloroformo y agua hirviendo, cuando se incrementa la cantidad de metóxilos, se incrementa la solubilidad en cloroformo, pero disminuye la solubilidad en agua.

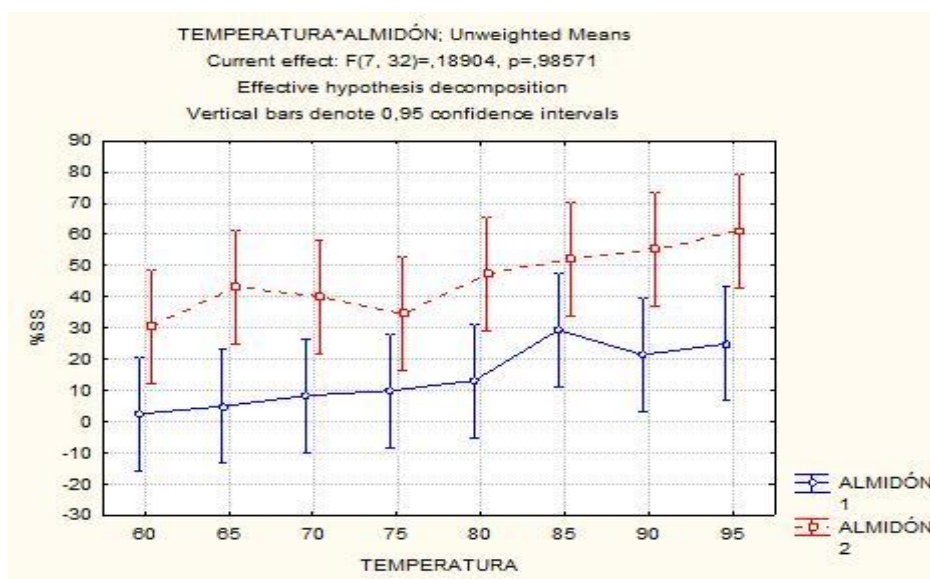


**Fig. N°18.** Curvas de Absorción de agua (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se distingue un menor porcentaje de absorción de agua en el almidón modificado respecto al nativo a lo largo de todo el ensayo.

En la figura N°19 se distingue un mayor porcentaje de sólidos solubles en el almidón modificado respecto al almidón nativo. Este mayor nivel de sólidos disueltos por efecto de la metilación pudiera atribuirse a la mayor de amilosa de



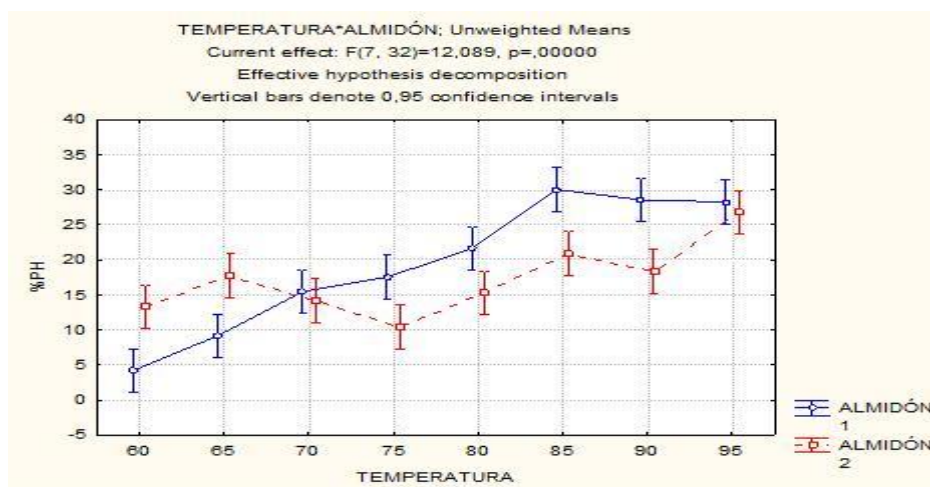
bajo peso molecular, incluyendo las que estén asociadas en las estructura cristalinas por efecto de la modificación. Estos resultados indican que la tasa de liberación aumenta con el grado de sustitución, ya que relativamente se ve aumentado el número de sólidos en solución (Van der Burt y col. 1999). La introducción de un grupo éster en el polisacárido constituye un desarrollo importante debido a que permitirá modificar la naturaleza hidrofílica y obtener cambios significativos en las propiedades mecánicas y térmicas.



**Fig. N°19.** Curvas de Sólidos solubles (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se evidencia un mayor porcentaje de sólidos solubles del almidón modificado a lo largo de todo el ensayo.

En la detrmínación del poder de hinchamiento (fig. N° 20), el almidón modificado presentó un menor porcentaje respecto al nativo, corroborando la teoría de la mayor asociación de enlaces a nivel de las moléculas de amilopectina,

impidiendo de esta manera que el gránulo se hinche; comportamiento similar al de la solubilidad para ambos con el incremento de la temperatura. Esta diferencia significativa es debida a la mayor disociación de los enlaces de hidrógenos presentes en las moléculas del almidón nativo los cuales se encuentran en menor proporción en las moléculas de almidón modificado debido a la sustitución marcada de los grupos hidroxilos presentes en el mismo, por lo que la molécula no permite la fácil penetración del agua dentro de la matriz gránular respectiva (esto a elevadas temperaturas y de acuerdo al grado de sustitución). Van der Burt y col. (1999), señala que en el agua fría los gránulos de almidón se hinchan y solubilizan de acuerdo a valores de sustitución por encima de 0,5 lo que puede ser atribuido a la pérdida total de cristalinidad.



**Fig. N°20.** Curvas del Poder de Hinchamiento (%) contra temperatura (°C), del almidón nativo (1) y modificado (2) de yuca. Se distingue un menor poder de hinchamiento del almidón modificado respecto al almidón nativo durante el ensayo.

## 6.6- Caracterización de las películas a base de almidón modificado

### 6.6.1- Grosor de las películas

La determinación del grosor de las películas es un parámetro muy importante dado su destacado papel en la protección del producto que se desea empacar, su resistencia a las manipulaciones, así como también su influencia en la capacidad de intercambio de vapor de agua.

En la tabla N°21 se muestran los valores promedios obtenidos para las diferentes películas siendo de  $0,17\pm 0,01$ mm y  $0,19\pm 0,02$ mm para las películas flexibles y rígidas respectivamente. Esta distinción es producto de la inclusión de nuevas moléculas a la estructura de la película flexible formada.

**Tabla N°21.** Grosor promedio de las formulaciones de las películas obtenidas.

Flexible-Grosor (mm)	Rígida-Grosor (mm)
$0,17\pm 0,01$	$0,19\pm 0,02$

Media  $\pm$  desviación estándar con n= 6

### 6.6.2- Propiedad Mecánica: Textura

La funcionalidad y propiedades del almidón, como la resistencia mecánica y la flexibilidad, relacionadas con el carácter de la región cristalina, dependen de la relación entre la amilosa y la amilopectina, del grado de ramificación y de la distribución del peso molecular (Reis y Cunha, 2005).

La capacidad de un material en descomponerse en el tiempo por la acción enzimática de microorganismos en metano, dióxido de carbono, agua y componentes orgánicos, es lo que se conoce como biodegradabilidad (ASTM,

D5488-94d). El tamaño y grado de modificación de los polímeros como el almidón, influyen en las propiedades mecánicas, particularmente en la fuerza de tensión y la elongación al rompimiento. Se ha encontrado que la velocidad de la biodegradación desciende con un incremento del grado de esterificación (Kapuśniak, 2004). Algunos polímeros varían en el tiempo de biodegradación, encontrándose entre unas pocas semanas o meses (Flieger y col. 2003; Martínez, 2005).

El análisis de textura es una medida que podría indicar la resistencia que tiene la película al ser sometida a un esfuerzo físico (elasticidad), este parámetro se encuentra influenciado de manera directa por la composición de la película, tales como la concentración de almidón y la presencia de algún plastificante.

Las películas mostraron linealidad en respuesta al estrés al cual se sometieron, esta linealidad significa que el material efectivamente se está comportando elásticamente. En cierto punto, la película se desvía de la linealidad ya que se alcanza un esfuerzo umbral del límite elástico, donde más allá de este, la película se deforma plásticamente, y al eliminar la fuerza el material no retorna a sus dimensiones originales, pero permanece estirado deformado. Se encontraron valores de fuerza de  $1,40 \pm 1,03$  N como se señala en la tabla N°22, y de elasticidad de  $-49,45 \pm 2,02$  mm. Tanto la fuerza, como la elasticidad, se explican cómo se mencionó, por la composición de la película ya que; durante el proceso de secado de la solución que permite la obtención de las mismas, el agua tiende a evaporarse, permitiendo la formación de la red o matriz. Es precisamente en esta etapa que la proximidad de las cadenas del polímero se ven favorecidas,

facilitando la formación de una matriz densa debido al aumento de las interacciones moleculares del propio polímero (Mali y col. 2004). Por su parte el plastificante empleado, ejerce una función importante en la reducción de dicha matriz densa, confiriéndole un carácter flexible a la película debido a la reducción de los enlaces internos (puentes de hidrógeno) de las cadenas del polímero, en otras palabras una reducción de las fuerzas internas que mantienen unidas las cadenas.

**Tabla N°22.** Análisis de textura de las películas de almidón flexibles

Fuerza Ruptura (N)	Distancia (mm)	Elasticidad (mm)
1,40±1,03	-49,45±2,02	-49,45±2,02

**Media ± desviación estándar con n= 15**

Tomando en cuenta la definición de empaque flexible considerada en la bibliografía, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de textura de las películas formuladas a base de almidón metilado y glicerol, estas se pueden clasificar como empaques de carácter flexible.

Los envases flexibles de plástico ofrecen una presentación atractiva para el consumidor sin impedir la protección del producto; las bolsas de plástico ayudan a prolongar la vida de anaquel y, en el caso de los productos cárnicos, crean una barrera que evita la oxidación. Se debe conocer la susceptibilidad del producto a los distintos tipos de esfuerzos mecánicos. Esto tiene relevancia porque servirá para escoger un empaque con mayor resistencia al impacto y al aplastamiento (resistencia mecánica). También, para

escoger el material con la suavidad necesaria a fin de evitar la abrasión. Cualquier deterioro que sufra un producto, no sólo desmejora su presentación sino que puede gravemente afectar su mercado.

### **6.6.3- Propiedad de barrera: Permeabilidad al vapor de agua**

Una de las funciones de un material de empaque es proteger al producto contenido, desde su distribución hasta su consumo final, además de jugar un papel importante en el mantenimiento de la calidad y en la extensión de la vida útil del producto. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es un factor importante en la selección del material de envasado de alimentos, debido a que afecta la vida útil del producto (Rojas, 2006). Esta propiedad se encuentra influenciada por diversos factores como son el grosor de las películas, concentración de glicerol o cualquier otro compuesto plastificante, presencia de sustancias hidrofílicas y la concentración del polímero a emplear para la formulación de las películas de almidones modificados con visión de material de empaque.

Las películas formuladas a base de almidón modificado y glicerol, presentaron una baja permeabilidad tabla N°23. Esto se debe a la naturaleza del polímero obtenido, ya que ofrece buenas barreras de permeabilidad, así como también a las características estructurales de las moléculas de almidón modificado el cual reduce las interacciones con las moléculas de agua debido a la sustitución de los grupos hidroxilos que imposibilitan los posibles puentes de hidrógenos con dichas moléculas. Por otra parte, la concentración del polímero a emplear en la

formulación de las películas es un factor que afecta la PVA; ya que si se emplea una mayor concentración del polímero en la formulación las películas exhibirían un aumento del PVA, lo cual puede ser explicado por el aumento de grupos hidroxilos disponibles que podrían mejorar las interacciones con el agua favoreciendo su flujo a través de las películas (Mali y col. 2004).

**Tabla N°23.** Velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) y permeabilidad del vapor de agua de las películas de almidón modificado (flexibles).

VTVA (g/m <sup>2</sup> S)	PVA (g/m S Pa)
1,9E-10±1,8E-10	6,7E-11±6,4E-11

Media ± desviación estándar n=

En la figura N°21 se pone de manifiesto lo expuesto hasta el momento, respecto a la permeabilidad de las películas de almidón, notándose claramente como se genera una baja pérdida de pesos de las cápsulas. Durante las tres primeras horas del ensayo se registró una pérdida muy baja, y seguido de ello se obtuvo un incremento para las últimas tres horas. Esta variación significativa es debida al intercambio del vapor de agua que se establece entre el líquido contenido dentro de las cápsulas y la solución saturada de MgCl<sub>2</sub> el cual genera una humedad relativa de 33%, así como también a la búsqueda del equilibrio en el sistema. La pendiente de la curva obtenida refleja considerablemente la tasa de pérdida de agua, siendo esta bastante baja 1,9E-10±1,8E-10 g/m<sup>2</sup> S (ver tabla N°23).

Se puede concluir que este bajo valor de permeabilidad de las películas formuladas con almidón modificado y glicerol, serían efectivas para prevenir las pérdidas de humedad de los alimentos empacados, manteniendo mejor su apariencia y posiblemente la aceptabilidad por parte del consumidor.

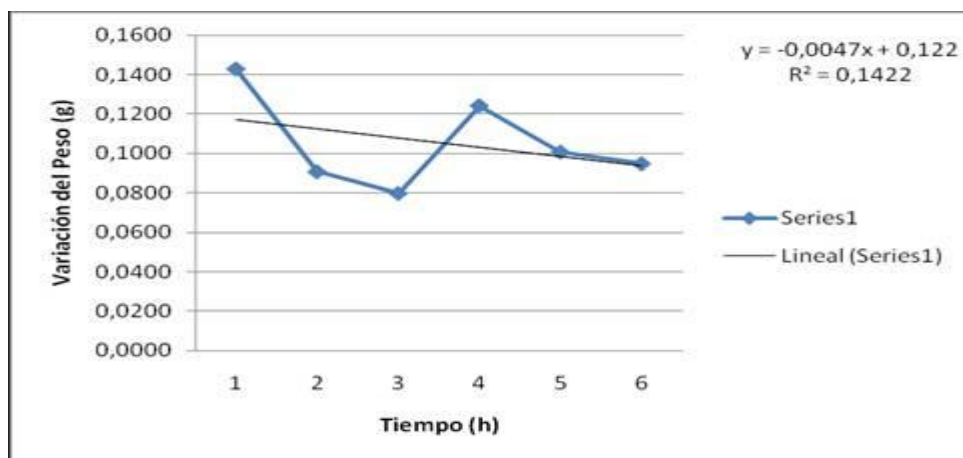


Fig. N°21. Variación promedio del peso (g) de las diferentes películas de almidón modificado (flexibles) respecto al tiempo (h) del tratamiento (PVA).

#### 6.6.4- Propiedad Estructural: Solubilidad en agua (SA) y Retención de agua (RA).

La solubilidad de las películas estudiadas indica su integridad en un ambiente acuoso, por lo que una alta solubilidad implicaría una baja resistencia al agua. Los resultados obtenidos y señalados en la tabla N°24 demostraron que la solubilidad en agua a temperatura ambiente ( $T \approx 25^{\circ}\text{C}$ ) es influenciada significativamente por la formulación de la película. Por otra parte, el almidón quizás este formando interacciones intermoleculares más fuertes, lo que le permite formar una película más resistente que puede mantener su integridad en un



ambiente acuoso. Por lo que se puede indicar que la solubilidad puede depender del tipo de polímero y del tipo de plastificante empleado.

Requena y col. (2003) citado por Clemente, en el (2005), señala que la cantidad de agua que puede ser absorbida y retenida por las moléculas de almidón dependen de varios factores, como son la estructura química, el tamaño granular, la temperatura, así como el grado de entrecruzamiento y asociación molecular.

La fracción de agua ganada por la película fue de  $4,7 \pm 0,65$  (ver tabla N°25), el cual se puede explicar a través de la capacidad del plastificante de generar ciertos desplazamientos en la estructura interna de la película, permitiendo la incorporación de algunas moléculas de agua; este fenómeno también puede deberse al tamaño significativo del gránulo alcanzado por la modificación química al cual fue sometido. Esta agua retenida, puede ser eliminada nuevamente por evaporación, ya que no se establecen grandes fuerzas entre las moléculas de agua y la película.

**Tabla N°24.** Solubilidad en agua (SA) y capacidad de retención de agua (RA) de las películas de almidón modificado (flexibles).

SA	RA
$0,94 \pm 0,05$	$4,7 \pm 0,65$

Media  $\pm$  desviación estándar n=3

## 6.7- Biocompatibilidad

Para la evaluación de la biocompatibilidad del almidón modificado, o la capacidad de este biopolímero a generar una respuesta biológica apropiada fue necesaria la inclusión de un polisacárido, el quitosano (derivado de las conchas de crustáceos), ya que este posee muchos atributos, como es ser biodegradable (al igual que el polímero de almidón), biocompatible y ampliamente utilizado en la creación de matrices para el trasplante de células y otras aplicaciones biomédicas. El quitosano tiene la propiedad de formar redes, hidrogeles, que permiten encapsular productos de carácter terapéutico u otros biomateriales que aporten diferentes características al material. La formación de un hidrogel se debe a la reticulación de las cadenas de polímeros a través de interacciones físicas, iónicas o covalentes y son bien conocidos por su capacidad de absorber agua. Desde el punto de vista de la biomedicina, son prometedores, en un gran número de áreas como por ejemplo como soportes para la regeneración de tejidos, liberación controlada de fármacos, así como para el almacenamiento de células o de drogas.

Los hidrogeles presentan una desventaja por su baja resistencia mecánica, comparada con otra clase de soportes obtenidos mediante técnicas diferentes para ser utilizados en ingeniería de tejidos. Es por eso que se tienden a entrecruzar las cadenas poliméricas de su estructura con agentes tales como formaldehído, compuestos epóxicos, dialdehídos (glutaraldehido y glioxal) y, en el caso del presente trabajo, almidón (Rohindra y col. 2005); de los cuales el más utilizado e investigado corresponde al glutaraldehido (Gonçalves y col. 2005; Ma y col. 2003; Silva y col. 2004).

En los hidrogeles entrecruzados las cadenas poliméricas se encuentran unidas entre sí por medio del agente entrecruzante, lo que conlleva a la formación de una red tridimensional. Las propiedades de los hidrogeles dependen principalmente de la densidad o grado de entrecruzamiento, denominado como la relación de moles del agente con los moles de las unidades repetitivas del polímero. Mientras más pequeño sea el tamaño del entrecruzante, más rápido se dará la reacción de entrecruzamiento (Rohindra y col. 2005).

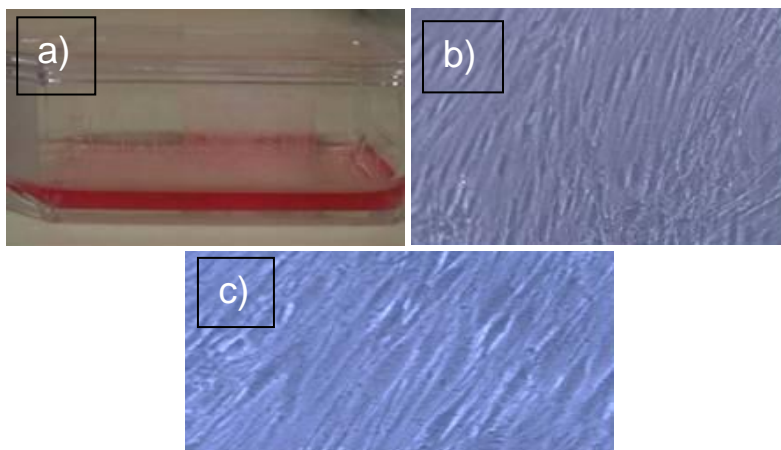
Por otra parte, para el estudio de la biocompatibilidad se recurre al empleo de cultivos de células primarias, siendo estas el uso de células epidérmicas (fibroblastos). Los fibroblastos son células de mamíferos más fáciles de cultivar, adicionalmente son utilizados en la actualidad para la evaluación de biomateriales. Estas células pueden ser extraídas de cualquier parte del cuerpo y tienen la capacidad de permanecer cultivadas por largos períodos de tiempo (Katalinich, 1997).

Para evaluar la viabilidad celular (sobrevivencia de las células ante un nuevo biomaterial u otro agente externo) se recurre al empleo de pruebas de citotoxicidad. Estos ensayos involucran el efecto de los materiales sobre diferentes poblaciones celulares midiendo el grado de crecimiento celular luego de su exposición a las superficies de los materiales. Además, estas pruebas determinan daños a nivel de la membrana celular, biosíntesis o actividad enzimática y material genético. En el presente trabajo, se emplearon pruebas de esta índole para corroborar que los almidones obtenidos a través de la metilación no impliquen daños de carácter tóxico a células, y posiblemente tejidos del cuerpo humano.

### 6.7.1- Crecimiento de Fibroblastos Humanos

Se utilizó un medio de cultivo que cumpliera con las exigencias nutritivas de los fibroblastos. El medio de cultivo, DMEM, es un medio estándar ampliamente utilizado en los procedimientos comunes de cultivo celular; este provee un pH y un ambiente esencial, así como los nutrientes necesarios para la supervivencia celular, como también la deposición de una matriz extra celular por parte de las células en cultivo.

Se observó que en el frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se presentó una confluencia celular cercana al 100%. Los fibroblastos se mostraron alargados, entrelazados, y aglutinados cubriendo toda la superficie del frasco (confluentes) como se observan en la figura N°22.

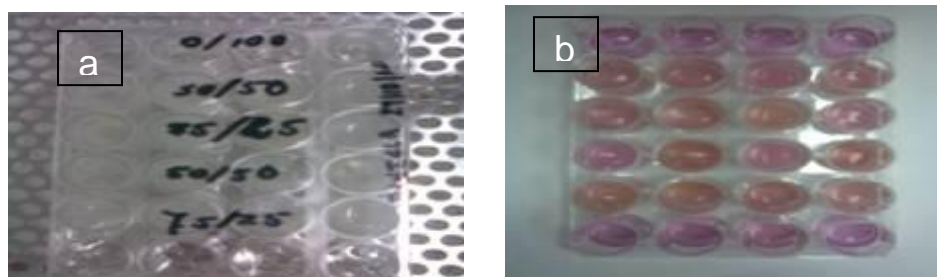


**Figura N°22.** Crecimiento de fibroblastos humanos en medio de cultivo: a) frasco de cultivo 25 cm<sup>2</sup>, b) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 10x), c) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 20x).

### 6.7.2- Crecimiento sobre Hidrogeles de Almidón Metilado/Quitosano

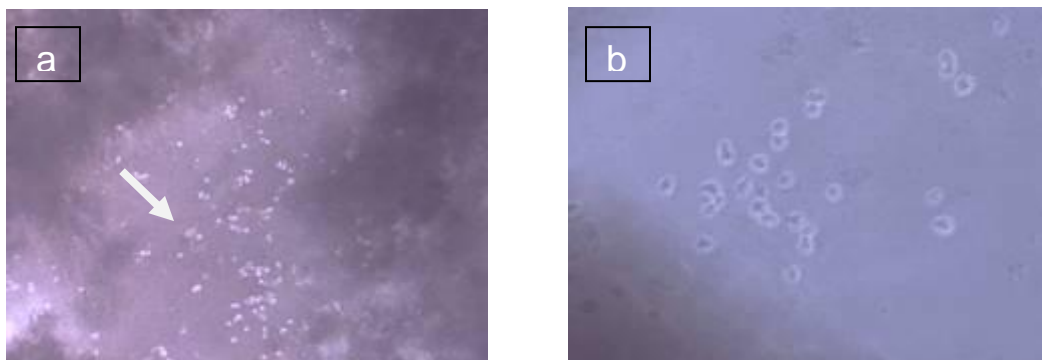
Los primeros ensayos que se realizaron involucraron diferentes formulaciones para la obtención del hidrogel: Todas estas formulaciones se realizaron a fin de seleccionar la formulación que cumpliera con la permanencia (no solubilización) del hidrogel, no afectando así, la adherencia de las células al material de soporte. Estas formulaciones fueron de un 0/100%; 50/50% y 75/25% de quitosano y la solución de almidón metilado respectivamente, manteniéndose en cada condición la adición de 50 $\mu$ L de glutaraldehído (37% por cada mL de la mezcla); este en menor proporción debido a su carácter citotóxico, y pudiendo tener un efecto detrimento sobre la viabilidad celular. Los geles se prepararon en placas de cultivo (Elisa) de 24 pozos, se sometieron a esterilización bajo UV por 15min, y se trabajó con un único control siendo este la placa solamente con medio.

Cuando se agregó el medio de cultivo que contenía los fibroblastos en cada uno de los pozos, el color del medio fue variable, presentándose en algunos un color amarillo; y en otros colores rojos de diferentes intensidades debido a las concentraciones de almidón (Figura N°23), después de tres días de incubación los colores se mantuvieron, pero con menor intensidad. El cambio de color puede deberse a la acidificación del medio ocasionada por el exceso de reactivos (glutaraldehído, almidón o quitosano), o contaminación, la cual tendría un efecto visible después de varios días de incubación.



**Figura N°23.** Placas de cultivo con distintas formulaciones de hidrogeles. a) Placa con hidrogeles sin medio de crecimiento de fibroblastos; b) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 3 día de incubación.

Mediante la observación de los pozos de la placa de cultivo celular con el microscopio, se determinó que los fibroblastos no se adhirieron al fondo después de 3 días de incubación a 37°C (Figura N°24). Esto demostró que no se encontraron células viables. Eso se infirió a través de la morfología celular redonda, indicativo de la falta de adherencia de los fibroblastos que, cuando se encuentran viables y adheridos eficientemente a una superficie, presentan una morfología alargada. Se puede inferir y de acuerdo a las observaciones realizadas que los hidrogeles tendieron a fracturarse en solución no permitiendo el alcance de los nutrientes necesarios para la proliferación celular. Cabe destacar que se distinguió un hidrogel más resistente correspondiente a la formulación 50/50%. Por otra parte, la muerte celular también se pudo deber a que los hidrogeles no presentaban la suficiente esterilidad la cual influye dramáticamente en el crecimiento, así como también se infiere que de alguna manera la exposición a la luz UV pudo afectar el hidrogel formado.



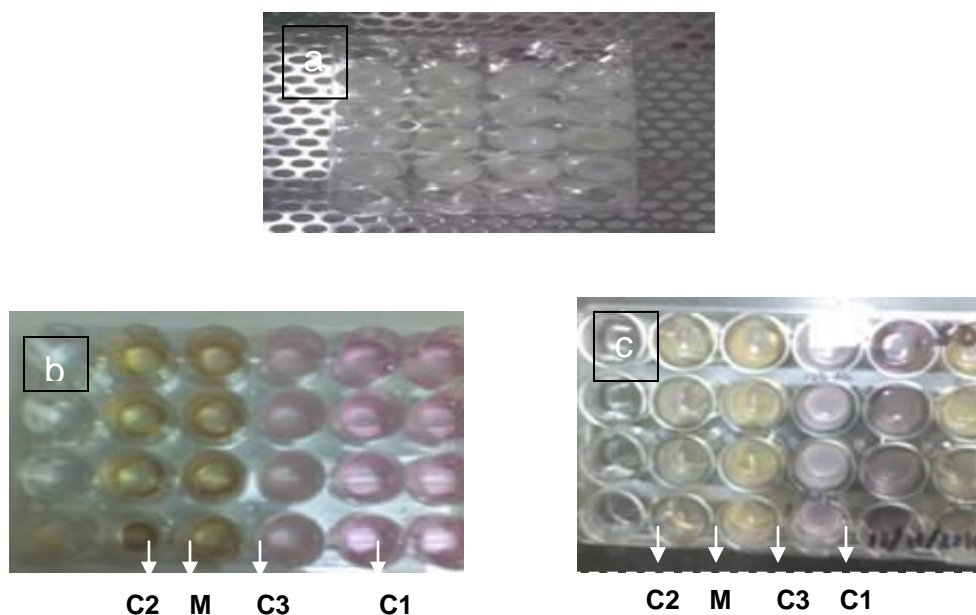
**Figura N°24.** Crecimiento de fibroblastos en placas de cultivo. a) Fractura del hidrogel, la flecha indica la localización de las células muertas (10X); b) células muertas encontradas en la placa de cultivo (100x).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los primeros ensayos se decidió trabajar en base a una sola formulación (50/50%), ya que esta mostró una mayor firmeza al ser expuesta al medio de cultivo. Se consideraron para este caso diferentes controles, a fin de profundizar un poco más cual compuesto o medio podría ejercer un efecto negativo sobre las células de interés estos fueron; placa de cultivo sin hidrogel, con medio de crecimiento (C1), quitosano sólo, gelificado (C2) y almidón sólo en suspensión en el medio de crecimiento (C3), siendo estos comparados con geles de la mezcla (M) de quitosano y almidón modificado (Figura N°25 b).

Por otro lado, a fin de garantizar una alta esterilidad, la solución de almidón modificado se obtuvo previamente bajo condiciones de asepsia, es decir trabajado bajo campana y con material totalmente estéril.

Una vez obtenidos los hidrogeles en las respectivas placas de Elisa, estos se sometieron a diferentes lavados con una solución de etanol al 70%, con el fin

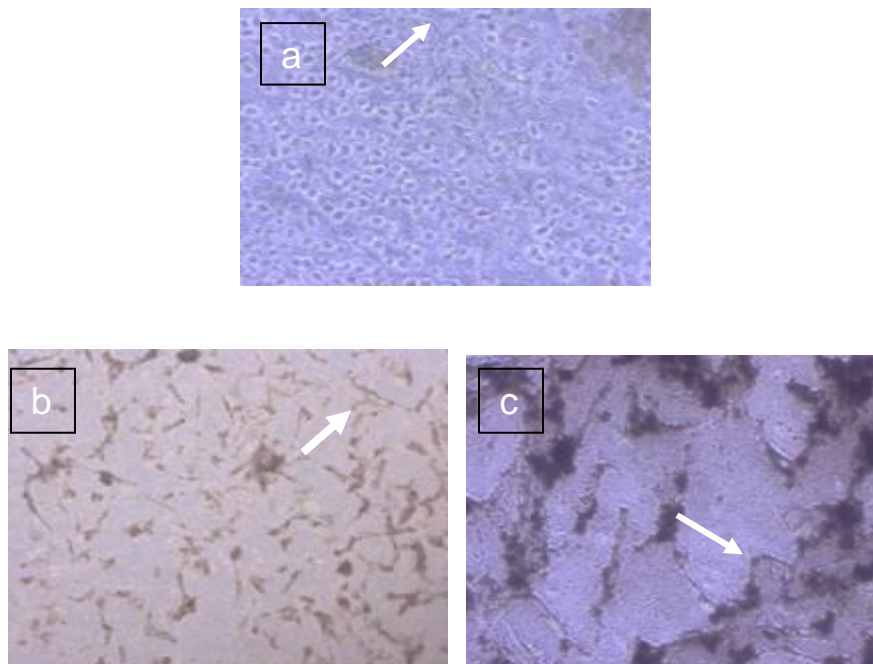
de esterilizar los geles y extraer el excedente de glutaraldehído sin reaccionar, seguido de lavados con solución salina para eliminar el etanol, el cual ejercía un efecto citotóxico. Seguidamente al agregar el medio de cultivo se observó nuevamente diferentes tonalidades de rojo, quizás debido a la homogenización durante la obtención del hidrogel, además de un color amarillo en los pozos de quitosano sólo, debido al bajo pH de la solución original de quitosano. Luego de 3 y 5 días de incubación estos mostraron tonalidades de rojo menos intensas, indicando una estabilización del pH (Figura N°25 c).



**Figura N°25.** Placas de cultivo con distintas formulaciones de hidrogeles. a) Placa con hidrogeles sin medio de crecimiento de fibroblastos; b) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 3 día de incubación. c) placa con hidrogeles y medio de crecimientos al 5 día de incubación.



Transcurrido el tiempo de incubación y al observar los pozos de la placa de cultivo celular con el microscopio, se determinó que para ambos períodos de incubación (3 y 5 días) los fibroblastos presentaron una fuerte adherencia al fondo a 37°C (Figura N° 26). Cabe destacar, que fueron poco apreciables estas células en los pozos correspondientes a la mezcla, debido a las propiedades ópticas del material. La adherencia se debe inicialmente a interacciones del material con receptores de la membrana celular. Los grupos amino del quitosano representan cargas superficiales del substrato, que semejan a las encontradas en la superficies de los pozos que son ideales para su adherencia y crecimiento. Subsecuentemente, los fibroblastos producen y liberan colágeno tipo I, el cual es característico del tejido conectivo; esto les permite empezar con el proceso de división celular para incrementar el número de células colocadas inicialmente en cada pozo, hasta lograr un crecimiento máximo que se refleja en un 100% de confluencia. Una vez que las células han establecido su matriz extracelular, una proliferación celular más pronunciada toma lugar para empezar el crecimiento exponencial sobre los sustratos utilizados. Gutshe y col. (1994), indican que después de 24 horas de cultivo, los fibroblastos han producido suficientes proteínas de la matriz extracelular para continuar el crecimiento.



**Figura N°26.** Crecimiento de fibroblastos en placas de cultivo. a) Fibroblastos en medio de control C3 (almidón con medio de crecimiento) 100X; b) Fibroblastos en medio de control C2 (quitosano sólo) 100X; c) Fibroblastos en la mezcla (M) almidón 100X. Las flechas indican a los fibroblastos.

### 6.7.3- Prueba de Citotoxicidad (MTT)

El ensayo de MTT es una prueba enzimática comúnmente utilizada para medir la citotoxicidad de los materiales, tiene como propósito medir la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial celular (de Castro, 2006). Es una prueba simple debido a que no requiere de radio isotopos, es rápida y precisa que brinda información sobre el grado de viabilidad de las células en comparación con los controles.

La deshidrogenasa mitocondrial tiene la capacidad de convertir la molécula denominada MTT, por medio de distintos agentes reductores, en un compuesto de

formazan púrpura insoluble. Si la deshidrogenasa se encuentra inactiva por efectos citotóxicos de un material, no se formará el formazan. La formación de formazan puede ser cuantificado midiendo la densidad óptica de la solución, la cantidad de formazan producida es directamente proporcional al número de células viables.

En la figura N°27 muestra la absorbancia producto de la formación del formazán púrpura en cultivos de fibroblastos en diferentes condiciones. Se puede observar un incremento significativo de la actividad metabólica en el tiempo, tanto de la mezcla de almidón modificado y quitosano así como los diferentes controles, lo que se traduce en proliferación celular ( $p \leq 0,05$ ). Esto se evidencia a través de la presencia de una mayor cantidad de formazan producido al quinto día de crecimiento. Durante los primeros 3 días de cultivo, las células se encuentran en un período de adaptación al medio circundante; y por ende no se encuentran diferencias significativas en este punto en el tiempo, entre las diferentes condiciones de cultivo.

Por otra parte las diferencias observadas, al día 5, entre los controles y la mezcla, pueden ser explicadas por lo siguiente:

- ✓ El control correspondiente al medio de cultivo solo (C1), presentó la mayor absorbancia. Esto fue lo esperado, puesto que las células están cultivadas sobre una superficie óptima y están expuestas únicamente al medio de cultivo estandarizado que les garantiza las exigencias nutritivas para su proliferación; es decir este les provee un pH y un ambiente esencial para su supervivencia y la

multiplicación celular, además de proveer sustancias químicas requeridas por las células que no pueden ser sintetizadas.

✓ No hubo diferencias significativas entre el quitosano solo, C2 y el hidrogel compuesto (M). El quitosano solo es altamente biocompatible debido a que este presenta un carácter catiónico por lo que puede mantener una carga positiva a pH ácido, confiriéndole la capacidad de interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas. Wang y Hon, (2003) señalaron que los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* que utilizan diferentes tipos de células sobre quitosano (o conjugados) han demostrado su excelente citocompatibilidad, las células se adhieren fuertemente y proliferan adecuadamente, además de soportar y modular el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, fibroblastos, células epiteliales o queratinocitos, además de osteoblastos y condriocitos. Estudios indican que este tipo de células tienen preferencia por superficies catiónicas como la del quitosano (Sanchez y col. 2007). El quitosano presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas (Gagne y Simpson, 1993; Brine y Austin, 1981), el quitosano es biodegradable, biocompatible, pues no se produce respuesta del sistema inmune y no tóxico, características que unidas a su naturaleza policatiónica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas (Dhanikula y Panchagnula, 2004). Los resultados presentados muestran que la adición del almidón al hidrogel de quitosano no actúa en detrimento de la viabilidad celular, y por lo tanto indican que el almidón metilado es biocompatible.

✓ El control de almidón (C3) por su parte y a diferencia de los anteriores arrojó la menor absorbancia; tanto para el tercer día de tratamiento, como para el quinto día, esto pudiera explicarse debido a que el almidón tiende a precipitar y depositarse en el fondo de los pozos de cultivo formando una capa sobre las células que impediría en cierta proporción el transporte de nutrientes y oxígeno a las mismas; sin embargo, aún se observa, bajo estas condiciones un incremento significativo en el número de células viables, evidenciado por un aumento de la absorbancia en el tiempo.

✓ La mezcla (M) de quitosano y almidón modificado, por el contrario exhibió una mayor absorbancia comparada con el control C3 y estadísticamente igual al control C2 al 5<sup>to</sup> día del tratamiento; de acuerdo a los resultados obtenidos se infiere que la incorporación de quitosano al almidón modificado y entrecruzado con glutaraldehído forma una superficie con microestructura porosa y compatible con las células lo que permite la proliferación celular. La presencia de estos poros en su estructura le confiere una permeabilidad macromolecular por lo que las células adheridas pueden adquirir los nutrientes requeridos para su proliferación. Un criterio que debe cumplir el hidrogel es que la superficie sea porosa (Roh y Kwon, 2002), aspecto necesario para la adecuada proliferación de células debido a que los poros permiten que las células vivas interactúen de manera eficaz con el material para la consiguiente proliferación. Sin embargo, como mencionan Tan y col. (2001) citado por Sanchez, (2007) los soportes utilizados en algunas aplicaciones de ingeniería de tejidos deben presentar poros con dimensiones mayores a las 10 $\mu$ m para permitir la adecuada migración e interacción celular; sin

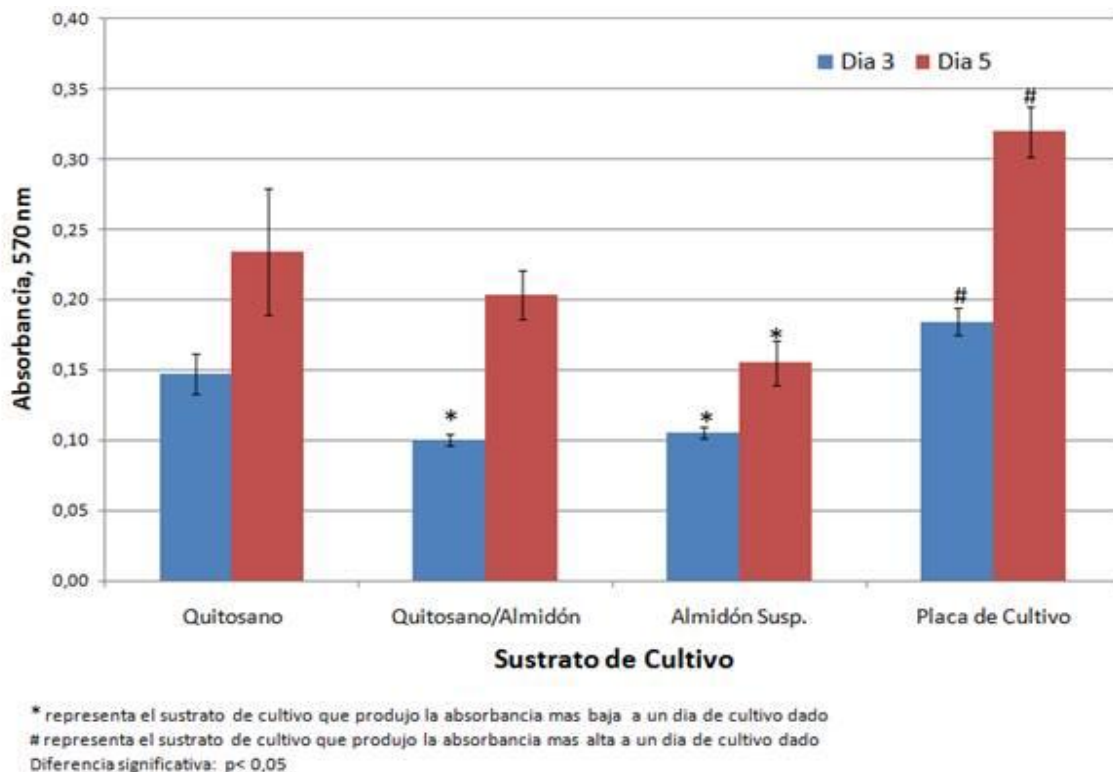
que exista interferencia con la difusión de nutrientes, hormonas o metabolitos dentro de la matriz para proveer nutrimento y así iniciar la respuesta celular. Los hidrogeles formados presentan poros con dimensiones inferiores a los 10um, y serían ideales para aplicaciones en la regeneración de cartílago articular, en las cuales se necesitan matrices más densas y las células no necesitan de un transporte de nutrientes significativo.

Específicamente, los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, baja degradación y un procesamiento sumamente fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel (Abram, 2004).

La mayoría de los criterios analizados se relacionan con la capacidad de los fibroblastos de adherirse al hidrogel de quitosano, ya que según varias teorías entre más rápido se adhieran las células en cultivo, es más probable que estas permanezcan viables y puedan proliferar (Katalinich, 1997).

Por último acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir; que tanto la mezcla de almidón modificado con quitosano, así como, el almidón solo empleado como control, no presentaron un efecto negativo sobre la viabilidad celular, no hay efectos citotóxicos sobre las células. Ambos sistemas favorecen la adhesión y crecimiento celular *in vitro* con una proliferación considerable y estimulación de la respuesta celular a los diferentes días del tratamiento.

Por otra parte y debido a la no citotoxicidad de este tipo de almidones se infiere que este puede ser fácilmente degradado por ciertos microorganismos al ser expuesto a ciertas condiciones ambientales, siendo una prometedora alternativa como material de empaque biodegradable.



**Figura N° 27.** Cuantificación de la proliferación celular. Absorbancia (DO=570nm) contra sustrato de cultivo a los diferentes días de tratamiento.

## CONCLUSIONES

1. El estudio del análisis proximal del almidón nativo de yuca arrojó resultados acordes con lo reportado en la bibliografía, destacando un alto porcentaje de pureza de este almidón (96,69%) dada a la eficiencia del método de extracción.
2. El almidón nativo se caracterizó por presentar un bajo pH (4,22) y una alta acidez ( $2,00 \times 10^{-4}$  meq NaOH/g).
3. La consistencia del gel obtenido para el almidón nativo fue de 92,33 mm inferior a lo reportado en la bibliografía; y cuya viscosidad permitió caracterizarlo como un fluido pseudoplástico, con una baja tendencia a retrogradar.
4. Se evaluaron los diferentes parámetros que definen el color del almidón nativo y se encontró que este presentó un color blanco.
5. Se modificó el almidón de yuca químicamente (metilación), cuya formulación ideal fue de 6g almidón/1mL de Dimetil sulfato ( $\text{DMSO}_4$ )/3,3g de hidróxido de bario.
6. La modificación del almidón afectó drásticamente la composición proximal y los parámetros físicos y fisicoquímicos del almidón de yuca, encontrándose diferencias marcadas estadísticamente a un nivel de confianza de  $p \leq 0,05$ .
7. El tamaño promedio del almidón nativo se encontró entre 20  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ ; la metilación del almidón aumentó el tamaño de los gránulos, variando de 47  $\mu\text{m}$  hasta 72  $\mu\text{m}$ , sin variación en la forma ni lixiviación de su material intragránular; sin embargo se afectó su estructura cristalina.



8. Tanto el índice de absorción de agua como el poder de hinchamiento de los gránulos de almidón nativo presentaron una mayor tendencia al incremento de la temperatura respecto al almidón modificado; con los sólidos solubles la mayor tendencia se obtuvo para los almidones modificados, dado a la susceptibilidad a la hidrólisis por efecto de la modificación.
9. La modificación del almidón de yuca por metilación admitió obtener películas de carácter rígidas para de 6g almidón/1mL DMSO<sub>4</sub>/3,3g de Ba(OH)<sub>2</sub>, y con la adición de 0,5mL de plastificante (glicerol) a 45,5mL de la solución se obtuvieron películas flexibles y de textura plástica.
10. La caracterización de las películas a base de almidón obtenidas permiten dar pie a ser propuestas como material de empaque terciario por su alta resistencia, flexibilidad y la baja tendencia de permeabilidad al vapor de agua.
11. Se evaluó la biocompatibilidad del almidón modificado, solo y combinado con quitosano (formando un hidrogel a una relación de 1:1 y 50 µL de glutaraldehido como agente entrecruzante) resultando ser biocompatible y no citotóxico, permitiendo la proliferación celular durante 3 y 5 días de cultivo.

## RECOMENDACIONES

1. Determinar el grado de sustitución del almidón modificado obtenido en el presente estudio, para ello se recomienda un análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).
2. Realizar un estudio de migración de los componentes del material de empaque (películas obtenidas a base de almidón modificado) al producto contenido, tomando en cuenta la conservación de la calidad y la vida útil del mismo.
3. Se sugiere considerar el empleo de las películas obtenidas a base de almidón modificado como un envase terciario ya que a pesar de ser un material no citotóxico para células humanas (epidérmicas) no se conoce aún sus efectos sobre los alimentos y/o microorganismos provenientes de los mismos.
4. Realizar combinaciones de técnicas de modificación a fin de mejorar aún más algunas de las propiedades específicas en el almidón modificado. Esto surge de la necesidad de obtener almidones muy estables, tanto para condiciones de procesamiento como para el mantenimiento y conservación de la vida útil de un producto determinado.
5. Realizar un estudio de la adherencia de las películas a base de almidón modificado sobre las cápsulas de vidrio.
6. Se sugiere el empleo del almidón metilado para la elaboración de soportes celulares, ya que garantizan la biocompatibilidad, adherencia e incremento de la actividad celular.

## Bibliografías

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 2003. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Novena Edition. St. Paul: Methods N<sup>o</sup>s 44-19; 08-17; 46-13 y 22-10.
- Abram, A.P. 2004. "Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones", Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial.
- Agoola S, Akingbala J, Oguntimein G 1991. Physicochemical and functional properties of low DS cassava starch acetates and citrates. *Starch/Stärke* 43: 62-66.
- Akalu, G.; Tufuesson, F.; Jonsson, C. and Nair, B. 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of starch and dietary fibre in grass pea seeds. *Starch/Starke*. 50(9):374-382.
- Alarcón F., Dufour D. 1998. El cultivo de la yuca. En: Almidón agrio de yuca en Colombia, Tomo 1: Producción y Recomendaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Publicación CIAT ; N<sup>o</sup> 268, Cali, Colombia.
- Álvarez B., José F., Vassilios I. Sikavitsas. 2007. Improved Mesenchymal Stem Cell Seeding on RGD-Modified Poly(L-lactic acid) Scaffolds using Flow Perfusion and section Determination of the Number of Cells attached to the Scaffolds. 579-588.
- Álvarez B., José F.; Shreve, Mark C.; Deangelis, Paul L. and Vassilios I. Sikavitsas. 2007. Preparation of a Functionally Flexible, Three-Dimensional, Biomimetic Poly (L-Lactic Acid) Scaffold with Improved Cell Adhesion and the section Cell Surface Area Measurements on 2-D Discs. Vol.13. DOI: 10.1089.
- Amani N, Kamenan A, Rolland Sabaté A, Colonna P. 2005. Stability of yam starch gels during processing. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 94-101.
- Andradel, V.S.; Barros, B.; Fukushima, K.Y.; Takaki, G.M., 2003. *Iberoam. Micol.* 20, 149.

- Arvinitoyannis, I., and Biliaderis, C. G. 1999. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydr. Polym.* 38: 47-58.
- ASTM., D5488-94d Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Material and Packages. s/f.
- Bastioli, C. 2001. Global status of the production of biobased packaging materials. *Starch/Stärke.* 53:351-355
- Bello-Pérez L, Contreras S, Romero R, Solorza J.; Jiménez, A. 2002. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano (*Musa paradisiaca* L. var. Macho). *Agrociencia* 36: 169-180.
- Bello-Pérez, L.A.; Contreras-Ramos, S.M.; Jiménez-Aparicio, A. and Paredes-López, O. 2000. Acetylation and characterization of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Acta Cient. Venez.* 51:143-149.
- Braverman, J. 1980. Proteínas. En "Introducción a la bioquímica de los alimentos. Tercera Edición Omega.
- Brennan, J.; Butters, J.; Conell, R.; Lilley, A. 1990. Packaging. Chater 21. *Food Eginneeng Operations*, thr. Ed. El servicios Apolied Sc.
- Brine C.J. and Austin P.R. 1981. *Comp. Biochem. Physiol.* 69, 283.
- Cagampang, G. B.: Pérez, C. M.; Juliano, B. O. 1973. A gel consistency for easting quality of rice. *J. Sci. food. Agr.* 24:1589-1594.
- Cheftel J. 1976. "Introducción a la Bioquímica y tecnología de los alimentos". Vol II. Editorial Acribia.
- Chen L., Li X., Li L. and Guo S., 2007. Acetylated starch-based biodegradable materials with potential biomedical applications as drug delivery systems. *Current Applied Physics* 7, 90-93.
- Chiannan, M. and Park, H. J. 1995. Effect of platizaer level and temperatura on water vapor transmission of cellulose-based edible films *J. Food Process Eng.* 18:417-429.
- CIAT. Yuca: Investigación, Producción y utilización. Documento de Trabajo N°. 50. Programa de yuca. CIAT, Cali-Colombia. (s.f).

- Clemente, G. 2005. Modificación del almidón de arroz (*Oryza sativa*) pirodextrinización, entrecruzamiento e irradiación en microondas. Trabajo presentado para optar al Título de Magister Scientiarum en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Cock, J. H 1985. Cassava New potential for neglected crop. CIAT, Cali-Colombia. ISBN 0-86531-356-3.
- Colonna, P., Baulcon, A., Mercier, Ch. 1984. Physically modified starch. In: Starch: properties and potential. Institut National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Biochimie et technologie des Glucides. Rue de la Géraudière-France.
- Convenio de Patentes Europeas (CPE) 1999. Almidón y grano molido presentando un nuevo genotipo. Oficina española de patentes y marcas. Publicación ES 2137525T3.
- Coultate, T. P. 1987. Alimentos. Química de sus componentes. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- De Graaf R. A., Broekroelofs G. A.; Janssen L. P. B. M. and Beenackers A. A. C. M., 1995. The kinetics of the acetylation of gelatinized potato starch. Carbohydrate Polymers 28, 137-144.
- Dhanikula A.B., Panchagnula R. 2004. The AAPS Journal, 6 (3), artículo N° 27.
- Eliasson, A.C.; Gudmunsson, M. 1996. Star: physicochemical and functional aspects. In: Eliasson, A. C. Carbohydrates in Food Editorial Board Marcel Dekker, Inc. 555.
- Elomaa M., Asplund T.; Soinen P.; Laatikainen R.; Peltonen S., Hyvärinen S. and Urtti A., 2004. Determination of the degree of substitution of acetylated starch by hydrolysis, <sup>1</sup>H NMR and TGA/IR. Carbohydrate Polymers 57, 261-267.
- Fang, J. M., Fowler, P. A., Tomkinson, J., Hill, C. A. S. 2002. An investigation of the use of recovered vegetable oil for the preparation of starch thermoplastics., Carbohydrate Polymers, Vol. 50, No.pp. 429-434.

- Fennema, Owen R. 2000. Química de los alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. 2da Edición. Zaragoza- España.
- Flieger, M., Kantorová, M., Prell, A., Rezanka, T., Votruba, J. 2003. Biodegradable Plastics from Renewable Sources., *Folia Microbiologica*, Vol. 48, No. 1, pp. 27-44.
- Gagne N.; Simpson B.K. 1993. *Food Biotechnology*. 7, 253.
- García Chávez, Ricardo y Mendoza Martinez, Ana M. 2010. Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosan/dextran. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Propiedades morfológicas y geológicas de biopolímeros. Vol. 11(2).
- García, M. A., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *J. Food Sci.* 65(6).
- García, M. A., Pinotti, A.; Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.* 56: 339-345.
- Giese, J. 1995. Measuring physical properties of foods. *Food Technol*, 49: 54-63.
- Gilbert, S., 1985. Food/Package Compatibility. *Food Tech.* 39(54).
- Gomes, M. E., Vassilios, S., Behraves, E., Reis, R. L., Mikos, A G., 2003. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. *Flow Perfusion Culture of stromal cells*, 4710-057
- Gonçalves V. L., Laranjiera M. C.; Fávere V.T. 2005. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15(1), 6.
- Gong, Q., Wang, L.Q., Tu, K. 2006. In situ polymerization of starch with lactic acid in aqueous solution and the microstructure characterization. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 64, No. 4, pp. 501-509.

- Gontard, N., Guilbert, S. and Cuq, C. L., 1992. Edible wheat gluten film influence of the main process variables on film properties using response surfa 8% methodology. J. Food. Sci. 57:190-199.
- González, Z. 1997. Evaluación del almidón de arroz y trigo modificados por métodos químicos. Acetilación y Oxidación. Trabajo de Ascenso para optar a la categoría de Prpfesor Asistente. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Good, H. 2002. Me asurement of color in cereal products. Cereal Food World. 47(1):5-6.
- Grace, M. R. 1987. Cassava Processing. Food and Agriculture Organization FAO: pp. 55-61: Roma.
- Gracin, J.; Brozozowska, A. 1987. Analytical Measurements of Package components from chintentional Migrants. In Food Product-Package Compatibility. Edited by J. Ian Gray, Bruce R. Harte and Joseph Miltz. Technomic publisshiig Co. Inc. Lancaster-Basel. U.S.A.
- Gregorová E., Pabst W., Bohačenko I. 2006. "Characterization of different starch types for t eir application in ceramic processing". Journal of the Ceramic Society 26:1301-1309.
- Guilbert, S. 1986. Food packaging and preservation. In: Mathlouthi, M. (ed). Theory and Practice in Technology and Application of Edible Protective Films. Elsevier Applied Science Publishing Co., London, England. pp: 371-394.
- Gutshe A.T.; Parsons-Wingerter P.; Chand D.; Saltzman W.M.; Leong K.W. 1994. Biotechnology & Bioengineering, 43, 801.
- Harte, B. R.; Gray, J. I., 1987. In Food Product-Pakage Compatibility. Edited by J. Ian Gray, Bruce Harte and Joseph Miltz. Technomic Publishing Co. Inc U.S.A.
- Heinze, T., Liebert, T.; Koschella, A. 2006. Esterification of Polysaccharides. Vol. XVI, pp. 232.
- Hoover, R. and Sosulski, F. 1991. Compositionm structure, funcionality and Chemicals modification of legume a review. Can J. Physiol Pharmacol. 79-92.

- Hosney, R. 1986. Principles of cereal science and Technology. Published by the American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota.
- Huang J., Schols H. A., Klaver R., Jin Z. y Voragen A. G. J. 2007. Acetyl substitution patterns of amylose and amylopectin populations in cowpea starch modified with acetic anhydride and vinyl acetate. Carbohydrate Polymers 67, 542-550.
- Huber K., Be Miller J. 2001. "Location of sites of reaction within starch Cereal Chemistry 78 (2):173,180.
- Hunter Laboratory 2001. Hunter Associates Laboratory Universal software version 3.8 ISO 9001 certified. Hunter Associates, USA.
- Imberty, A. and Pérez S. 1989. Conformational analysis and molecular modelling of the branching point of amylopectin. Int. J. Biol. Macromol. 11 177-185.
- Jarowenko, W., 1986. Acetylated starch and miscellaneous organic esters. En: Modified Starches: Properties and Uses, (O. B. Wurzburg, Ed.), Pp. 64-73. CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Jones, S. F. 1983. The world market for starch and starch products with particular reference to cassava (tapioca) starch. Tropical Development and Research Institute. 98p.
- Joslyn, M. 1970. "Methods in food analysis". Academic Press 2<sup>da</sup> Ed. N. Y. USA.
- Juliano, B. O. 1985. Policharides, proteins, and lipids of rice. in: Juliano, B. O. Rice Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. 774.3:59-160.
- Jyothi, A. N., Kallikat, N. R., Subramoney, N. M., Sreekumar, J., Microwave-Assisted 2005. Synthesis and Characterization of Succinate Derivatives of Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) Starch., Stärke/Starch, Vol. 57, No. 11, 2005, pp. 556-563.
- Kapuśniak, J. 2004. Thermal reactions of starch with long chain unsaturated Fatty acids - The way for the synthesis of products with new functional properties. Stärke/Starch Vol. Lectures of the 55, Starch Convention.



- Katalinich, M. 1997. "Characterization of chitosan films for cell culture applications", Thesis MSc in Chemical Engineering, University of Colorado.
- Kaur L, Singh N, Singh J 2004. Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. *Carbohydr Polym.* 55:211-213.
- Kaya, S. and Kaya, A., 2000. Microwave drying effects on properties of whe protein isolate edible films. *J. Food Eng.* 43:91-96.
- Kerr, R. 1950. *Chemistry and industry of starch.* Academic Press Inc. New York.
- Kester, J. J., and Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.* 40: 47-59.
- Krochta, J. M., and De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol.* 51: 61-77.
- Lee, K. Y.; Shim, J. Lee, H. G., 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite film. *Carbohydr Polym.* S6:251-254.
- Light, J. M. 1990. Modified food starches: Why, What, Where, and how cereal *Food World* 858(11):1081-1092.
- Lorcks, J. 1998. "Properties and applications of compostable starch-based plastic material". *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, No. 1-3 pp. 245-249.
- Lourdin, D.; Della Valle G. and Colonna, P. 1995. Influence of amylase content on starch films and foams. *Carbohydrate. Polym.* 27: 261-270.
- Lund, D. 1974. Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on Starch gelatinization. *Crc. Crit Rcv. Food Sci. And Nutr.* 20 (4), 249.
- Ma L.; Gao C.; Mao Z.; Shen J.; Hu X.; Han C. J. 2003. *Biomater. Sci. Polymer Edn.* (14)8, 861.
- Madi, L. F., 1984. Curso "Empaque y embalaje de alimentos". Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos de La Universidad Central de Venezuela.

- Mali S., Silva R., Grossmann M., Silva R.S., Borsato D. 2001. "Optimization of the production of acetylated distarch adipates using the novel software "Multiplex"". International Journal of Food Science and Technology 36: 641-647.
- Mali, S., Grossmann, V.; Garcia, M.; Martino, M.; Zaritzky, N. 2004. Barrier, mechanical and optieed properties of plasticized yan starchs films. Carbohyd Polym. 56:129-135.
- Mali, S.; Sakanaka, L. S.; Yamashita, F. and Grossmann, M. V. E., 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. Carbohydr. Polym. 60: 283-289.
- Mark A. M. and Mehlretter C. L., 1972. Facile preparation of starch triacetates. Starch/Stärke 24, 73-76.
- Martínez, D. 2005. Implicaciones digestivas y metabolicas del consumo de almidón resistente en el cerdo., tesis presentada a la Universidad Autónoma de Barcelona, para el título de Doctor.materials. Starch /Stärke. 53:351-35
- Matos, M. E, 1996. Aprovechamiento integral y uso industrial de la yuca (*Manihot esculenta Crantz*). Seminario especial de grado Facultad de ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Mestre C. 1996. Los estados físicos del almidón. Conferencia Internacional del almidón. en Memorias de Conferencias Internacional. Almidón Propiedades Físicos-Químicos funcionales y nutricionales Usos. Quito – Ecuador.
- Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 2<sup>da</sup> Edi. 408 p
- Montaldo, A. 1995. Propiedades y usos de la yuca hacia su desarrollo a gran escala. Cecotup Boletín Informativo. N° 3.
- Moorthy, S. N. 1994. Tuber crop starch. Tech Bulletin Series: 18. Central Tuber Crops Research Institute. Kerala.India pp.40.
- Myllymäki, V., Aksela, R. 2005. W/O 2005/023873 A1.

- Nam, Yoon Sung; Yoon, Jun Jin; Park, Tae Gwan. 1999. A Novel Fabrication Method of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds Using Gas Foaming Salt as Porogen Additive. Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon, South Korea 305-70.
- Niba, I., Makanga, M., Jackson, E. L.; Schilme, D. S. and Li, B. W. 2001. Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various *Manihot esculenta* (Cassava) genotypes. *Food Chemistry and Toxicology*. 67(5):1701-1705.
- Paredes, Judith V. 2004. Algunas experiencias sobre modificación química y física del almidón realizadas en Venezuela. Seminario I de Postgrado. Instituto de Tecnología de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela.
- Paschall, F.E., 1964. Phosphorylation with inorganic phosphate salts (Vol. 4). *Methods in carbohydrate chemistry*, New York: Academic Press Publishers, pp. 214–296.
- Peñaranda C., Oscar I., Perilla P., Jairo E. y Algecira E., Néstor A., 2008. Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. *Rev. Ingeniería de Investigación*. Vol. 28. N° 3, (47-52).
- Pereira, D. A. 2004. Caracterización de almidones provenientes de diferentes variedades de arroz. Trabajo Presentado para optar al Título de Magister Scientiarum en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Caracas-Venezuela.
- Pérez E.; Schultz F.; Pacheco de D., E., 2005. "Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro)". *Carbohydrate Polymers* 60: 139-145.
- Pérez, E. 1994. "Caracterización de las propiedades funcionales de almidones nativos y modificados por métodos físicos de extrusión, deshidratación con doble tambor e irradiación gamma y microondas". Trabajo de ascenso. Facultad de Ciencias. ICTA. UCV.

- Pérez, E. 1993. Modificación física de almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) en: Montaldo, A 1996. La yuca frente al hambre del mundo Tropical. Ediciones Arauco C.A Caracas- Venezuela. 570.
- Pérez. E., 1996. Todas experiencias sobre modificación química de almidón realizada en Venezuela en Memorias de Conferencias Internacional. Almidón Propiedades Físicos-Químicos funcionales y nutricionales Usos. Quito – Ecuador pág. 129-149.
- Pérez E., Schultz F., Pacheco de D., E. 2005. “Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro)”. *Carbohydrate Polymers* 60: 139-145
- Radley, J. 1976. Examination and analysis of starch and starch products. Applied Science Publishers LTD, London. 220p.
- Rangel H, P.O. 1980. Mecanización del cultivo de la yuca: Plantación, cosecha y aprovechamiento de la parte aérea. En Seminario Nacional de yuca. UCV Facultad de Agronomía. Dic. 1,2 y 3. Rev. De Agron. Alcance 31:135-166.
- Reis, R. L.; Cunha, A. M. 2005. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*.
- Requena, I. 2003. Efecto del grado de acetilación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas del almidón de arroz (*Oryza sativa* C.). Tesis de Pregrado del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Rhim, J. W., 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films *Lebenswiss. U-Technol.* 37:323-330.
- Rogols, S. B. 1986. Starch modifications: A view into the future. *Cereal Food World.* 31 (2):869-874.
- Roh I.R.; Kwon I.C.; J. 2002. *Biomater. Sci. Polymer Edn.* 13(7), 769.
- Rohindra D., Nand A.V., Khurma J.R. 2005. “Swelling properties of chitosan hydrogels”. *Iberoamer. Polím.*, 5(3), 133.

- Rojas, M., Avena, R.; Friedman, M., Henika, P.; Martin, O.; Mchugh, T. 2006. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree films containing plant essential oil. *J. Agric Food Chem.* 54:9262-9267.
- Rojas, O.; Moya, M.; Sibaja, M.; Ruepert. C.; Vega-Baudrit, J.R., 2004. *Rev. Iberoamer. Polím.*, 5(3), 133.
- Rutenberg, R. W. and Solarek, D., 1984. Starch derivatives. Production and uses. En: *Starch Chemistry and Technology*, (R. L. Wistler, J. N. BeMiller y E. F. Paschall, eds.), Pp. 312388. Academic Press, New York, USA.
- Sánchez, A.; Sibaja, M.; Vega-Baudridit, J.; Rojas, M. 2007. Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino (*pleuroncodes planipes*) para el crecimiento “in vitro” de fibroblastos humanos. *Revista Iberoamericana de Primeros. Hidrogeles de quitosano* Vol. 5(5).
- Santayanon, R., Wootthikanokkhan, J. 2003. Modification of cassava starch by using propionic anhydride and properties of the starchblended polyester polyurethane., *Carbohydrate Polymers*, Vol. 51, , pp. 17–24.
- Sastre, R., De Aza, S., 2004. “Biomateriales”, Faenza, Italia, Litográfica Faenza.
- Schmitz C.; De Simas K.; Santos K.; João, J., De Mello R.; Amante, E. 2006. Cassava starch functional properties by etherification-hydroxypropilation. *Int. J. Food Sci.* 41: 681-687.
- Schoch, T. 1964. Fatty substances in starch. In *methods in carbohydrate chemistry.* (wistler. R. L. Ed.). New cork: Academy Press. 5:56-61.
- Silva R. M.; Silva G.A.; Coutinho O.P.; Mano J.F.; Reis R.L. 2004. *Materials Sci.: Materials in Medicine*, 15, 1105.
- Singh J.; Kaur L. and 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.
- Singh R. y Heldman D. 1998. *Introducción a la ingeniería de los alimentos.* 2<sup>da</sup> Ed. Editorial ACRIBIA. Zaragoza. España, pp 53-64.

- Sitohy M., Ramadan M. 2001. "Granular properties of different starch phosphate monoesters". *Starch/Starke* 53: 27-34.
- Sívoli, L. 1995. Modificación química de almidón de maíz y papa. I. Cross-linking y acetilación. Trabajo de Grado Fac. de Ciencias Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos. U.C.V.
- Sívoli, L.; Pérez, E.; Rodríguez, P.; Raymúndez, M. B.; Ayesta, C. 2009. Técnicas microscópicas y de dispersión de luz empleadas en la evaluación de la estructura del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta* C). *Acta Microscopica* Vol. 18, N° 3, pp. 195-203.
- Sívoli, L; Pérez E.; Rodríguez P.; De Abrisqueta A.; Raymúndez, MB. 2005. Cambios en la estructura granular durante el proceso de modificación química (fosfatado - acetilado) del almidón de yuca analizados por microscopía óptica y electrónica. *Acta Microscópica*, Vol. 14, Nos. 1 y 2, pp.6-9
- Sívoli, Lilliam; Pérez, Elevina; Lares, Mary, and Leal, Edgardo, 2008. Studies of conformational changes, crystalline and granular structures, and in vitro digestibility of cross-linked and methylated corn starches. *Interciencia* Vol. 34 N°1.
- Smith, R. 1967. Characterization and analysis of starches. En *Starch: Chemistry and Technology*. (R. L. Whistler y E. F. Paschall, Ed.) New York: Academia Press. 2: 569-635.
- Srichuwong S., Candra T., Mishima T., Isono N., Hisamatsu M. 2005. "Starches from different botanical sources II: Contribution of starch structure to swelling and pasting properties". *Carbohydr Polym* 62: 25-34.
- Stading, M.; Rindlav-Westling, Å., and Gatenholm, P. 2001. Humidity-induced structural transitions in amylose and amylopectin films. *Carbohydr. Polym.* 45: 209-217.
- Swinkels, J.J. 1985. Industrial starch chemistry. Vol. I Chap. 8. In: *Handbook of food additives*. 2<sup>da</sup> ed. E.E. Furia, ed. CRC Press. Boca Raton. (s.f).
- Tapia, M. S.; Rojas-Graü, M. A.; Rodríguez, F. T.; Ramírez, J.; Carmona, A. y Mastin-Bellosa, O., 2007. Alginate and gellan based edible films por probiotic coatings on Fresh-cut fruits. *J. Food. Sci.* 72:190-E196.

- Tester R., Karkalas J., Xin Q. 2001. "Starch composition, fine structure and architecture". *Journal of Cereal Science* 39: 151-165.
- Tharantahan, R. N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Critical reviews in Food Science and Technology*. 14:71-78.
- Thomas D., Atwell W. 1999. Starch structure. En *Starches: Practical Guide for the Food Industry*. Eagan Press. St. Paul, MN, EEUU. pp. 1-12.
- Van der Burgt Y, Bergsma J, Bleeker I, Miland P, Karmmerling J., Vliegenthart J. 2000. Structural studies on methylated starch granules. *Starch/Starke* 52:40-43.
- Van der Burgt Y.M.E, Jack Bergsma, Ido P. Bleeker, Paul J.H.C. Mijland, Anca van der Kerk-van Hoof, Johannis P. Kamerling, Johannes F.G. Vliegenthart. 1998. Distribution of methyl substituents over branched and linear regions in methylated starches. *Carbohydr Res.* 312. 201-208.
- Van der Burgt Y.M.E, Jack Bergsma, Ido P. Bleeker, Paul J.H.C. Mijland, Anca van der Kerk-van Hoof, Johannis P. Kamerling, Johannes F.G. Vliegenthart. 1999. Distribution of methyl substituents over branched and linear regions in methylated starches. *Carbohydr Res.* 320: 100-107.
- Vender, A. 1966. Correlation of Aminoacid composition with nutritive value of proteins. *Clin Chem Act.* Vol. 5.
- Von Boc Kelmann, B. A.; Von Boc Kelmann, I., 1986. Aseptic Packaging of Liquid Food Products: A Literature review. *J. Agri. Food Chem.* 34,384-392.
- Wang J.W. and Hon M.H.J. 2003. *Biomater. Sci. Polymer Edn.* 14(2), 119.
- Wang L.Z., White, P.J., 1994. "Structure and properties of amylose, amylopectin and intermediate material of oat starches" *Cereal Chemistry* 71(3):263-268.
- Wankede, D. and Umadevi, S. 1981. "Isolation and physicochemical properties of starch extracted from yam elephant (*Amorphophallus campulatus*)" *starch/Stärke* 33(5), s 153-157.
- Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Paschall, E.F., 1984. *Starch: chemistry and technology*. Academic Press, Inc.

- Whistler R. y Paschall E. 1967. "Starch Chemistry and Technology". Academic Press. New York and London. Vol. II.
- Whistler, R. L., 1964. "Swelling Power" En: "Methods in Carbohydrate Chemistry". Vol. II, Ed Academic Press. New York, USA.
- Wurzburg, O B. 1972. Starch in the food industry. Vol. I chap. 8. In: Handbook of food additives. 2<sup>da</sup>. ed. E.E. Furia, ed. CRC Press. Boca Raton.
- Wurzburg, O B. 1986. Forty years of industrial starch research. Cereal Food World 31(12):897-903
- Wurzburg, O B.; Szymansk, C.D. 1970. Modified starches for the food industry. J. Agr. Food Chem. 18(6):997-1001.
- Wurzburg, O. B., 1964. Acetylation. En Methods in Carbohydrate Chemistry Vol IV, (R.L.Whistler, R.J. Smith y M.L. Wolfrom eds.), Pp 240-241. Academic Press, New York, USA.
- Xu Y. and Hanna M. A., 2005. Preparation and properties of biodegradable foams from starch acetate and poly (tetramethylene adipate-coterephthalate). Carbohydrate Polymers 59, 521-529.
- Xu Y.; Miladinov, V. and Hanna M. A., 2004. Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution. Cereal Chemistry 81, 735-740.
- Yan, L. y Paulson, A. T., 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. Food Res. EnT. 33:536-570.
- Yeh, A. y Li, J. 1986. A continuous measurement of swelling of rice starch during eating. J. Cereal. Sci. 23:277-283.
- Yeh, AN-I., Yeh, Su-Lan 1993. Some characteristics of hydroxypropylated and cross-linked rice starch. Cereal Chemistry, 70(5), 596-601
- Yufera, P. 1998. "Tecnología de los productos Alimenticios". Ed. Sintesis 2<sup>da</sup> Edición. España.
- Zobel, H. F. 1992. Starch granule structure in: Developments in carbohydrate chemistry. H. F. Zobel and R.j. Alexandes, e.d. A.A.C.C.



**Consultas en Línea:**

- de Castro de Pardo, Clemencia, (2006). Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT. Directiva de investigación Básica. Fundación Universidad San Martín. Bogota-Colombia. [http://www.iupac.org/publicaciones/cd/medicinal\\_chemistry](http://www.iupac.org/publicaciones/cd/medicinal_chemistry). [consulta 10 noviembre 2010].
- González P., Zurima M. y Pérez S., Elevina E. (2003). Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pregelatinizados y calentados con microondas. Acta Científica. Venezolana. ISSN 0001-5504. ACV v. 54 n.2. <http://actaivc.ve/54-2/articulo5.pdf>. [Consulta: 15 de Marzo de 2010].
- Zhao Guohua, Liu Y., Fang Cuilan, Zhang Min, Zhou Caiqiong, Chen Zongdao (2005). Water resistance, mechanical properties and biodegradability of methylated-cornstarch/poly (vinyl alcohol) blend film. Polymer degradation and Stability 91. 703-711. [WWW.elsevier.com/locate/polydegstab](http://WWW.elsevier.com/locate/polydegstab) [Consulta: 20 de Febrero de 2010].

## 10- ANEXOS

### 10.1- Anexo1. Formulaciones de películas rígidas con Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Iden.	Almidón (g)	DMSO (mL)	Cloroformo (mL)	pH
<b>a</b>	3	1	10	10,60
<b>b</b>	3	9	10	10,67
<b>c</b>	6	9	10	10,77
<b>d</b>	3	1	10	10,67
<b>e</b>	3	9	10	10,56
<b>f</b>	6	9	10	13,97
(duplicado c)				
<b>g</b>	6	9	10	13,96
<b>h*</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>10,18</b>
<b>i</b>	3	12	10	10,31
<b>j</b>	6	9	10	10,64
<b>k</b>	3	2	10	10,80
<b>l</b>	3	10	10	10,76
<b>m</b>	6	10	10	10,97
<b>n</b>	6	9	10	13,46
<b>ñ</b>	6	1	10	13,72
<b>o</b>	3	1	10	13,78
<b>p</b>	3	1	10	13,96
<b>q</b>	3	1	10	13,73
<b>r</b>	6	1	10	13,80
<b>s</b>	6	9	10	13,95

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (rígidas) para el reactivo empleado.

### 10.2- Anexo2. Formulaciones de películas rígidas con Dimetil Sulfato (DMSO<sub>4</sub>).

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH
A	3	1	1	13,68
B	3	9	1	3,7
C	3	1	1	12,84
D	3	9	1	4,24
E	6	1	1	13,87
F	6	9	1	3,06
G	6	1	1	12,85
H	6	3	1	2,31
I	6	5	1	4,50
J	3	5	1	4,51
K	9	1	1	13,1
L	6	1	1	6,76
M	3	1	1	7,05
<b>N*</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>6,62</b>
Ñ	6	1	0	6,62
(duplicado N)				

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (rígidas) para el reactivo empleado.

### 10.3- Anexo3. Formulaciones de películas flexibles a base de almidón metilado con Glicerol.

Iden.	Almidón (g)	DMSO <sub>4</sub> (mL)	Cloroformo (mL)	pH	Glic. (mL)
Fa	6	9	10	13,95	3
Fb	6	9	10	13,96	2
Fc	6	9	10	13,46	2
Fd	6	1	10	13,72	1
Fe	3	9	10	10,18	1
Ff	3	1	10	13,96	1
Fg	3	1	0	7,05	0,25
Fh	6	1	0	6,76	0,5
<b>Fi</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>6,62</b>	<b>0,5</b>
(duplicado de Fh)					

(\*) Formulación que permite obtener películas de carácter plástico (flexibles) para el reactivo empleado.

