



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

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

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el bachiller **Carlos Alberto González Quilen** como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología.

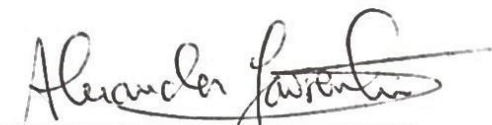
Tutor: Dr. Alexander Laurentin

CARACAS, VENEZUELA
MAYO, 2013

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DEL Br. CARLOS ALBERTO GONZÁLEZ QUILEN**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. **CARLOS ALBERTO GONZÁLEZ QUILEN**, C.I.: 19.087.748, titulado “**DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* Y APROVECHAMIENTO POR EL GORGOJO DE ARROZ (*Sitophilus oryzae* L.) DE ALMIDONES DE BANANO**”, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los tres días del mes de mayo de dos mil trece.



Dr. Alexander Laurentin
(Tutor)



Dra. Mercedes Schnell
(Jurado)



Dra. Elevina Pérez
(Jurado)



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 08/05/2013, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **González Q. Carlos A**; titular de la cédula de identidad No. 19.087.748; titulado: "**Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) de almidones de banano.**"; 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 ocho días del mes de mayo del año dos mil trece.


Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz
Presidente de
Consejo de la Escuela de Biología



JR/br.-

"Commemoración del 50° Aniversario de la Facultad de Ciencias"
Teléfono: 6051635, Fax: 6051636, Email: dirbio3@strix.ciens.ucv.ve

RESUMEN

El almidón es un homopolímero de glucosa que se halla en considerables cantidades en alimentos básicos tales como los cereales, las legumbres y los tubérculos, por lo cual constituye, además, el principal carbohidrato en la dieta del hombre. La búsqueda de fuentes amiláceas alternativas de importancia comercial requiere la caracterización fisicoquímica, funcional y nutricional de los almidones aislados de dichas fuentes, constituyendo la digestibilidad, el principal parámetro a considerar en el estudio nutricional. En el presente Trabajo Especial de Grado se caracterizó la digestibilidad de los almidones aislados de los frutos de 15 plantas de banano, clones (genomio): HH4, HH12 y HH22 (AA); HH1, 017, 018 y 038 (AAA); 115 y 118 (AAAA); HH8 (AB); 055 y 076 (AAB); 073, 087 y 089 (ABB).

Los frutos fueron suministrados por el banco de germoplasma del INIA-CENIAP, Maracay, estado Aragua, Venezuela. La caracterización de la digestibilidad de los almidones, contempló la realización de estudios *in vitro* (estimación de los contenidos de almidón disponible, de almidón resistente total y de la tasa de α -amilólisis) y de estudios *in vivo* (estimación de los biomarcadores supervivencia, variación de peso, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L.).

Los almidones de banano presentaron moderados y altos contenidos de almidón disponible (78–94%), un alto tenor de almidón resistente a la hidrólisis enzimática (41–58%) y unas tasas muy bajas de α -amilólisis, con magnitudes finales que no excedieron el 3%. La gelatinización incrementó sensiblemente la susceptibilidad de los almidones a la digestión, alcanzándose magnitudes finales entre 43–93%. Sin embargo, los almidones HH1, HH8, 055, 087 y 089 gelatinizados, presentaron tasas de α -amilólisis relativamente bajas con magnitudes finales entre 43–73%, por lo cual se perfilan como potenciales ingredientes en la fabricación de productos comestibles de bajo índice glucémico. Los biomarcadores supervivencia y variación de peso del gorgojo de arroz no resultaron ser buenos estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de banano, puesto que no se registraron respuestas biológicas que pudieran relacionarse con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. Los biomarcadores actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico, por su parte, presentaron un mejor desempeño al correlacionarse con el almidón resistente total ($r = 0,326$, $p = 0,029$ y $r = 0,490$, $p = 0,001$; respectivamente).

Los almidones crudos de los clones 017 (AAA) y HH22 (AA) presentaron las menores digestibilidades, mientras que HH8 (AB) y 089 (ABB) presentaron digestibilidades similares a la exhibida por el almidón de maíz. Se encontró, además, una aparente influencia del genomio del banano en la digestibilidad del almidón aislado: los almidones crudos de *Musa acuminata* (AA, AAA y AAAA), presentaron una menor digestibilidad que los almidones de *Musa × paradisiaca* (AB, AAB y ABB).

DEDICATORIA

A mi madre:

Quien con su esfuerzo, constancia y amor, ha logrado sacarnos adelante.

Y porque en el mundo no hay mejor lugar donde estar, que en tus brazos mamá.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Mis abuelos Aura y Cruz, mi tío Lester,
Wendy y mi pequeña Alessandra.

A mi tutor:

Alexander

A mis profesoras y excelentes
compañeras de laboratorio:

Ana, Meris y Mighay

A mi gran compañero de laboratorio y
amigo:

Carlos

A mis jurados:

Mercedes y Elevina

Al Consejo de Desarrollo Científico y
Humanístico (CDCH) de la Universidad
Central de Venezuela por el
financiamiento parcial de este trabajo,
mediante el proyecto PG-03-7607-2009.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	4
1.	El almidón	4
1.1.	Composición química.....	4
1.2.	Estructura cristalina y granular	5
1.3.	Aspectos nutricionales.....	8
1.4.	El almidón resistente	14
2.	El banano como fuente amilácea no convencional	20
3.	El estudio de la digestibilidad de los almidones.....	22
4.	El gorgojo de arroz como modelo en los estudios nutricionales.....	24
III.	OBJETIVOS	28
1.	Objetivo general	28
2.	Objetivos específicos.....	28
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
1.	Muestras de almidón	29
2.	Digestibilidad <i>in vitro</i> de los almidones de banano	29
2.1.	Estimación del contenido de almidón disponible.....	31
2.2.	Estimación del contenido de almidón resistente total	32
2.3.	Estimación de la tasa de α -amilólisis	34
3.	Digestibilidad <i>in vivo</i> de los almidones de banano	35
3.1.	Preparación de las dietas de almidón	36
3.2.	Mantenimiento del cultivo de gorgojos y selección de individuos para el bioensayo	36
3.3.	Bioensayo con el gorgojo de arroz	37
3.4.	Cálculo de la supervivencia y de la variación del peso.....	37
3.5.	Estimación de la actividad similar a α -amilasa	38
3.6.	Estimación de la excreción de ácido úrico	39
4.	Análisis estadístico	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
1.	Digestibilidad <i>in vitro</i> de los almidones de banano	42
1.1.	Almidón disponible	42
1.2.	Almidón resistente total	45
1.3.	Tasa de α -amilólisis	47
2.	Digestibilidad <i>in vivo</i> de los almidones de banano	52
2.1.	Supervivencia del gorgojo de arroz.....	52
2.2.	Variación de peso del gorgojo de arroz.....	55
2.3.	Actividad similar a α -amilasa.....	61
2.4.	Excreción de ácido úrico	64
3.	Consideraciones finales.....	72
3.1.	Digestibilidad relativa de los almidones de banano	73
3.2.	Influencia del genotipo en la digestibilidad de los almidones de banano	76
VI.	CONCLUSIONES	79
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores intrínsecos que influyen en la biodisponibilidad y en la tasa de hidrólisis del almidón.	11
Tabla 2. Clasificación nutricional del almidón.	13
Tabla 3. Efectos fisiológicos y metabólicos del almidón resistente.	19
Tabla 4. Clasificación, nombre común y forma de consumo de los clones de banano.	30
Tabla 5. Contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total en los almidones de banano.	44
Tabla 6. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis <i>in vitro</i> de los almidones de banano.	51
Tabla 7. Pesos promedio de los insectos y variación del peso al día 8 del bioensayo.	60
Tabla 8. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.	62
Tabla 9. Contenidos de proteína cruda en los almidones de banano.	68
Tabla 10. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.	69
Tabla 11. Digestibilidad relativa de los almidones de banano.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Homopolisacáridos constituyentes del almidón.	5
Figura 2. Estructura del gránulo de almidón.	6
Figura 3. Patrones cristalinos del almidón.	8
Figura 4. Aprovechamiento del almidón.	9
Figura 5. Cinética de hidrólisis <i>in vitro</i> de los almidones de banano.	50
Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en el almidón de referencia.	54
Figura 7. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.	55
Figura 8. Variación del peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo.	57
Figura 9. Variación del peso del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.	59
Figura 10. Gráficos de ajuste lineal entre el biomarcador actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz, los parámetros de digestibilidad <i>in vitro</i> y el contenido de proteína cruda del almidón.	65
Figura 11. Gráficos de ajuste lineal entre el biomarcador excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz, los parámetros de digestibilidad <i>in vitro</i> , el contenido de proteína cruda del almidón y el biomarcador actividad similar a α -amilasa.	70
Figura 12. Influencia del genotipo en los parámetros <i>in vitro</i> y en los biomarcadores de la digestibilidad de los almidones de banano.	77

I. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son macronutrientes que proveen entre el 40 y 85% de la energía en la dieta del hombre (Englyst y Hudson, 2000). Los carbohidratos alimentarios incluyen monosacáridos, como la glucosa y la fructosa; disacáridos, como la sacarosa y la lactosa; oligosacáridos, como los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos; y polisacáridos, como el almidón. El almidón es el principal polisacárido de reserva de las plantas y se halla en considerables cantidades en alimentos básicos tales como los cereales, las legumbres y los tubérculos, por lo cual constituye, además, el principal carbohidrato en la dieta (Englyst y Hudson, 2000).

En la industria, los almidones son apreciados por su gran versatilidad como ingredientes de alimentos, lo cual se deriva de la capacidad que tienen de ser alterados física, química o enzimáticamente para modificar sus propiedades funcionales. Las investigaciones actuales en el campo de los almidones se han enfocado en la búsqueda de fuentes amiláceas no convencionales con características nutricionales, fisicoquímicas, estructurales y funcionales diversas, que les proporcionen una amplia gama de potenciales usos industriales (de la Torre-Gutiérrez, 2008). El banano (cambur y plátano) en estado inmaduro, contiene hasta 70–80% de almidón en peso seco, un porcentaje comparable con el del endospermo del grano de maíz y el de la pulpa de la papa blanca (Zhang y col., 2005); perfilándose este alimento amiláceo, como una alternativa comercialmente viable.

Algunos estudios nutricionales realizados *in vivo* (Englyst y Cummings 1986; Faisant y col., 1995) han demostrado que las harinas y los almidones provenientes del banano exhiben una escasa susceptibilidad a la digestión, propiedad que ha sido atribuida al

alto contenido de almidón resistente estimado en estos alimentos (Galeno 2006, Marín, 2009; Martín, 2010). En las últimas décadas ha crecido el interés en el estudio de los carbohidratos que escapan de la digestión (el almidón resistente, la fibra y los oligosacáridos), pues su fermentación por acción de la microbiota del colon se ha asociado con múltiples efectos considerados beneficiosos para la salud: la hipocolesterolemia e hipolipidemia (Chen y col., 1984; Cheng y Lai., 2000), la inhibición del crecimiento de poblaciones bacterianas potencialmente patógenas (Cherrington y col., 1991), e incluso, la prevención del cáncer colorrectal (O'Keefe y col., 2009). Gran parte de las propiedades fisiológicas y metabólicas de los carbohidratos indigeribles), se atribuye a los denominados ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato, productos finales del proceso fermentativo. La presencia en el banano de un alto contenido de almidón resistente, sugiere que el consumo de este alimento traería a la salud los beneficios antes mencionados. Adicionalmente, el alto porcentaje de almidón lentamente digerible estimado en las harinas y en los almidones aislados del banano (Zhang y Hamaker, 2012), convierte estos alimentos en ingredientes ideales para la formulación de productos comestibles dirigidos a grupos de consumidores con regímenes nutricionales especiales, por ejemplo, aquellas personas que padecen de obesidad o de diabetes.

La búsqueda de fuentes amiláceas alternativas de importancia comercial requiere la caracterización fisicoquímica, funcional y nutricional de los almidones aislados de dichas fuentes, constituyendo la digestibilidad, el principal parámetro a considerar en el estudio nutricional. En las investigaciones recientes llevadas a cabo por los Laboratorios de Polisacáridos Vegetales y de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (García 2003, Galeno 2006, Martín, 2010), se ha estudiado la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de una amplia gama de

almidones nativos y modificados, entre los cuales se incluyen los almidones aislados del banano. Los parámetros que se han venido estimando en los ensayos *in vitro* son: los contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total, y la cinética de hidrólisis del almidón por acción de la α -amilasa pancreática porcina. Los estudios *in vivo*, por su parte, demandan el uso de un modelo animal. En este sentido, se ha encontrado en el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) una alternativa novedosa al empleo de los animales vertebrados, reduciendo el costo económico y la duración de los experimentos. En estos estudios *in vivo* se ha dado especial énfasis a la estimación de la composición corporal, (agua, grasa y proteína), de la actividad similar a α -amilasa y de la excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentando con las dietas de almidón, biomarcadores que en las citadas investigaciones han demostrado correlacionarse razonablemente con los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* de los almidones.

En el presente trabajo se caracterizó la digestibilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los almidones aislados de los frutos de 15 clones de plantas de banano (clones): HH4, HH12 y HH22 (AA); HH1, 017, 018 y 038 (AAA); 115 y 118 (AAAA); HH8 (AB); 055 y 076 (AAB); 073, 087 y 089 (ABB); ampliando las investigaciones previas emprendidas por nuestro laboratorio (Marín, 2009; Martín 2010). Los bananos fueron suministrados por el banco de germoplasma de musáceas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

II. ANTECEDENTES

1. El almidón

1.1. Composición química

El almidón es un polisacárido que se compone de numerosas moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos de tipos α -D-(1-4) y α -D-(1-6). El almidón está constituido estructuralmente por dos homopolímeros que se evidencian una vez que éste es solubilizado: la amilosa y la amilopectina (Gallant y col., 1992).

La amilosa es un homopolímero largo y esencialmente lineal que presenta en promedio unos 500 monómeros de glucosa por cadena, unidos mediante enlaces glucosídicos de tipo α -D-(1-4) (**Figura 1A**). En la amilosa, las unidades de glucosa muestran una torción gradual que le otorga a la molécula una conformación helicoidal con seis monómeros por vuelta. En los segmentos de hélice, los grupos hidróxilo se orientan hacia el exterior, mientras que los átomos de hidrógeno se disponen en el interior; así, los alcoholes de bajo peso molecular, el yodo y ciertas moléculas hidrofóbicas como los ácidos grasos, pueden formar complejos con la amilosa (Gallant y col., 1992).

La amilopectina es el principal componente del almidón, un polisacárido muy ramificado cuyos monómeros de glucosa se unen mediante enlaces glucosídicos de tipos α -D-(1-4) y α -D-(1-6); estos últimos representan el 5–6% del total de enlaces y se localizan únicamente en los sitios de ramificación (**Figura 1B**; Gallant y col., 1992, Buléon y col., 1998). La amilopectina está integrada por tres tipos de cadenas: una larga cadena central “C” se ramifica en múltiples cadenas “B” con longitudes de 23–35 residuos de glucosa;

estas últimas dan lugar a otras cadenas “B” o a racimos de numerosas cadenas cortas “A” de 13–23 residuos de glucosa (Buléon y col., 1998, Sajilata y col., 2006).

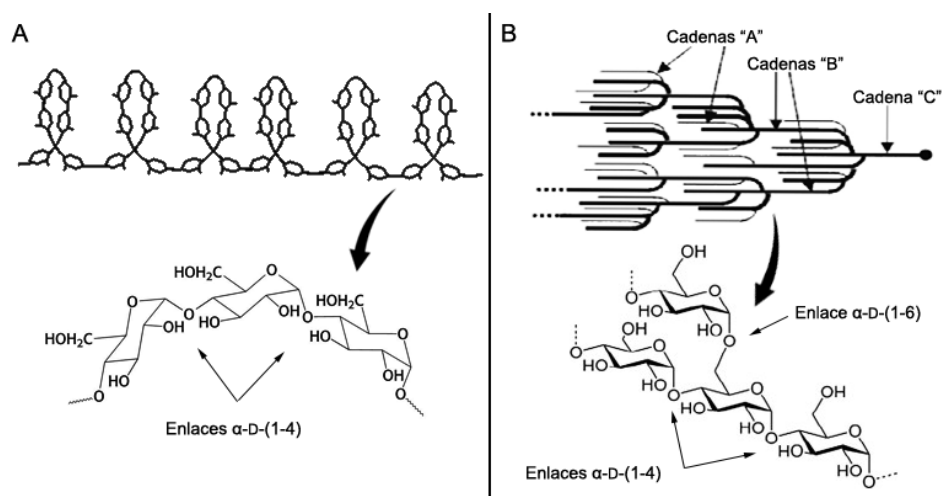


Figura 1. Homopolisacáridos constituyentes del almidón.

(A) Molécula de amilosa. (B) Molécula de amilopectina.

Aunque la vasta mayoría de los almidones contienen entre 15–35% de amilosa, se han desarrollado plantas mutantes cuyos almidones presentan un bajo o nulo contenido de este polisacárido; es este el caso de los almidones cerosos (o *waxy*) con un 0–2% de amilosa. Otros mutantes, por el contrario, presentan almidones ricos en amilosa; hasta 80% en el almidón de amilo-maíz (Englyst y Hudson, 2000).

1.2. Estructura cristalina y granular

Las plantas sintetizan y almacenan sus carbohidratos como gránulos de almidón, que en la naturaleza varían en cuanto a forma, tamaño y organización se refiere: grandes y elipsoidales o esféricos en los tubérculos, pequeños y poliédricos en los cereales, y arriñonados u ovoides en las leguminosas (Gallant y col., 1992).

Los gránulos de almidón muestran un grado de cristalinidad de 15–45% (Zobel, 1988) que se atribuye al entrelazamiento y a la formación de doble-hélices entre las cadenas externas de la amilopectina. Expuestos al microscopio óptico, los gránulos de almidón exhiben un patrón alternado de anillos concéntricos claros y oscuros que corresponden a las regiones amorfas y a las regiones semicristalinas (**Figura 2**). Las regiones amorfas, poco conocidas, son flanqueadas por regiones semicristalinas en las cuales la asociación de las cadenas externas de la amilopectina da lugar a lamelas cristalinias y los sitios de ramificación a lamelas amorfas (Tester y col., 2004).

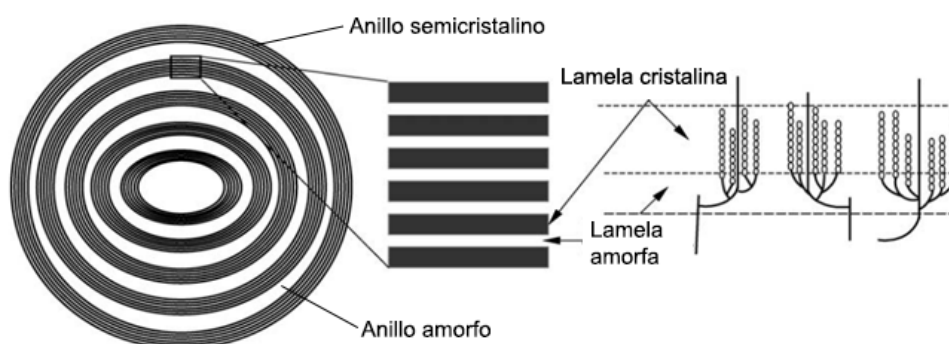


Figura 2. Estructura del gránulo de almidón.

Adaptado de Tester y col. (2004).

La localización de la amilosa, por su parte, parece depender de la fuente botánica. Por ejemplo, en el almidón del trigo la amilosa se ubica principalmente en las regiones amorfas del gránulo, mientras que en la papa, se encuentra parcialmente co-cristalinizada con la amilopectina (Oates, 1997).

La existencia de un orden cristalino en el gránulo de almidón se evidencia mediante la técnica de cristalografía de rayos X; así, han sido identificadas tres tipos de estructuras cristalinas en base al patrón de difracción: tipo A, tipo B y tipo C (Sarko y Wu, 1978).

En la estructura tipo A, las cadenas externas de la amilopectina, en conformación de doble-hélice, se asocian constituyendo cristales monoclinicos compactos con un bajo contenido en agua (**Figura 3A**; Imberty y col., 1991). En la estructura tipo B, seis doble-hélices se interconectan formando un arreglo hexagonal con un canal hidratado en el interior (**Figura 3B**; Imberty y col., 1991, Tester y col., 2004). El patrón de difracción C presenta características comunes a los patrones A y B, lo que sugiere la coexistencia de ambas estructuras en un mismo gránulo, o bien, en gránulos independientes (Sarko y Wu, 1978; Tester y col., 2004).

La longitud de las cadenas de la amilopectina es un factor determinante en el tipo de estructura cristalina que ha de adoptar el gránulo de almidón (Imberty y col., 1991; Sajilata y col., 2006). Hizukuri (1985) determinó en una amplia variedad de almidones, las longitudes promedio de las cadenas de la amilopectina y su relación con el patrón de difracción. Comprobó que la estructura tipo A presenta longitudes promedio entre 23–29 residuos de glucosa, la estructura tipo B entre 30–44 y la estructura tipo C entre 26–29. Por lo general, el almidón de los cereales suele exhibir el patrón A, mientras que el almidón de los tubérculos, el de las raíces y el de aquellos ricos en amilosa, exhiben el patrón B. El patrón C se ha reportado en el almidón de algunos tubérculos y en las semillas de las leguminosas.

Cabe destacar que las condiciones de temperatura e hidratación durante el crecimiento de la planta, pueden inducir cambios importantes en la estructura cristalina del almidón. La estructura tipo A es obtenida preferentemente en las condiciones de baja humedad y alta temperatura, mientras que la estructura tipo B se suele obtener en las condiciones opuestas (Buleón y col., 1998).

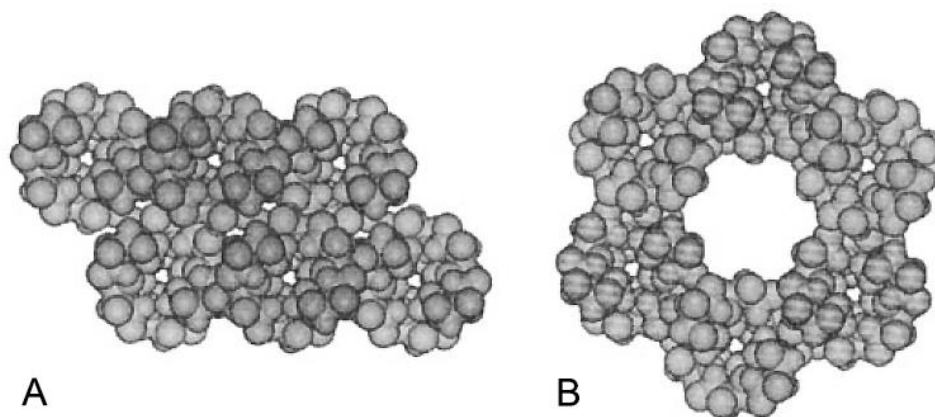


Figura 3. Patrones cristalinos del almidón.

Secciones transversales de las celdas unitarias. (A) Estructura tipo A. (B) Estructura tipo B. Adaptado de Buléon y col. (1998)

1.3. Aspectos nutricionales

1.3.1. Digestión

Las α -amilasas animales son enzimas hidrolasas de masa molecular comprendida entre 50.000–60.000 Da, con un pH óptimo para su actividad catalítica de 6,9 y una temperatura óptima que varía según la especie (Colonna y col., 1992). En los animales superiores, las α -amilasas (salival y pancreática) son las enzimas implicadas en la digestión del almidón.

En la cavidad bucal, la α -amilasa salival inicia la digestión de la amilosa y de la amilopectina, aunque su acción es inhibida posteriormente por el pH estomacal. Una vez en el intestino delgado, las α -amilasas salival y pancreática pueden actuar sobre los polisacáridos en tránsito. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos α -D-(1-4) pero no reconocen los enlaces α -D-(1-6) y, debido a su actividad endocatalítica, tampoco

reconocen los enlaces α -D-(1-4) terminales o los α -D-(1-4) adyacentes a los sitios de ramificación de la amilopectina (Ganong, 2002). Por consiguiente, la amilosa es degradada esencialmente a maltosa, mientras que la amilopectina es hidrolizada de forma parcial debido a la presencia de enlaces α -D-(1-6) (Mathews y col., 2002); así, los productos de la hidrólisis exhaustiva de la amilopectina son la maltosa y los oligosacáridos como la maltotriosa y las α -dextrinas límite (**Figura 4A**).

La subsecuente hidrólisis de la maltosa y de los oligosacáridos es responsabilidad de las disacaridasas, enzimas localizadas en la membrana de las microvellosidades del intestino delgado (borde en cepillo). La isomaltasa hidroliza los enlaces α -D-(1-6) y, junto con la maltasa y la sacarasa, desdobla la maltosa y la maltotriosa en glucosa (Ganong, 2002). La glucosa liberada ingresa al enterocito por acción de una proteína cotransportadora dependiente de sodio (SGLT 1, **Figura 4B**); luego, una segunda proteína (GLUT 2) transporta la glucosa pasivamente del interior celular hacia el intersticio, desde donde se difunde a la sangre.

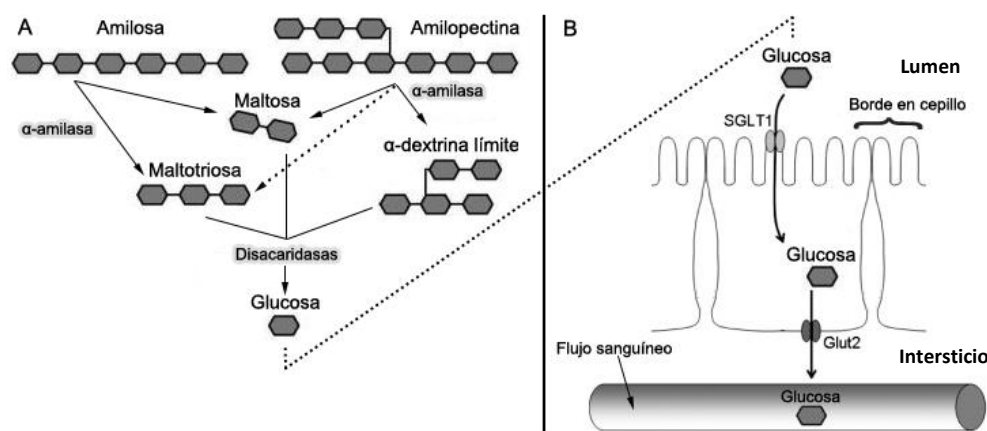


Figura 4. Aprovechamiento del almidón.

(A) Digestión exhaustiva de la amilosa y de la amilopectina. (B) Absorción de la glucosa en el intestino delgado.

1.3.2. Biodisponibilidad y tasa de hidrólisis

A principios de la década de 1970, se creía que los almidones eran completamente hidrolizados y absorbidos en el intestino delgado y que al existir en forma de polímeros largos y complejos, la hidrólisis y/o absorción ocurría de manera sustancialmente más lenta que en el caso de los azúcares simples y de los disacáridos. Hoy es ampliamente aceptado que la biodisponibilidad del almidón, es decir, la proporción del nutriente que es digestiva y metabólicamente disponible, y la velocidad con la cual ocurre la digestión y la absorción, dependen de múltiples factores inherentes o no al almidón (Englyst y col., 1992). Los factores intrínsecos (las propiedades del alimento amiláceo, **Tabla 1**) pueden ser medidos de forma reproducible, pero no son necesariamente buenos predictores de la biodisponibilidad y de la tasa de hidrólisis del almidón entre diferentes individuos. Esto se debe a que la ingesta expone los alimentos a factores extrínsecos que pueden también retardar o acelerar la digestión: el grado de masticación, la concentración de la enzima α -amilasa en el intestino delgado y el tiempo de tránsito del alimento entre la cavidad bucal y el íleon terminal (Colonna y col., 1992).

El procesamiento de los alimentos induce cambios físicos en el almidón que pueden modificar dramáticamente su susceptibilidad a la hidrólisis. Cuando el alimento amiláceo es sometido a la cocción (usualmente entre 50–70 °C) en exceso de agua (>300% de humedad), la estructura granular sufre un cambio irreversible denominado gelatinización. El gránulo experimenta un proceso de hinchamiento que supone la pérdida del orden interno y de la cristalinidad. A escala molecular, los puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras cristalinas sufren una ruptura, generándose gránulos porosos con un esqueleto de amilopectina, dispersos en una solución amorfa de amilosa. El almidón

gelatinizado es mucho más accesible a las α -amilasas que el almidón crudo, por lo cual es hidrolizado de forma más rápida y extensa (Colonna y col., 1992).

Tabla 1. Factores intrínsecos que influyen en la biodisponibilidad y en la tasa de hidrólisis del almidón.

Factor intrínseco	Influencia
Forma física del alimento amiláceo	La tasa de hidrólisis del almidón es particularmente baja en los granos enteros y en los alimentos densamente empaquetados como el espagueti (Englyst y col., 1992).
Estado físico del almidón	La despolimerización y las modificaciones en las propiedades cristalinas del almidón inducidas por el procesamiento de los alimentos, tiene un efecto muy significativo en la accesibilidad de las α -amilasas a su sustrato (ver texto) (Colonna y col., 1992).
Tamaño y morfología del gránulo	Existe una relación inversa entre el tamaño del gránulo y el cociente área-volumen: los gránulos de gran tamaño presentan una menor superficie potencialmente accesible a las enzimas digestivas. Dicha relación es también afectada por la forma del gránulo: los gránulos esféricos son menos accesibles que los polihédricos (Tester y col., 2006).
Cristalinidad del gránulo	Los almidones que exhiben estructuras cristalinas de tipo B y de tipo C tienden ser más resistentes a la hidrólisis que aquellos de tipo A (Oates y col., 1997).
Proporciones relativas de amilosa y de amilopectina	A mayor contenido de amilosa, menor es la digestibilidad del almidón (Berry, 1986).
Formación de complejos de amilosa-lípidos	La presencia de complejos amilosa-lípidos retarda sustancialmente la hidrólisis (Holm y col., 1983).
Antinutrientes	La presencia de las lectinas, los taninos y de los inhibidores de la α -amilasa puede reducir la tasa y la fracción de almidón hidrolizado (Thorne y col., 1983).

El almidón gelatinizado es una estructura inestable. Con el enfriamiento y el almacenamiento del alimento amiláceo, ocurre la reasociación de las cadenas de amilosa y de amilopectina, y la subsecuente recuperación de la propiedad semicristalina del almidón (retrogradación). La retrogradación de la amilosa es veloz, tomando sólo unas pocas horas, mientras que la reasociación de las cadenas externas de la amilopectina puede demorar varios días. Este proceso se acelera a bajas temperaturas, a altas concentraciones de almidón y en almidones con largas cadenas de amilosa y de amilopectina. El almidón retrogradado adopta característicamente un patrón cristalino de tipo B (Colonna y col., 1992).

1.3.3. Clasificación nutricional del almidón

El concepto de “la calidad de los carbohidratos” se basa en los efectos de estos macronutrientes en la glucemia postprandial. En el caso de los polisacáridos como el almidón, la tasa de hidrólisis es un factor determinante en las respuestas glucémica e insulinémica del individuo (Björck y col., 1994).

Una clasificación de los almidones con fines nutricionales y de acuerdo a su susceptibilidad a la digestión, fue propuesta por Englyst y col. (1992) (**Tabla 2**). Las fracciones rápida y lentamente digeribles del almidón son estimadas mediante la cuantificación *in vitro* de los azúcares liberados de la hidrólisis enzimática controlada (por acción de la α -amilasa pancreática) del alimento amiláceo. El almidón rápidamente digerible es hidrolizado completamente entre los 0–20 minutos, mientras que la hidrólisis de la fracción lentamente digerible ocurre entre los 20–120 minutos. Se considera almidón resistente a la fracción que permanece después de los 120 minutos de hidrólisis controlada.

Tabla 2. Clasificación nutricional del almidón.

Tipo de almidón	Susceptibilidad a la digestión	Alimentos que lo contienen
Rápidamente digerible	Rápida y completamente digerido y absorbido en el intestino delgado.	Alimentos amiláceos sometidos a cocción.
Lentamente digerible	Completamente digerido en el intestino delgado, pero de manera significativamente más lenta.	Cereales y otros alimentos amiláceos crudos; pastas.
Resistente:	No digerible	
Tipo1: almidón físicamente inaccesible		Granos y semillas parcialmente molidas; pasta.
Tipo 2: gránulos resistentes		Alimentos amiláceos crudos, y almidones ricos en amilosa.
Tipo 3: almidón retrogradado		Alimentos amiláceos (papa, legumbres y arroz) enfriados previa cocción, pan envejecido.
Tipo 4: almidón con enlaces no amiláceos		Almidones modificados mediante tratamientos químicos y algunos tratamientos físicos drásticos.

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

A pesar de que son escasos los estudios acerca de los beneficios para la salud de la ingesta del almidón lentamente digerible, existen razones para creer que el efecto moderado y estabilizante de esta fracción del almidón en la glucemia postprandial (Lehmann y Robin, 2007), podría ser de interés para el tratamiento de la diabetes (Wolover, 2003) y de la obesidad (Leathwood y Pollet, 1988). Las respuestas glucémica e insulinémica también pueden ser reducidas si se disminuye la ingesta de almidón disponible y se incrementa la del almidón resistente (Wolover, 2003).

1.4. El almidón resistente

1.4.1. Definición

Durante el desarrollo de una técnica analítica para la obtención y la cuantificación de los polisacáridos no amiláceos de los alimentos, Englyst y col. (1982) reportaron la existencia de una fracción del almidón que era capaz de resistir la hidrólisis por acción de la α -amilasa pancreática porcina y de la pululanasa, siendo disponible únicamente tras un tratamiento con álcali (hidróxido de potasio 2 mol/L). Estos hallazgos se vieron reforzados con algunos estudios *in vivo* emprendidos en la década de los 80, los cuales sugirieron la presencia, en múltiples fuentes amiláceas, de fracciones del almidón resistentes a la digestión en el intestino delgado del hombre (Anderson y col., 1981; Stephen y col., 1983; Englyst y col., 1986). En 1992, el almidón resistente fue definido por un grupo de investigadores europeos en una acción concertada, como “la suma del almidón y de los productos de la degradación del almidón que no son absorbidos en el intestino delgado de los individuos saludables” (Asp, 1992). De esta definición fisiológica, se derivaron tres importantes consideraciones. Primero, el almidón resistente no sólo está constituido por polímeros de alto peso molecular, sino que también incluye dextrinas, pequeños

oligosacáridos e incluso glucosa, todos ellos procedentes del almidón digerido que escapa de la absorción. Segundo, el reconocimiento de la fermentación en el intestino grueso, y por acción de la microbiota, del almidón resistente junto con la fibra y algunos oligosacáridos, y la generación durante dicho proceso, de moléculas bioactivas con un potencial efecto beneficioso para la salud del hombre. Por último, el total de almidón resistente que ingresa al colon va a depender de la propia fisiología del individuo y puede verse afectado por la edad, por otros componentes presentes en la matriz del alimento y por las enfermedades del tracto gastrointestinal (Laurentin y Edwards, 2013).

1.4.2. Clasificación del almidón resistente

La clasificación original de Englyst y col. (1992), distingue tres tipos de almidón resistente: almidón físicamente inaccesible, gránulos resistentes y almidón retrogradado (**Tabla 2**). Una cuarta categoría fue propuesta recientemente para incluir aquellos almidones modificados mediante los tratamientos químicos y algunos tratamientos físicos drásticos aplicados en la industria: el almidón con enlaces no amiláceos (Laurentin y Edwards, 2013).

El almidón resistente de tipo 1 agrupa los almidones físicamente inaccesibles a la acción de las α -amilasas debido a la presencia de estructuras externas que protegen al gránulo, por ejemplo, la pared de la célula vegetal. Se encuentra principalmente en las semillas, los granos, los cereales y las legumbres, enteros o parcialmente molidos, aunque también puede hallarse en algunos alimentos amiláceos densamente empaquetados como la pasta. A pesar de que es estable al ser sometido a la cocción, el almidón resistente de tipo 1 puede ser eliminado parcial o totalmente por la ruptura mecánica de la molienda, e incluso

con la masticación de los alimentos (Muir y col., 1994; Sajilata y col., 2006; Laurentin y Edwards, 2013).

El almidón resistente de tipo 2 incluye los almidones no susceptibles a la digestión debido a la combinación de algunas propiedades intrínsecas del gránulo: la forma, el tamaño, la cristalinidad, un alto contenido en amilosa, la presencia de complejos de amilosa-lípidos, etc. (**Tabla 1**). El almidón resistente de tipo 2 está presente en los alimentos amiláceos crudos tales como la papa, el banano y en los almidones ricos en amilosa como el amilo-maíz. La mayor parte de esta fracción de almidón resistente es eliminada con la cocción de los alimentos (Sajilata y col., 2006).

El almidón resistente de tipo 3 agrupa aquellos almidones que han sufrido retrogradación y constituye la fracción de almidón resistente más abundante en los alimentos. El almidón resistente de tipo 3 está presente en los alimentos amiláceos sometidos a cocción y que han sido posteriormente enfriados y almacenados: la papa, el arroz, las legumbres, el pan y las hojuelas de maíz (Laurentin y Edwards, 2013).

Finalmente, es conocido que los almidones modificados en la industria mediante los tratamientos químicos como el entrecruzamiento (generación de rearrreglos moleculares) y la derivatización (adición de grupos químicos en los polímeros) generan fracciones de almidón resistente. Tales tratamientos afectan la temperatura crítica de gelatinización, la estabilidad al congelamiento, la solubilidad en agua fría o la viscosidad; confiriéndole al almidón ciertas características funcionales que son útiles en el procesamiento de los alimentos (Brown, 2010), pues le otorga, además, la capacidad de resistir condiciones que afectarían la integridad de la forma nativa. Más recientemente se ha evidenciado que los almidones modificados mediante algunos tratamientos físicos como la pregelatinización (por extrusión o por secado en tambor) y la pirodextrinización (generación de rearrreglos

moleculares mediante calor seco) generan fracciones resistentes a la hidrólisis enzimática. Laurentin y Edwards (2013) han propuesto una cuarta categoría de almidón resistente, en la cual se incluyen tanto los almidones modificados químicamente como aquellos modificados mediante los tratamientos físicos mencionados: el almidón con enlaces no amiláceos (**Tabla 2**).

1.4.3. Efectos fisiológicos y metabólicos del almidón resistente

La población bacteriana del colon humano es muy numerosa, con al menos 10^{10} – 10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo de peso fresco. Más de 50 géneros de hasta 400 especies de bacterias han sido identificadas en las heces humanas, siendo los bacteroides, las bifidobacterias, los estreptococos y los lactobacilos, los grupos más abundantes (Topping y Clifton., 2001). El enorme número de especies bacterianas y la interdependencia entre ellas, dificulta estimar la contribución de cada grupo en la fermentación de los carbohidratos (Laurentin, 2004); no obstante, el almidón no suele estar presente en las heces humanas o en las heces de los animales experimentales, lo cual sugiere la fermentación más o menos completa de este polisacárido (Sagilata y col., 2006).

La principal propiedad nutricional del almidón resistente radica en su potencial fermentativo, del cual se derivan la mayoría de los efectos fisiológicos y metabólicos que son considerados beneficiosos para la salud humana (**Tabla 3**); es importante destacar que la mayoría de estos efectos han sido observados con una ingesta de 20–30 g/día de almidón resistente, lo cual excede entre cinco a siete veces la ingesta estimada en la mayoría de los países (Laurentin y Edwards, 2013). Del proceso fermentativo del almidón resistente, los ácidos grasos de cadena corta: el acetato, el propionato y el butirato, son los principales productos.

El acetato es el ácido graso de cadena corta mayormente producido durante la fermentación del almidón resistente (50–70%) y es el único que alcanza la circulación periférica en cantidades significativas, proveyendo energía al músculo y a otros tejidos (Laurentin y Edwards, 2013).

El propionato es el segundo ácido graso de cadena corta más abundante (25%). En algunos estudios emprendidos en ratas (Chen y col., 1984; Cheng y Lai, 2000), el propionato ha demostrado reducir el colesterol sérico y las concentraciones hepáticas del colesterol y de los triglicéridos. Este efecto inhibitorio se ha demostrado también en los hepatocitos humanos (Lin y col., 1995), pero requiere concentraciones 100–200 veces superiores de propionato. Mediante un mecanismo que no ha sido completamente dilucidado, el propionato tiene un efecto hipofágico en los rumiantes y estimula la sensación de saciedad en el hombre (Arora y col., 2011).

El butirato es usualmente el ácido graso de cadena corta producido en menor proporción durante el proceso fermentativo de los carbohidratos no amiláceos (10–15%), aunque su producción es comparativamente superior con la fermentación del almidón resistente (20–28%) (Brouns y col., 2002). A pesar de que es utilizado principalmente como nutriente energético por los colonocitos (Laurentin y Edwards, 2013), este ácido graso ha mostrado en múltiples estudios un potencial efecto anticancerígeno. Gamet y col. (1992) hallaron que el butirato inhibe el crecimiento de células cultivadas de adenocarcinoma del colon humano. Otras investigaciones más recientes han demostrado que un nivel incrementado de butirato en el colon disminuye significativamente la incidencia del cáncer intestinal en los murinos (Clarke y col., 2008) y el riesgo de cáncer de colon en el hombre (O’Keefe y col., 2009).

Tabla 3. Efectos fisiológicos y metabólicos del almidón resistente.

Saciedad	Estimulación de la sensación de saciedad en el hombre (Willis y col., 2009).
Respuesta glucémica	Las legumbres (ricas en almidón resistente de tipo 1) y los almidones con alto contenido en amilosa (ricos en almidón resistente de tipo 2) generan una baja respuesta glucémica (Thorne y col., 1983; Granfeldt y col., 1995).
Metabolismo de los lípidos	Inhibición en los murinos de la síntesis hepática del colesterol y de los triglicéridos (Cheng y Lai, 2000).
pH del colon	La producción de algunos ácidos orgánicos durante la fermentación, disminuye el pH luminal del colon. Tal acidificación inhibe el crecimiento de algunas poblaciones microbianas potencialmente patógenas como <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> (Cherrington y col., 1991).
Sales biliares	Las sales biliares secundarias como el desoxicolato, de actividad citotóxica, precipitan con la acidificación del lumen del colon (van Munster y col., 1994).
Proliferación celular del colon	Hay indicios de que el butirato estimula la proliferación celular del colon proximal, pero la inhibe en la porción distal.
Deposición fecal y tiempo de tránsito	Incremento de la masa fecal como consecuencia de la proliferación bacteriana y de la retención de agua en las heces (Phillips y col., 1995). Las evidencias que apoyan la reducción del tiempo de tránsito de la materia fecal son contradictorias (Cummings y col., 1996; Ferguson y col., 2000).
Micronutrientes	Incremento en los murinos de la absorción intestinal de calcio y magnesio (Younes y col., 2001), y de calcio y zinc en los cerdos infantiles (Morais y col., 1996).
Prevención de enfermedades	Prevención del estreñimiento (Nugent y col., 2005) y un posible rol protector contra el cáncer colorrectal (O'Keefe y col., 2009).

Adaptado de Laurentin y Edwards (2013).

2. El banano como fuente amilácea no convencional

Banano es un término general que designa tanto a las numerosas especies (e híbridos) de plantas herbáceas pertenecientes al género *Musa* de la familia de las musáceas, como al fruto que de ellas se obtiene. La inmensa mayoría de los *cultivares* (*cultivated varieties*, variedades de frutos comestibles) provienen de dos especies diploides: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, ambas originarias del sudeste asiático (Simmons y Shepherd, 1955). Los bananos considerados comestibles, son por lo general variedades clonales estériles, partenocárpicas y sin semillas, a diferencia de las variedades silvestres cuya abundancia en semillas hace difícil separar la pulpa (Valmayor y col., 2000). Simmons y Shepherd (1955) idearon un sistema de clasificación de los cultivares en base a su ploidía y a su constitución genómica, en el cual cada cultivar recibe un código de entre dos y cuatro letras. La haploidía *acuminata* se designa con la letra A y la haploidía *balbisiana* con la letra B. Así, entre los cultivares con genomio *acuminata* se hallan diploides (AA), triploides (AAA) y tetraploides (AAAA); mientras que entre los cultivares híbridos de *acuminata* y *balbisiana* se hallan diploides (AB), triploides con dominancia *acuminata* (AAB), triploides con dominancia *balbisiana* (ABB) y tetraploides (AAAB, AABB y ABBB). La partenocarpia no evolucionó en *M. balbisiana*, por lo cual no existen cultivares de esta especie (Ploetz y col., 2007).

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

La pulpa del banano verde contiene hasta 70–80% de almidón en peso seco, un porcentaje comparable con el del endospermo de los granos del maíz y el de la pulpa de la papa blanca (Zhang y col., 2005). Sin embargo, debido a la acción conjunta de múltiples enzimas, el contenido de almidón declina sostenidamente durante la maduración del fruto hasta alcanzar menos del 5% al final del período climatérico, con el consiguiente incremento de los contenidos de sacarosa y de azúcares reductores (Marriott y col., 1981, Zhang y col., 2005). Cabe destacar que en el caso del plátano, la degradación del almidón y la producción de los azúcares ocurre de forma sustancialmente más lenta que en el cambur (Marriott y col., 1981).

Los gránulos del almidón del banano son predominantemente ovales e irregulares, con ejes mayores que varían entre los 6–80 μm de longitud, en su mayoría entre 20–60 μm (Zhang y col., 2005). Si bien se ha hallado el patrón cristalino tipo A en algunas variedades de banano (Bello-Pérez y col., 2000; Carmona-García y col., 2009), se reportan más frecuentemente los patrones tipo B (Carlos-Amaya y col., 2011; Vatanasuchart y col., 2012) y tipo C (Marín, 2009; Pellisari y col., 2012), ambos relacionados con una baja digestibilidad.

El almidón nativo del banano presenta una baja susceptibilidad a la hidrólisis enzimática y un alto contenido de almidón resistente (Galeno, 2006; Marín, 2009; Martín, 2010). Englyst y Cummings (1986) realizaron estudios en algunos pacientes ileostomizados y encontraron que hasta un 78% de los α -glucanos del banano crudo (el almidón y los productos de su degradación) escapan de la digestión en el intestino delgado. Años más tarde, Faisant y col. (1995) estudiaron la digestibilidad de las harinas del banano en humanos saludables y hallaron hasta un 84% de sus α -glucanos en el contenido luminal del íleon. Interesantemente, Carlos-Amaya y col. (2011) y Zhang y Hamaker (2012)

evidenciaron recientemente la permanencia, en el almidón de banano gelatinizado (sometido a 20 minutos de cocción), de cantidades significativas de almidón lentamente digerible (13–19%) y de almidón resistente (22–27%), fracciones que son superiores a las encontradas en los almidones gelatinizados de la papa (9% y 17%, respectivamente) y del maíz (14% y 16%, respectivamente) (Zhang y Hamaker, 2012). Dado que los altos contenidos de almidón lentamente digerible y de almidón resistente se han relacionado con una baja respuesta glucémica (Wolover, 2003; Lehmann y Robin, 2007), los almidones y las harinas del banano podrían ser empleados en la formulación de productos comestibles funcionales de bajo índice glucémico, que representarían una alternativa nutricional para aquellos grupos de consumidores con necesidades nutricionales especiales; por ejemplo, aquellas personas que padecen de diabetes y de obesidad.

Bello-Pérez y col. (2004), Aparicio-Saguilán y col. (2006) y Agama-Acevedo y col. (2012) reportaron en las galletas enriquecidas con las harinas y los almidones del banano, tasas de digestión *in vitro* significativamente más bajas que las reportadas en los productos horneados a base de almidón de maíz o de trigo. Hernández-Nava y col. (2009), por su parte, fabricaron espaguetis adicionados con almidón de plátano, ingrediente que incrementó significativamente el contenido de almidón resistente del alimento. Estos estudios demuestran el potencial que tienen las harinas y los almidones del banano para convertirse en alimentos amiláceos comercialmente viables.

3. El estudio de la digestibilidad de los almidones

La digestibilidad es la principal característica nutricional de los alimentos amiláceos, un parámetro cuantitativo que puede ser estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*. Un estudio robusto relaciona las observaciones derivadas de ambos enfoques.

En las investigaciones emprendidas por García (2003), Galeno (2006), Marín (2009) y Martín (2010) se ha evaluado la digestibilidad *in vitro* de los almidones nativos y modificados de diversas fuentes botánicas tales como la papa, el maíz, *Canavalia ensiformis* L. (haba de burro) y el banano, mediante análisis químicos y enzimáticos. La estimación de los contenidos de almidón disponible y de almidón resistente ha permitido indagar acerca de la biodisponibilidad de los almidones, mientras que la cinética de α -amilólisis ha proporcionado información sobre las velocidades de digestión enzimática.

En todos estos estudios se encontró una gran variabilidad en la biodisponibilidad y en la susceptibilidad de los almidones nativos a la hidrólisis, lo cual evidencia la gran diversidad existente en la composición química y en la estructura de los gránulos según el origen botánico. En comparación con los almidones muy disponibles como el del maíz, los almidones aislados del banano presentaron bajas tasas de hidrólisis que han sido atribuidas al alto tenor de almidón resistente (36–63%) encontrado en estos alimentos (García, 2006; Marín, 2009; Martín, 2010).

Los análisis de la digestibilidad *in vivo*, por su parte, demandan el uso de un modelo animal. La implementación de los modelos animales, tradicionalmente ratas (Tovar y col., 1992), cerdos (Regmi y col., 2011) y aves (Weurding y col., 2001) para estos estudios nutricionales, ha sido posible debido a las similitudes existentes en los procesos biológicos que se dan entre las especies, incluyendo el humano (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Resulta interesante que los nutrientes básicos son generalmente los mismos y tanto los sistemas enzimáticos como las reacciones metabólicas esenciales que permiten el aprovechamiento de dichos nutrientes, se han conservado en múltiples niveles de la escala zoológica (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Las investigaciones en los animales han contribuido en gran medida a lo que se conoce actualmente sobre la nutrición y el

metabolismo. Probablemente, no hay mejores ejemplos de cómo los animales experimentales han aportado información básica sobre estos fenómenos biológicos, que los estudios fundamentados en la biodisponibilidad de los nutrientes y de sus precursores (Baker, 2008). En estos estudios *in vivo*, se suelen evaluar ciertos biomarcadores que son el reflejo de las interacciones metabólicas que ocurren en el organismo y constituyen respuestas biológicas que pueden correlacionarse con las variables estimadas *in vitro*.

Tovar y col. (1992) pusieron a prueba el valor predictivo de dos métodos de estimación *in vitro* del almidón indigerible presente en las legumbres. Para ello, cuantificaron la fracción del almidón remanente en las heces de ratas tratadas con antibióticos, a fin de suprimir la fermentación de los α -glucanos en el colon. Regmi y col. (2011) estudiaron el efecto de la ingesta de los almidones con alto contenido en amilosa sobre las respuestas metabólicas del cerdo. Estos autores encontraron que las proporciones de almidón hidrolizado estimadas *in vitro*, presentan fuertes correlaciones con los niveles plasmáticos de glucosa, de insulina, del péptido C, del péptido inhibidor gástrico y de los ácidos grasos de cadena corta entre 0–10 horas postprandiales. Los estudios llevados a cabo por Weurding y col. (2001) en el pollo de engorde, demostraron que las proporciones estimadas *in vitro* de almidón hidrolizado al cabo de 2 y 4 horas, muestran buenas correlaciones con la extensión de la digestión de los α -glucanos en la primera mitad del intestino delgado y en el íleon, respectivamente.

4. El gorgojo de arroz como modelo en los estudios nutricionales

El gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) es una especie cosmopolita que en climas cálidos representa una seria amenaza para los cereales almacenados y sus derivados (Lorini y col., 2010). Este insecto se empleó inicialmente

como modelo en toxicología nutricional, concretamente en el estudio del efecto de los factores antinutricionales presentes en las leguminosas (Szwarcbort, 1980; Carmona y Gomez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998). Más tarde, demostró su utilidad en la evaluación de la calidad nutricional de la proteína dietaria (López, 1999) y en el estudio de la biodisponibilidad de los almidones aislados del banano (Galeno 2006, Martín, 2010) y de otras fuentes botánicas (García 2003).

El uso de los insectos como modelo en los ensayos nutricionales ha proporcionado una alternativa novedosa a la utilización de los animales vertebrados, teniendo como ventaja la corta duración y el menor costo económico de los bioensayos. Desde el punto de vista nutricional, los requerimientos de los insectos y de los animales superiores son semejantes (Carmona y col., 1998); con una notable excepción en que los primeros no son capaces de generar colesterol y, por ende, dependen del esteroles alimentario (Klowden, 2007). En el caso particular de los insectos fitófagos, el campesterol, el sitosterol y el estigmasterol son los principales esteroides en la dieta; un grupo de lípidos neutros que en los almidones aislados de diversas fuentes botánicas, se ubican en segundo lugar en orden de importancia después de los ácidos grasos (Vasanthan y Hoover, 1992). Otra diferencia metabólica relevante, es la utilización de la trehalosa en lugar de la glucosa como fuente de energía circulante, lo cual favorece la transferencia pasiva de la glucosa dietaria desde el tracto alimentario a la hemolinfa del insecto (Klowden, 2007).

Los estudios realizados por Baker y Woo (1992) en este insecto, condujeron al planteamiento de una hipótesis acerca de cómo ocurre la degradación del endospermo del grano de trigo y el aprovechamiento de los gránulos nativos del almidón en el tubo digestivo del insecto. El gorgojo de arroz presenta un aparato bucal masticador y un canal alimentario diferenciado en tres regiones: intestino anterior, intestino medio e intestino

posterior. En la cavidad bucal, la masticación mandibular extensiva de las células del endospermo, incrementa la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la acción enzimática. Una vez triturados, los gránulos de almidón ingresan al intestino y continúan su tránsito a través del esófago, el proventrículo y el buche. Las α -amilasas presentes en el medio luminal del buche inician la hidrólisis enzimática del almidón, proceso que parece ser facilitado por la acción de las lipasas y de los detergentes, pues favorecen la remoción del material lipídico de la superficie de los gránulos. La digestión del almidón continúa en el intestino medio y probablemente se detiene al alcanzar el intestino posterior, donde el material no digerido se prepara para ser defecado. Algunos estudios emprendidos en el gorgojo del arroz (Szwarcbort, 1980; Baker, 1987), señalaron que las α -amilasas presentes en este animal exhiben unas actividades catalíticas comparables con la de la α -amilasa pancreática porcina, enzima comúnmente utilizada en los estudios de digestibilidad *in vitro* de los alimentos amiláceos. Este modelo, por lo tanto, ha sido prometedor para emprender la tarea de identificar biomarcadores que permitan evaluar la calidad nutricional de este tipo de alimentos.

García (2003) y Galeno (2006) evaluaron el desempeño del gorgojo de arroz como herramienta en la estimación de la biodisponibilidad de los almidones nativos y modificados. Estos autores, analizaron la composición corporal (agua, grasa y proteína), la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico de los insectos alimentados con las diferentes dietas y comprobaron que los dos últimos biomarcadores presentaron las correlaciones más robustas con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. En estos estudios, los almidones de baja digestibilidad, entre los cuales se incluye el del banano, indujeron las mayores actividades α -amilolíticas y excreciones de ácido úrico. Martín

(2010) confirmó la utilidad de la actividad α -amilasa y del contenido de grasa corporal como estimadores de la biodisponibilidad de los almidones nativos del banano, al correlacionarse ambos con el contenido de almidón resistente. Recientemente se evaluó el desempeño de la actividad similar a α -amilasa y de la excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz, como biomarcadores de la digestibilidad de los almidones y de las harinas del plátano, del fororo y del gofio; obteniéndose buenas correlaciones con el porcentaje de almidón disponible (Alexander Laurentin, comunicación personal).

En el presente Trabajo Especial de Grado se caracterizó la digestibilidad de los almidones aislados de los frutos de 15 plantas de banano cultivadas en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay, estado Aragua, Venezuela. Este banco almacena más de 100 variedades de banano (entre silvestres y cultivares); sin embargo, para la fecha de ejecución de este trabajo, la digestibilidad del almidón aislado sólo se había estudiado en una docena de ellos. Con este trabajo se aportaron los estudios nutricionales de 15 almidones adicionales.

Los estudios *in vitro* involucraron la aplicación de los métodos químicos y enzimáticos para la estimación de los contenidos de almidón disponible, de almidón resistente y de las tasas de α -amilólisis. En los estudios *in vivo* se estimaron los biomarcadores supervivencia, variación del peso, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz (*S. oryzae*) a fin de relacionar las respuestas biológicas de los insectos alimentados, con los parámetros de la digestibilidad determinados *in vitro*.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Comparar los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* de los almidones aislados de 15 clones de bananos, con los indicadores de disponibilidad *in vivo*, empleando el bioensayo del gorgojo de arroz.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Estimar los contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones aislados de los bananos.
- 2.2. Evaluar la tasa de α -amilólisis *in vitro* de los almidones aislados de los bananos.
- 2.3. Estimar la supervivencia, la variación del peso, la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los almidones aislados de los bananos, indicadores que permitirán evaluar la disponibilidad *in vivo* del nutriente.
- 2.4. Correlacionar las respuestas biológicas observadas *in vivo* con los indicadores de disponibilidad evaluados *in vitro*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de almidón

Los almidones caracterizados se aislaron de los frutos de 15 clones de plantas musáceas (**Tabla 4**). Los bananos fueron cosechados de acuerdo a la disponibilidad del banco de germoplasma y con un grado de madurez 1 (verde), según la escala de von Loesecke (1950), momento en el cual suelen presentar el mayor contenido de almidón. Los almidones se aislaron según el método descrito por Pérez y col. (1993) en el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Doctora Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Se incluyó como referencia en todos los análisis, un almidón de alta biodisponibilidad (almidón de maíz comercial; Alfonso Rivas & Cía. C.A., Caracas).

2. Digestibilidad *in vitro* de los almidones de banano

La digestibilidad de las muestras de almidón de banano fue caracterizada *in vitro* mediante la estimación de los parámetros: almidón disponible, almidón resistente y tasa de α -amilólisis. Esta última variable fue estimada tanto con los almidones crudos como con los gelatinizados.

Tabla 4. Clasificación, nombre común y forma de consumo de los clones de banano.

Especie	Genomio	Clon	Nombre común	Sub-grupo	Forma de consumo
<i>Musa acuminata</i>	AA	HH4	No identificado	No identificado	—
		HH12	No identificado	No identificado	—
		HH22	No identificado	No identificado	—
	AAA	HH1	Yangambi Km 5	Ibota	Postre [†]
		017	No identificado	Cavendish	Postre [†]
		018	Higate	Gros Michel	Postre [†]
		038	Cambur Morado	Red/Green Red	Postre [†]
	AAAA	115	Somaclon	Somaclon	Postre
		118*	Somaclon	Somaclon	Postre
<i>Musa × paradisiaca</i>	AB	HH8	No identificado	No identificado	—
	AAB	055	Pisang Raja	Pisang Raja	Postre [†]
		076	Prata Aña	Pome	Postre [†]
	ABB	073	Topocho Cardaba	Bluggoe	Cocción [†]
		087	Saba	Saba	Cocción [†]
		089	Topocho Poncho	Bluggoe	Cocción [†]

Los bananos fueron suministrados por el banco de germoplasma de musáceas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua, Venezuela. Los somaclones son plantas producidas por técnicas de ingeniería genética. * Sinónimo: CIEN-BTA-03. [†] Forma de consumo según Ploetz y col. (2007).

2.1. Estimación del contenido de almidón disponible

Para estimar el contenido de almidón que es potencialmente susceptible al ataque amilolítico, se empleó el método enzimático descrito por Holm y col. (1986). Se efectuó la dispersión de una alícuota de 300 mg de peso seco de cada almidón, en un volumen de 20 mL de agua. Se ajustó el pH de la suspensión entre 6–7 unidades y se agregó 0,1 mL de α -amilasa bacteriana termoestable Termamyl[®] 120L (NOVO Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) para luego incubar la suspensión en un baño de María a ebullición por 20 minutos, proceso que ocasiona la gelatinización del almidón e inicia su hidrólisis. Una vez atemperada, se trasvasó y enrasó la suspensión en un balón aforado de 100 mL. En un tubo de ensayo se vertieron 0,5 mL de la suspensión junto con 1 mL de solución 0,5 g/L de la amiloglucosidasa de *Rhizopus sp.* (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) y se incubó la mezcla en un baño de María a 40° C por 60 minutos con agitación constante. Luego, se trasvasó y enrasó la solución en un balón aforado de 10 mL.

Se estimó la cantidad de glucosa liberada con ayuda de un estuche comercial (glucosa oxidasa cat. 89250, Industrias Invelab[®], Caracas) basado en el sistema glucosa oxidasa-peroxidasa. Se adicionaron en tubo de ensayo, 0,05 mL del hidrolizado junto con 1 mL del reactivo enzimático. Una vez iniciada la reacción, los tubos se incubaron en un baño de María a 37 °C durante 10 minutos. Culminado el período de incubación, se empleó un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 510 nm de las muestras. Para la cuantificación de la glucosa presente en cada tubo del ensayo colorimétrico a partir de los valores de absorbancia leídos, se utilizó la ecuación de una curva patrón elaborada con un estándar de glucosa 1 g/L: $y = 0,0307x + 0,001$ ($R^2 = 0,999$; $n = 18$).

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

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

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

2.2. Estimación del contenido de almidón resistente total

El método enzimático descrito por Goñi y col. (1996) permite cuantificar el tenor de almidón resistente total de los alimentos, esto es, la suma de la fracción físicamente inaccesible (almidón resistente tipo 1), más las fracciones de gránulos nativos no digeribles (almidón resistente tipo 2) y aquellas debidas a retrogradación (almidón resistente tipo 3).

La primera etapa del método busca simular las condiciones estomacales. Una alícuota de 100 mg en peso seco de cada almidón se dispersó en 10 mL de buffer KCl-HCl, pH 1,5. Se agregaron 0,2 mL de solución de pepsina (P-7000, Sigma Chemical Co., St.

Louis, EE.UU.) 100 g/L en buffer HCl-KCl y se incubó la muestra en un baño de María a 40 °C por 60 minutos en agitación constante.

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

La tercera etapa permite separar el almidón resistente y la fibra (componentes insolubles) de la fracción hidrolizada (componente soluble). Se centrifugó la suspensión a $3.000 \times g$ por 15 min (entre 0 y 5 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 mL de agua destilada. Luego, se aplicó una segunda centrifugación y se descartó nuevamente el sobrenadante.

En la cuarta etapa se busca separar el almidón resistente de la fibra y promover la hidrólisis del primero. Se agregó 3 mL de agua destilada y 3 mL de solución 4 mol/L de KOH recién preparado. Luego de agitó la suspensión magnéticamente durante 30 minutos, se adicionaron 5,5 mL de solución de HCl 2 mol/L, 3 mL de buffer acetato de sodio 0,4 mol/L, pH 4,75 y 1 mL de solución de amiloglucosidasa de *Rhizopus* (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) a 4,8 g/L en el buffer acetato. Se incubó la mezcla a 40 °C con agitación constante durante 60 minutos. Una vez atemperada, la mezcla se centrifugó un par de veces a $3.000 \times g$ durante 15 min (entre 0 y 5 °C) cada una. Los sobrenadantes resultantes se trasvasaron a un balón aforado de volumen apropiado (usualmente 100 mL) dependiendo de la cantidad de glucosa liberada. La determinación de la glucosa se realizó tal como se ha indicado en el apartado 2.1 de la presente sección. La

fórmula empleada para el cálculo del porcentaje de almidón resistente total se indica a continuación:

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

- ^(a) V_f : Volumen final de la solución que contiene la glucosa liberada a partir del almidón resistente, en mililitros (usualmente 100 mL).
- ^(b) Corrección de glucosa a glucano.
- ^(c) Alícuota tomada para la cuantificación de la glucosa, en mililitros.
- ^(d) Conversión de microgramo a miligramo.

2.3. Estimación de la tasa de α -amilólisis

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

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

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) disuelto en tartrato de Na,K a 300 g/L en NaOH (16 g/L).

La cuantificación de los azúcares reductores liberados por acción de la α -amilasa pancreática se realizó según el método químico descrito por Hostettler y col. (1951). Las muestras fueron introducidas en un baño a ebullición durante 10 minutos. Finalizada la incubación, se dejaron atemperar en un baño de María a temperatura ambiente por 2 minutos; luego se les añadió 15 mL de agua destilada, se las mezcló por inversión y se les midió la absorbancia a 530 nm. Para calcular los contenidos de azúcares reductores, se utilizó la fórmula de una curva patrón elaborada con un estándar de maltosa 10 g/L: $y = 0,3809x - 0,011$ ($R^2 = 0,999$; $n = 7$).

El porcentaje de α -amilólisis se calculó para cada tiempo y se expresó en equivalentes de maltosa según la siguiente ecuación:

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

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

^(b) Corrección de maltosa a glucano.

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

3. Digestibilidad *in vivo* de los almidones de banano

La caracterización *in vivo* de la digestibilidad de las muestras de almidón de banano, se llevó a cabo mediante la utilización del gorgojo de arroz (*S. oryzae*) como modelo animal. Se estimaron los biomarcadores: supervivencia, variación del peso, excreción de ácido

úrico y actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con las dietas de almidón.

3.1. Preparación de las dietas de almidón

En el bioensayo del gorgojo de arroz, los almidones suministrados como dieta deben proveerse en forma de semillas artificiales de manera que los insectos puedan alimentarse. Para la elaboración de las semillas artificiales, se efectuó el método descrito por Martín (2010). A una alícuota de 6 g de cada almidón se le añadió un volumen variable de agua destilada hasta obtener una mezcla con una consistencia semisólida. La suspensión debe ser lo suficientemente diluida como para que no se mantenga almidón seco en el fondo del recipiente, pero lo suficientemente densa como para observar un flujo continuo al verter una porción de la mezcla desde 1 ó 2 cm de altura con ayuda de un agitador de vidrio. Utilizando una inyectora de 10 mL, se vertieron sobre un papel encerado dispuesto sobre una bandeja, dos gotas de mezcla por cada semilla artificial. Las semillas artificiales húmedas se dejaron secar en una estufa a 37 °C durante 24 horas.

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

Se colocaron grupos de 100 gorgojos de arroz en frascos de vidrio recubiertos con una malla doble y conteniendo arvejas verdes peladas y partidas (compradas en un mercado local) ocupando cerca de la mitad de su capacidad, aproximadamente 250 g. Los frascos se almacenaron en oscuridad. Una vez transcurridos 15 días, los insectos padres fueron retirados de los cultivos y se esperaron de 3 a 4 semanas adicionales para la emergencia de la progenie. Así, es posible obtener poblaciones relativamente homogéneas de insectos con

una edad y una masa corporal semejantes. Durante la emergencia, se seleccionaron de los cultivos aquellos insectos con un peso de $1,6 \pm 0,1$ mg (día -1). El bioensayo se inició al día siguiente de la selección (día 0).

3.3. Bioensayo con el gorgojo de arroz

En viales de vidrio se depositaron 2 g de las semillas artificiales del almidón correspondiente junto con poblaciones de 30 insectos, para un total de tres réplicas por dieta. Adicionalmente, se incluyó un control de calidad [condición de ayuno y condición alimentada (dieta de arvejas verdes)] y un almidón de referencia (las semillas artificiales del almidón de maíz comercial indicado en el apartado 1 de la presente sección).

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

3.4. Cálculo de la supervivencia y de la variación del peso

Con los datos registrados durante el bioensayo, se estimaron los biomarcadores supervivencia (S) y variación del peso (VP). Las fórmulas empleadas para el cálculo de ambos biomarcadores se indican a continuación:

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

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

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

3.5. Estimación de la actividad similar a α -amilasa

La actividad similar a α -amilasa de los grupos de insectos alimentados con los almidones de los bananos, se estimó según las condiciones descritas por Szwarcbort (1980), con modificaciones.

Los grupos de insectos provenientes de cada vial, que sobrevivieron al día 8, fueron homogeneizados en un volumen apropiado de buffer acetato de sodio (50 mmol/L, pH 5 a 4 °C, 15 insectos por mililitro) empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem con 10 golpes a 750 r.p.m. (usualmente un minuto). Luego, los extractos se centrifugaron en tubos Eppendorf a $16.000 \times g$ por 5 min.

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

La estimación de los azúcares reductores liberados por las enzimas del insecto se realizó según el método químico propuesto por Hostettler y col. (1951), tal y como se describió en el apartado 2.3 de la presente sección. La actividad similar a α -amilasa (ASA) se expresó como los micromoles de equivalentes de maltosa liberados por segundo y por litro del extracto acuoso ($\mu\text{mol/s} \times \text{L}$):

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

- (a) Factor de conversión de mol a micromol.
- (b) Factor de conversión de microlitro a litro.
- (c) Factor de conversión de miligramo a gramo.
- (d) Masa molecular de la maltosa, en gramos por mol.
- (e) Tiempo de reacción en segundos.
- (f) Alícuota del sobrenadante tomada para llevar a cabo la reacción enzimática, en microlitros.

3.6. Estimación de la excreción de ácido úrico

La excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz fue estimada mediante el método propuesto por González-Quilen y Laurentin (2012). El ácido úrico se extrajo a partir de las excretas adheridas a la superficie interna del vial de vidrio y de los restos de la dieta al final del bioensayo (día 8). Se requirió primeramente, la transferencia exhaustiva de los restos de la dieta fuera del vial y su posterior homogeneización. Las semillas artificiales de almidón se trituraron manualmente con un mortero; mientras que las arvejas verdes de la condición de alimentado, se molieron en un molinillo eléctrico previo a la trituración manual con el mortero. Una vez homogeneizado el material, se pesó y se devolvió cuidadosamente al vial, una alícuota de 500 mg. La extracción del ácido úrico se realizó vertiendo 2 mL de agua destilada en ebullición sobre los restos de la dieta, procurando arrastrar las excretas adheridas al vial de vidrio. Luego de mezclar el contenido del vial empleando un vórtex a

velocidad máxima por un minuto, se transfirió la suspensión a un par de tubos Eppendorf (1 mL de suspensión por cada tubo). Los tubos Eppendorf fueron centrifugados a $16.000 \times g$ durante 5 min. Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación se juntaron en un tercer tubo Eppendorf. Para la extracción de los viales de la condición de ayuno, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero obviando el paso de la homogeneización.

La estimación del contenido de ácido úrico se realizó con ayuda de un estuche comercial (ácido úrico enzimático-colorimétrico cat. 89015, Industrias Invelab[®], Caracas). Se adicionaron en un tubo de ensayo, 25 μ L del sobrenadante junto con 1 mL del reactivo enzimático. Una vez iniciada la reacción, los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min. Luego, se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 520 nm de las muestras. Para determinar la cantidad de ácido úrico presente en cada tubo del ensayo colorimétrico a partir de las absorbancias medidas, se utilizó la ecuación de una curva patrón elaborada con el estándar de ácido úrico 0,05 g/L del estuche comercial: $y = 0,1475x - 0,004$ ($R^2 = 0,998$; $n = 7$).

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

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

$$EAU \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{\text{Cantidad de ácido úrico } (\mu g) \times 2^{(a)}}{0,025^{(b)} \times \text{Peso de los insectos sobrevivientes al día 8 (g)}}$$

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

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

4. Análisis estadístico

Los cálculos y las regresiones lineales (coeficiente de determinación) de las curvas patrón se realizaron con Microsoft Office Excel[®] 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE.UU.). Los análisis de varianza (ANOVA de una vía), las correlaciones simples (coeficiente de Pearson) y el Z-score, así como los gráficos de ajuste lineal y los diagramas de caja y bigotes, se realizaron con Minitab[®] 16 de Minitab Inc. (State College, Pensilvania, EE.UU.). Se utilizó $\alpha = 0,05$ como nivel de significancia.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó la digestibilidad de los almidones aislados de los frutos de 15 clones de plantas del género *Musa*. Para ello, se emprendieron estudios *in vitro* e *in vivo*. En todos los análisis se incluyó el almidón del maíz como referencia debido a su alta biodisponibilidad y por ser el principal almidón a nivel comercial en el país. El mayor nivel de susceptibilidad a la digestión exhibido por el almidón de maíz en comparación con aquellos aislados de otras fuentes amiláceas, se ha atribuido a la presencia de canales interiores en la estructura granular que favorece la accesibilidad de las enzimas digestivas a su sustrato (Zhang y col., 2005).

1. Digestibilidad *in vitro* de los almidones de banano

El estudio de la digestibilidad *in vitro* de los almidones de banano involucró la estimación de los contenidos de almidón disponible, de almidón resistente y de la tasa de hidrólisis por acción de la α -amilasa pancreática porcina.

1.1. Almidón disponible

La fracción de almidón disponible fue medida indirectamente mediante la cuantificación de la cantidad de glucosa liberada de la hidrólisis exhaustiva del almidón gelatinizado, por la acción conjunta de una α -amilasa termoestable y de la amiloglucosidasa. Los almidones aislados presentan bajos contenidos de proteína, de lípidos y de otros componentes de la dieta, por lo cual carecen virtualmente de una matriz alimentaria que pueda limitar la accesibilidad de las enzimas digestivas a los α -glucanos, al contrario de otros alimentos farináceos como las harinas (Singh y col., 2010). Por

consiguiente, es de esperar que el porcentaje de almidón disponible estimado en una muestra de almidón aislado, sea muy próximo al porcentaje de almidón total y sirva como un indicador del grado de pureza y de la eficiencia del método de aislamiento.

Se estimaron moderados y altos porcentajes de almidón disponible en los almidones de los bananos (78–94%; **Tabla 5**), valores que fueron sin embargo, inferiores a los reportados por García (2003) y Galeno (2006) para los almidones aislados de otras fuentes amiláceas como la papa (95%), el maíz (98%) y el apio (94%). Según Bello-Pérez y col. (2004) buena parte de las impurezas presentes en los almidones aislados del banano incluye materiales no amiláceos como el mucílago. La composición del material mucilaginoso de *Musa × paradisiaca* fue analizada en los estudios de fraccionamiento realizados por Mondal y col. (2001), detectándose cantidades significativas de arabinosa, xilosa y ácido urónico, todos estos, residuos de carbohidratos que forman parte de la fibra.

Aunque todos los almidones ensayados tuvieron el mismo origen botánico, se encontró cierto grado de variabilidad en los contenidos estimados de almidón disponible, lo cual podría atribuirse a las diferencias encontradas en la abundancia del material mucilaginoso entre los clones de banano. Durante el aislamiento de los almidones HH1 (AAA) y HH8 (AB), se reportó dificultades en la separación del material no amiláceo (Elevina Pérez., comunicación personal), hecho consistente con los relativamente bajos contenidos de almidón disponible (78 y 83%, respectivamente) hallados en estas muestras. La composición genética de los clones aparentemente no influyó en el contenido de almidón disponible. En este sentido, los porcentajes promedio de este parámetro variaron ligeramente entre los grupos genómicos (84–88%; **Tabla 5**), exceptuando el genomio AB que presentó un contenido notablemente inferior (78%) y atribuible, como se ha indicado, a una presumiblemente alta proporción de mucílago.

Tabla 5. Contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total en los almidones de banano.

Genomio	Almidón	Almidón disponible (%)	Almidón resistente total (%)
—	Referencia	90,4 ± 1,2 ^b	1,5 ± 0,1 ⁱ
AA	HH4	89,2 ± 1,0 ^{b,c}	52,1 ± 2,0 ^{c,d}
	HH12	82,7 ± 1,5 ⁱ	48,1 ± 2,0 ^{f,g}
	HH22	85,1 ± 0,7 ^{f,g,h}	58,4 ± 1,2 ^a
	Media (n = 9)	85,7 ± 3,0	52,9 ± 4,7
AAA	HH1	83,0 ± 1,4 ^{h,i}	48,5 ± 1,5 ^{f,g}
	017	94,0 ± 1,1 ^a	54,3 ± 0,8 ^{b,c}
	018	85,3 ± 2,4 ^{e,f,g}	53,8 ± 1,6 ^{b,c,d}
	038	90,7 ± 1,9 ^b	46,3 ± 0,6 ^g
	Media (n = 12)	88,3 ± 4,8	50,7 ± 3,7
AAAA	115	83,4 ± 0,6 ^{g,h,i}	47,7 ± 2,1 ^{f,g}
	118 [*]	84,7 ± 0,3 ^{f,g,h,i}	56,0 ± 2,0 ^{a,b}
	Media (n = 6)	84,0 ± 0,8	51,8 ± 4,9
AB	HH8	77,7 ± 1,7 ^j	41,4 ± 1,8 ^h
	Media (n = 3)	77,7 ± 1,7	41,4 ± 1,8
AAB	055	87,6 ± 0,7 ^{c,d,e}	49,6 ± 1,2 ^{e,f}
	076	86,9 ± 1,9 ^{d,e,f}	54,5 ± 1,2 ^{b,c}
	Media (n = 6)	87,2 ± 1,3	52,0 ± 2,9
ABB	073	89,5 ± 1,0 ^{b,c}	51,7 ± 1,8 ^{d,e}
	087	88,0 ± 1,4 ^{c,d}	46,8 ± 1,2 ^g
	089	85,4 ± 1,2 ^{e,f,g}	41,4 ± 0,7 ^h
	Media (n = 9)	87,6 ± 2,1	46,6 ± 4,6

Los porcentajes son el promedio ± la desviación estándar sobre la base seca (g/100 g; $n = 3$). Los valores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, Prueba de Fisher). La referencia es el almidón de maíz. Como estándar para los ensayos del almidón disponible se utilizó un almidón de papa comercial (95,8 ± 2,9%; $n = 16$). Como estándares para los ensayos de almidón resistente total se utilizó Corn flakes[®] (3,7 ± 0,2%; $n = 16$) y el almidón del plátano de hartón común (45,2 ± 1,1%; $n = 7$; AAB).

* Sinónimo: CIEN-BTA-03.

Empleando el método de Holm y col. (1986), Bello-Pérez y col. (2004) obtuvieron un 60% de almidón disponible en el almidón del plátano macho, mientras que Galeno (2006), Marín (2009) y Martín (2010) estimaron entre 82–99% de almidón disponible en diversas muestras de almidón de banano. Martín (2010) cuantificó un 82% en la muestra HH12 (AA), un valor muy similar al estimado para el mismo almidón en el presente estudio (**Tabla 5**).

1.2. Almidón resistente total

El método multienzimático de Goñi y col. (1996) permite cuantificar el porcentaje de almidón indigerible presente en los alimentos, lo cual comprende parte del almidón resistente de tipo 1 (almidón físicamente inaccesible), más las fracciones de almidón resistente de tipo 2 (gránulos intrínsecamente resistentes) y de tipo 3 (almidón retrogradado)*. El aislamiento del almidón del banano involucra el troceo, el congelamiento y la molienda del material vegetal, lo cual promueve la ruptura de las paredes celulares y la eliminación de la matriz extracelular. Por tal motivo la fracción de almidón resistente de tipo 1 no es cuantificable. Adicionalmente, se ensayó con las muestras crudas y en estado nativo, por lo cual tampoco se esperaba hallar en ellas cantidades significativas de almidón resistente de tipo 3.

Se estimaron en los almidones de los bananos, porcentajes *muy altos* de almidón resistente (superiores a 15%) según la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996), valores que resultaron bastante superiores al estimado en el almidón de referencia (**Tabla 5**). Las muestras HH22 (AA) y 118 (AAAA) presentaron los mayores contenidos de

* El método propuesto por Goñi y col. (1996) no es capaz de estimar la fracción de almidón resistente de tipo 4 (almidón con enlaces no amiláceos) (**Tabla 2**). No obstante, las muestras ensayadas carecen de este tipo de almidón resistente debido a que no fueron modificadas.

almidón resistente (58 y 56%, respectivamente), mientras que las fracciones más pequeñas se encontraron en las muestras HH8 (AB) y 089 (ABB) (41%). Se corrobora con estos resultados, el alto tenor de almidón no susceptible al ataque amilolítico presente en los frutos de las musáceas, esencialmente de almidón resistente de tipo 2. Muchos autores atribuyen la resistencia intrínseca del almidón del banano a las estructuras cristalinas tipo B y C frecuentemente reportadas (Marín, 2009; Carlos-Amaya y col., 2011), las cuales se han asociado con una baja digestibilidad (Oates y col., 1997). Vatanasuchart y col. (2012) sugirieron que la proporción de amilosa es un factor determinante en la biodisponibilidad de las harinas y de los almidones del banano, debido a la fuerte relación lineal que estos autores hallaron recientemente entre ambas variables ($r = 0,872$). No obstante, tal correlación ($r = -0,103$, $p = 0,516$; $n = 42$) no fue encontrada en el presente trabajo*.

Galeno (2006) estimó un 36% de almidón resistente en el almidón aislado de una variedad no especificada de plátano, mientras que Marín (2009) y Martín (2010) reportaron valores entre 47–63% para los almidones de diversos clones de bananos. Más recientemente, Vatanasuchart y col. (2012) estimaron porcentajes muy superiores en los almidones aislados de algunos bananos tailandeses (70–76%). Marín (2009) caracterizó la digestibilidad del almidón del plátano hartón común, encontrando un 49% de almidón resistente, un valor similar al estimado para dicha variedad en el presente estudio (ver el pie de la **Tabla 5**). Martín (2010) encontró en los almidones de hartón común y de HH12, porcentajes que son significativamente mayores (63 y 60%, respectivamente) a los determinados en este estudio.

* Los porcentajes de amilosa de los almidones de banano ensayados, fueron cedidos gentilmente por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Doctora Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Todos los autores citados, estimaron el almidón resistente total mediante el método propuesto por Goñi y col. (1996), por lo cual la gran variabilidad en los valores reportados, tanto en este trabajo como en las investigaciones previas, podría atribuirse a las diferencias genéticas entre los cultivares. En este sentido, los genomios híbridos AB y ABB presentaron porcentajes de este parámetro (41 y 46%), notablemente inferiores a los exhibidos por el resto de los grupos genómicos (51–53%; **Tabla 5**).

1.3. Tasa de α -amilólisis

La cinética de hidrólisis del almidón por acción de la α -amilasa es un proceso que depende de un conjunto de factores (**Tabla 1**), a saber: el estado físico del almidón, la morfología del gránulo, la relación amilosa:amilopectina, el tipo y grado de cristalinidad, la asociación del almidón con las proteínas y lípidos y las modificaciones estructurales promovidas por los tratamientos químicos, físicos y enzimáticos aplicados en la industria de los alimentos (Colonna y col., 1992). En la caracterización nutricional de los alimentos amiláceos es particularmente importante evaluar este parámetro, porque las respuestas glucémica e insulinémica derivadas de la ingesta, son un reflejo de la velocidad de digestión del almidón (Björck, 1994).

Las curvas de α -amilólisis *in vitro* estimadas para los almidones crudos y gelatinizados de los bananos se muestran en la **Figura 5**. Los porcentajes de hidrólisis fueron expresados sobre la base de almidón disponible a fin de garantizar que las posibles diferencias encontradas en las tasas de digestión, obedezcan a las propiedades intrínsecas de los almidones ensayados y no a las diferencias en las concentraciones de α -glucanos potencialmente digeribles. Para la evaluación de la cinética de hidrólisis se consideraron dos parámetros (**Tabla 6**): la velocidad de hidrólisis inicial, que constituye la proporción de

almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos de reacción, y la magnitud de hidrólisis final, que representa la proporción total de almidón digerido al cabo de los 60 minutos de duración del ensayo.

Puede notarse que los almidones crudos de los bananos presentaron velocidades iniciales (0–1,5%) y magnitudes finales de hidrólisis (0,2–2,8%) inferiores a las registradas en la referencia cruda (1,2 y 6,5%, respectivamente), lo cual es consistente con los muy altos contenidos de almidón resistente estimados en dichos almidones (**Tabla 5**). Marín (2009) y Martín (2010) determinaron para los almidones aislados de los bananos, magnitudes finales de hidrólisis inferiores al 6,5% y 4%, respectivamente. Martín (2009) analizó el almidón de maíz crudo (referencia) y encontró una magnitud final de hidrólisis de 9,6%, un valor superior al estimado en el presente estudio. Cabe destacar que se encontró un alta variabilidad en las velocidades iniciales y en las magnitudes finales de hidrólisis dentro de cada grupo genómico (**Tabla 6**), por lo que la influencia de la composición genética en las tasas de digestión de los almidones crudos del banano, resultó poco clara.

La gelatinización incrementó dramáticamente la susceptibilidad de los almidones a la digestión, pudiéndose observar en los almidones de los bananos, magnitudes finales de hidrólisis cuantiosamente mayores (43–92%) a las estimadas en la contraparte cruda; algunas incluso comparables con la hallada en el almidón de referencia gelatinizado (84%). Estos resultados evidenciaron que el proceso de gelatinización eliminó la mayor parte del almidón resistente de tipo 2, lo cual se explica por los procesos de hinchamiento y de pérdida del orden interno del gránulo, causados por el efecto hidrotérmico (Colonna y col., 1992). No obstante, el efecto de la cocción sobre las tasas de hidrólisis fue muy heterogéneo (**Tabla 6**), resultando particularmente interesantes las cinéticas de digestión de

los almidones de bananos híbridos, clones HH8 (AB), 055 (AAB), 087 y 089 (ABB), que exhibieron velocidades iniciales (17–38%) y magnitudes finales de hidrólisis (43–63%) significativamente más bajas que las estimadas en el almidón de referencia gelatinizado (62 y 84%, respectivamente). Asimismo, el almidón HH1 (AAA) gelatinizado puede considerarse una excepción dentro del grupo *M. acuminata*, con una velocidad inicial y una magnitud final de hidrólisis (45 y 73%, respectivamente) que resultaron bastante inferiores a las registradas en la referencia. Tales tasas de digestión perfilan a dichos almidones como potenciales ingredientes en la fabricación de productos comestibles de bajo índice glucémico y podrían ser atribuidas a la permanencia, aun después del proceso de cocción, de moderados y altos porcentajes de almidón lentamente digerible y de almidón resistente (Zhang y Hamaker, 2012). Además, ha podido demostrarse que la presencia de materiales no amiláceos, particularmente de los no solubles, incrementa la temperatura crítica de gelatinización de los almidones del maíz y del trigo (Tester y Sommerville, 2003); por lo cual no se descarta que la relativamente alta proporción de impurezas presentes en los almidones de los bananos (**Tabla 5**) haya limitado la extensión de la gelatinización en estos casos particulares.

Empleando el método propuesto por Holm y col. (1985), Marín (2009) y Martín (2010) determinaron para los almidones gelatinizados del banano y del maíz, magnitudes finales que son inferiores a las estimadas en el presente trabajo. Marín (2009) encontró una gran variabilidad en las susceptibilidades de los almidones gelatinizados de los bananos a la hidrólisis enzimática, lo cual atribuyó a las diferencias encontradas en las estructuras cristalinas y en las composiciones químicas entre los cultivares de banano caracterizados en el mismo estudio. Martín (2010), por su parte, estimó para los almidones gelatinizados del banano, cinéticas de hidrólisis semejantes a la del almidón de referencia.

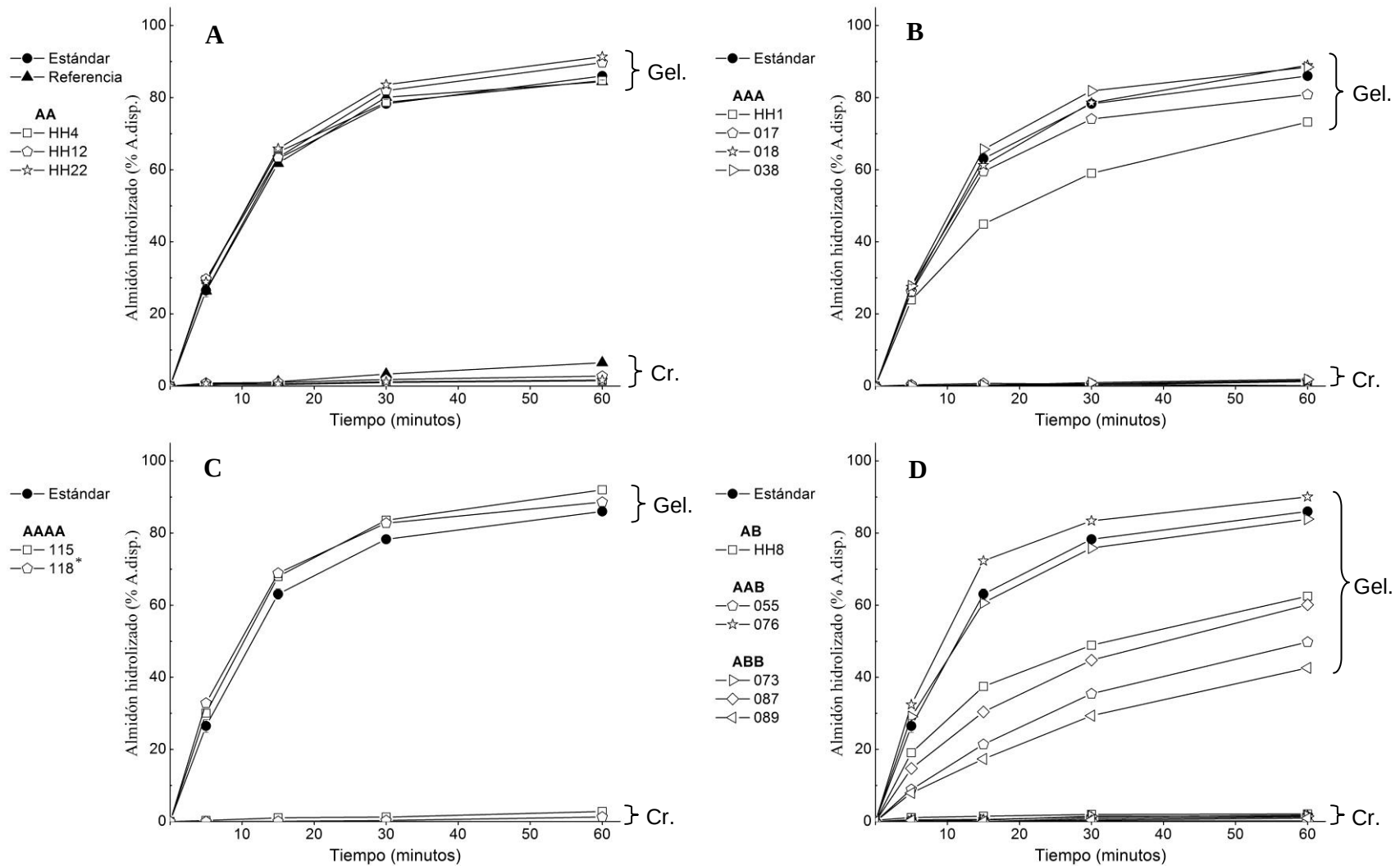


Figura 5. Cinética de hidrólisis *in vitro* de los almidones de banana.

Cada punto representa el porcentaje de almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible y constituye el promedio de dos determinaciones próximas. Cr: almidón crudo, Gel: almidón gelatinizado. Los códigos entre dos y cuatro letras (AA, AB...) representan el genomio del clon. La referencia es el almidón de maíz incluido en el bioensayo ($n = 2$). Como control de calidad para los ensayos de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado ($n = 14$; Estándar). * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

Tabla 6. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis *in vitro* de los almidones de banana.

Genomio	Almidón	Crudo		Gelatinizado	
		Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)
—	Referencia	1,20	6,50	61,8	84,4
AA	HH4	0,41	1,50	64,9	84,7
	HH12	0,99	2,76	63,4	89,7
	HH22	0,59	1,65	65,9	91,4
	Media (n = 6)	0,67 ± 0,39	1,97 ± 0,82	64,7 ± 1,2	88,6 ± 3,1
AAA	HH1	0,34	0,15	44,9	73,2
	017	0,74	1,54	59,5	80,9
	018	0,06	1,26	61,3	89,0
	038	0,24	1,86	65,8	88,5
	Media (n = 8)	0,59 ± 0,39	1,51 ± 1,02	57,9 ± 8,3	82,9 ± 6,9
AAAA	115	1,05	2,77	68,0	92,0
	118*	0,06	1,26	68,9	88,6
	Media (n = 4)	0,56 ± 0,60	2,01 ± 0,94	68,4 ± 0,8	90,3 ± 2,0
AB	HH8	1,46	2,08	37,5	62,5
	Media (n = 2)	1,46	2,08	37,5	62,5
AAB	055	0,00	1,34	21,4	49,8
	076	0,45	1,53	72,3	90,1
	Media (n = 4)	0,28 ± 0,45	1,54 ± 0,47	37,5 ± 0,9	69,9 ± 23,3
ABB	073	0,57	1,74	60,7	83,9
	087	0,06	0,19	30,4	60,1
	089	0,00	0,95	17,3	42,6
	Media (n = 6)	0,17 ± 0,35	0,89 ± 0,61	46,8 ± 29,4	62,2 ± 18,5

Los porcentajes son el promedio de almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible ($n = 2$). La velocidad inicial es la proporción de almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos, mientras que la magnitud final es la proporción total de almidón hidrolizado al cabo de los 60 minutos. La referencia es el almidón de maíz incluido en el bioensayo ($n = 2$). Como control de calidad para los ensayos de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado ($n = 14$; Estándar); los valores obtenidos fueron $63,1 \pm 1,42\%$ y $86,1 \pm 1,04\%$ para la velocidad inicial y la magnitud final, respectivamente.* Sinónimo: CIEN-BTA-03.

2. Digestibilidad *in vivo* de los almidones de banano

El gorgojo de arroz (*S. oryzae*) fue empleado como modelo animal en los estudios *in vivo*. Se evaluó la supervivencia, la variación del peso, la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico de los insectos, como posibles biomarcadores de la digestibilidad de las dietas suministradas.

2.1. Supervivencia del gorgojo de arroz

La supervivencia del gorgojo de arroz ha demostrado ser un indicador de la toxicidad de las dietas. El seguimiento de este parámetro se realiza en pequeñas poblaciones de insectos sometidas a tratamientos de duración variable (Szwarcbort, 1980; Carmona y col., 1998; Gamero y col., 2010). En tales ensayos ha sido habitual incluir un “control de calidad” definido por las condiciones de ayuno, cese total de la ingesta de alimentos, y de alimentado, en la cual se suministra a los insectos arvejas verdes partidas, dieta que es usada en el mantenimiento de los cultivos y que satisface los requerimientos nutricionales del animal (García, 2003; Galeno, 2006; Lovera, 2008; Martín, 2010). Se infiere que si la supervivencia en alguna de las dietas resulta menor a la del grupo mantenido en ayunas, la dieta en cuestión contiene factores tóxicos o antinutrientes (López, 1999). Con la introducción de gorgojo de arroz como modelo animal en el estudio de la biodisponibilidad de los alimentos farináceos, se incluyó como referencia un almidón de alta biodisponibilidad (almidón de maíz), con la finalidad de comparar el efecto sobre los biomarcadores de las dietas suministradas (Galeno, 2006; Martín, 2010).

La supervivencia de los insectos sometidos a la condición de alimentado se mantuvo en 100% ($n = 3$) hasta el octavo día del bioensayo, mientras que en aquellos en

ayunas, se observó un decremento progresivo entre los días 4 y 8, hasta ubicarse en $62,8 \pm 5,9\%$ ($n = 3$; **Figura 6**). En el ayuno prolongado, la muerte sobreviene cuando se utilizan como nutrientes, las proteínas que desarrollan funciones vitales para el organismo, como lo es el sistema enzimático de la cadena respiratoria (Klieber, 1975; citado por López, 1999; Gil, 2010). Estos resultados son similares a los reportados en los estudios previos (García, 2003; Galeno, 2006; Lovera, 2008; Martín, 2010), con supervivencias en la condición de alimentado cercanas al 100% y entre 70–80% para la condición de ayuno. La supervivencia al día 8 de los insectos alimentados con el almidón de referencia (almidón de maíz) fue de $99,6 \pm 0,6\%$ ($n = 3$) y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a la condición de alimentado. Carmona y col. (1998) lograron establecer que el almidón de maíz constituye una dieta basal mínima que aporta una cantidad de nutrientes limitada aunque suficiente para satisfacer las demandas nutricionales del gorgojo de arroz y promover una ganancia de peso similar a la que se observa cuando el insecto es alimentado con arvejas verdes.

A pesar de la baja biodisponibilidad de las dietas de almidón de banano (**Tabla 5**), se obtuvieron altas supervivencias (96–100%; **Figura 7**) que no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) de las registradas en la condición de alimentado o en el almidón de referencia.

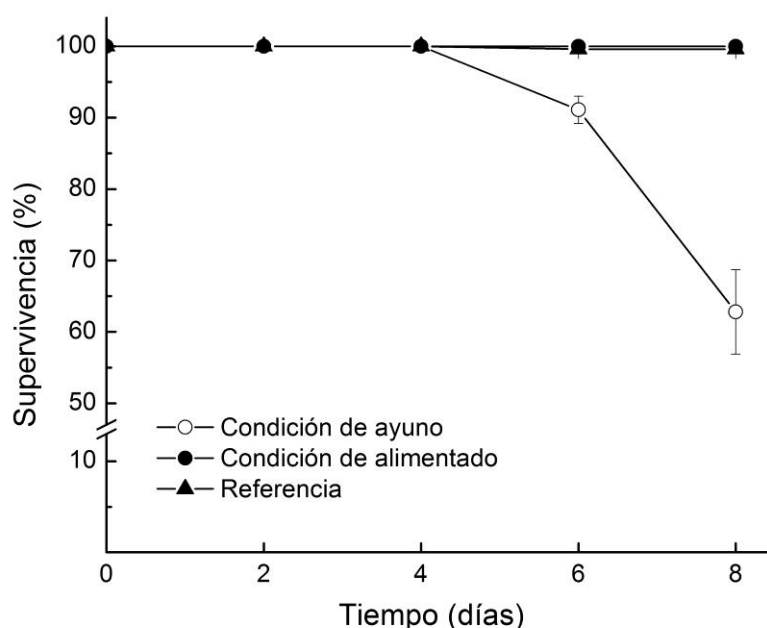


Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo y en el almidón de referencia.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). La condición de alimentado es la dieta de arvejas verdes. La referencia es el almidón de maíz.

Galeno (2006) reportó supervivencias de 80–85% para las dietas poco biodisponibles de almidón de papa y de plátano, que fueron ligeramente superiores a la estimada en dicho estudio para la condición de ayuno (80%) y que atribuyó a los altos contenidos de almidón resistente determinados *in vitro*. No obstante, ni García (2003), ni Marín (2010) obtuvieron en los almidones de la papa y del banano, respectivamente, supervivencias estadísticamente diferentes de las registradas en el control alimentado o en el almidón de referencia; tal como se comprobó en el presente estudio. En este sentido, se confirman las observaciones de Martín (2010) en cuanto al pobre desempeño de la supervivencia como biomarcador de la digestibilidad de los almidones aislados del banano.

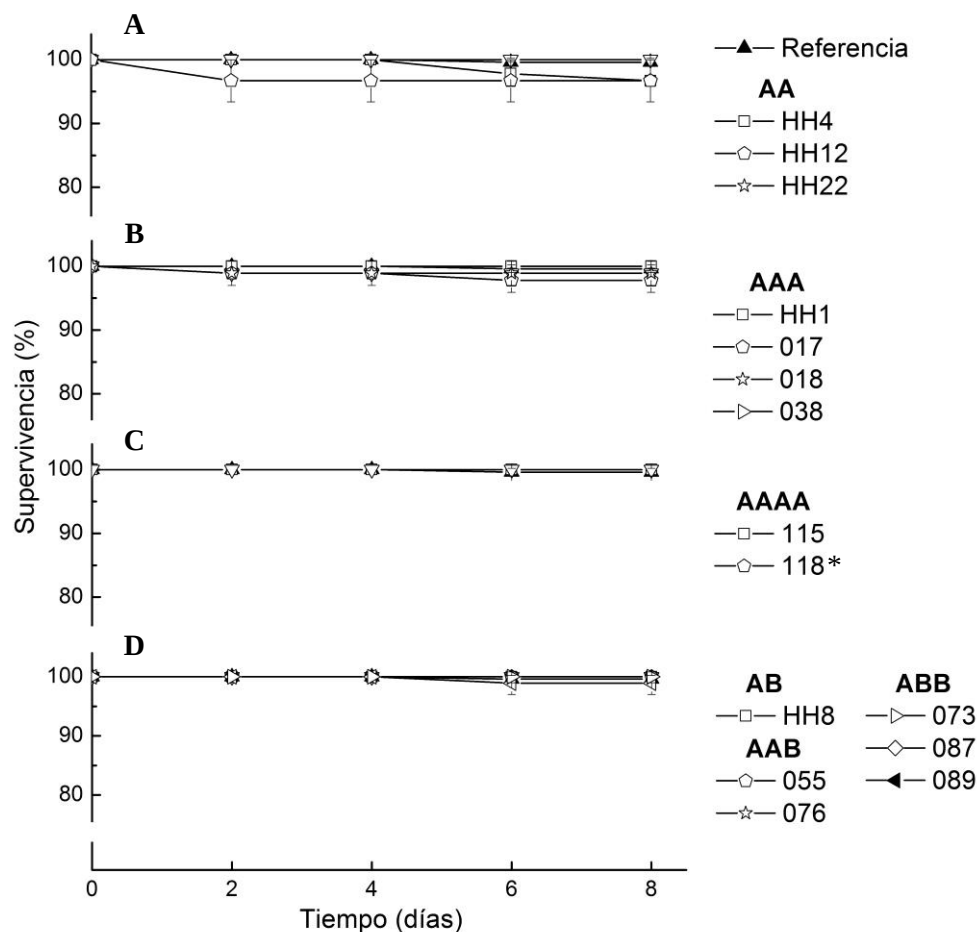


Figura 7. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banana.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). Los códigos entre dos y cuatro letras (AA, AB...) indican el genotipo del clon. La referencia es el almidón de maíz. * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

2.2. Variación de peso del gorgojo de arroz

La variación de peso del insecto ha sido un biomarcador útil en la evaluación del contenido energético y del valor nutritivo de la dieta. Los gorgojos de arroz seleccionados para el bioensayo proceden de cultivos de mantenimiento con arvejas verdes, una dieta que como bien se ha mencionado, satisface los requerimientos nutricionales del animal. El vaciamiento del buche ocurre al cabo de tres días (Carmona y Casotto, 2001), por lo cual, a

fin garantizar que el biomarcador no se vea influenciado por la dieta de mantenimiento, rica en nutrientes, y que constituya realmente una respuesta biológica a las dietas ensayadas, se consideraron para el análisis estadístico los valores de variación de peso correspondientes al día 8 del bioensayo (**Tabla 7**).

La condición de alimentado promovió el incremento progresivo del peso corporal, hasta ubicarse en $7,9 \pm 0,5\%$ ($n = 3$) al finalizar el bioensayo (**Figura 8**). Incrementos del 4 y del 10% del peso de los insectos alimentados con las arvejas verdes fueron reportados por Lovera (2008) y Galeno (2006), respectivamente, mientras que Martín (2010) estimó un incremento del 1%. Los insectos sometidos a la condición de ayuno presentaron una disminución de peso del $23,1 \pm 0,7\%$ ($n = 3$) al octavo día del bioensayo, valor consistente con el decremento del 20–30% que se ha reportado en los trabajos previos (García, 2003; Galeno, 2006; Lovera, 2008; Martín, 2010) y que resultó estadísticamente diferente ($p < 0,05$) del estimado para el control alimentado. Durante el ayuno, esta reducción del peso del animal se explica por la utilización de las reservas corporales, con la subsecuente pérdida de agua, de grasa y de proteína (López, 1999). El almidón de referencia, por su parte, promovió un $5,1 \pm 0,8\%$ ($n = 3$) de incremento que fue, sin embargo, significativamente menor ($p < 0,05$) al reportado en la condición de alimentado.

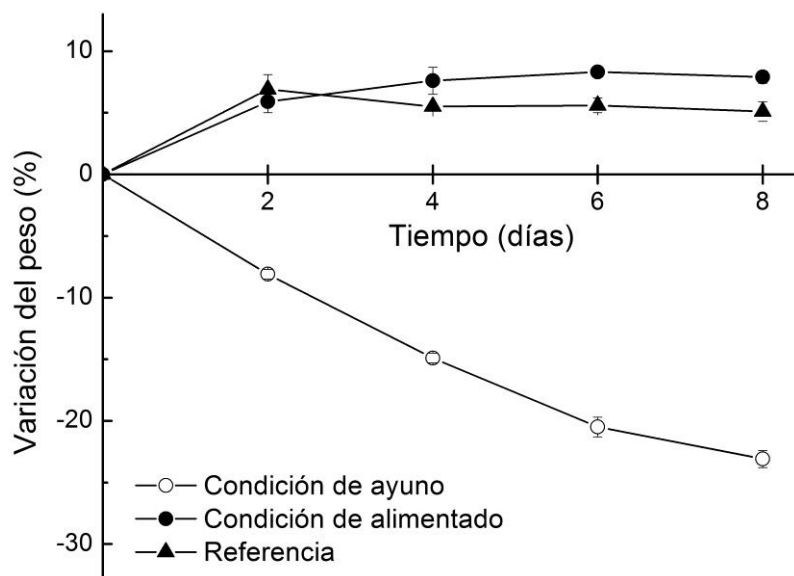


Figura 8. Variación del peso del gorgojo de arroz en el control de calidad del bioensayo.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). La condición de alimentado es la dieta de arvejas verdes. La referencia es el almidón de maíz.

Todas las dietas de almidón de banana promovieron, en mayor o menor medida, incrementos en el peso corporal del insecto, registrándose al día 8 porcentajes entre 0,2–8,1% ($n = 3$; **Figura 9**). Se infiere que pese al alto contenido de almidón resistente encontrado en los almidones de los bananos (**Tabla 5**), el suministro de nutrientes y de energía fue suficiente para el mantenimiento metabólico del gorgojo de arroz. Este incremento generalizado de los pesos corporales puede atribuirse no sólo a un aporte nutritivo que probablemente excedió el requerimiento del animal, sino al crecimiento propio de los adultos jóvenes. Los menores incrementos de peso al día 8 (0,2–3,5%) se estimaron en las dietas 087, 073 y 089 (ABB), mientras que los almidones HH12 (AA), HH8 (AB), HH22 (AA), 038 y 018 (AAA) promovieron ganancias (6,7–8,1%) que no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) de la registrada en la condición de

alimentado del control de calidad (**Figura 9** y **Tabla 7**). Los incrementos de peso promovidos por el resto de las dietas de almidón de banano (4,1–6,5%) no fueron estadísticamente diferentes del registrado en el almidón de referencia ($p > 0,05$).

García (2003) reportó para los almidones poco digeribles de la papa y de *Canavalia ensiformis* (haba de burro), pérdidas de peso corporal del 5 y 10%, respectivamente. Galeno (2006) obtuvo sensibles variaciones en los insectos alimentados con las dietas de almidón de papa y de plátano, que alcanzaron entre 15–20% de disminución. Sin embargo, Martín (2010) registró variaciones en el peso de los insectos alimentados con los almidones de banano, que no fueron estadísticamente diferentes de las estimadas en la dietas del control alimentado y de referencia.

Aunque las variaciones de peso evidenciadas sugirieron la existencia de diferencias en la capacidad de aprovechamiento de los almidones (**Tabla 7**), no hubo correlación entre esta respuesta biológica y los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. Resulta notable, por ejemplo, que el almidón 087 promovió una ganancia del 3,5% del peso corporal entre el día 0 y el día 2, para luego experimentarse una pérdida progresiva y prácticamente alcanzarse el peso inicial al día 8 del bioensayo (0,2%; **Figura 9D**). Esto, a pesar de que dicho almidón fue evaluado *in vitro* como una de las dietas de mayor digestibilidad según el parámetro almidón resistente total (**Tabla 5**). La palatabilidad de la dieta, es decir, el conjunto de características organolépticas que hacen al alimento agradable, es una propiedad independiente del contenido energético y nutritivo, y podría explicar las fluctuaciones evidenciadas en el peso de estas poblaciones de insectos al inducir una mayor o menor ingesta del almidón. Es posible que el biomarcador variación del peso sea útil en las situaciones relativamente extremas de biodisponibilidad o a la hora de caracterizar nutricionalmente los alimentos con factores tóxicos o antinutrientes.

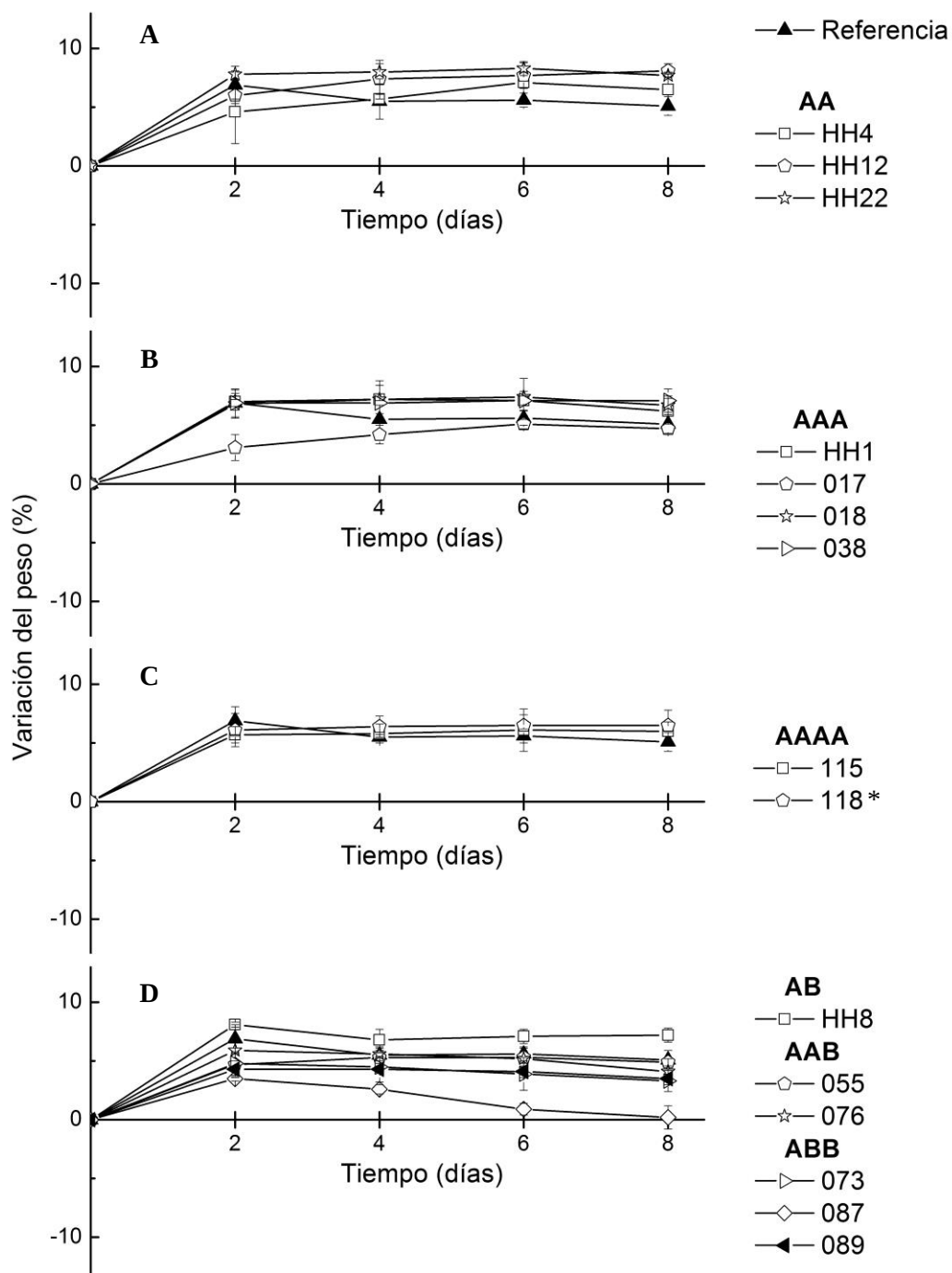


Figura 9. Variación del peso del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.

Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$). Los códigos entre dos y cuatro letras (AA, AB...) indican el genotipo del clon. La referencia es el almidón de maíz. * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

Tabla 7. Pesos promedio de los insectos y variación del peso al día 8 del bioensayo.

Genomio	Dieta	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Variación del peso al día 8 (%)
—	Alimentado	$1,69 \pm 0,03^{b,c,d}$	$1,83 \pm 0,03^{b,c}$	$7,9 \pm 0,5^{a,b}$
—	Referencia	$1,69 \pm 0,03^{b,c,d}$	$1,78 \pm 0,04^{c,d}$	$5,1 \pm 0,8^{e,f,g}$
AA	HH4	$1,72 \pm 0,04^{a,b,c}$	$1,83 \pm 0,05^{a,b,c}$	$6,5 \pm 1,5^{c,d,e}$
	HH12	$1,75 \pm 0,01^a$	$1,89 \pm 0,01^a$	$8,1 \pm 0,6^a$
	HH22	$1,70 \pm 0,04^{a,b,c}$	$1,83 \pm 0,04^{a,b,c}$	$7,7 \pm 0,1^{a,b,c}$
	Media (n = 9)	—	—	$7,5 \pm 1,1$
AAA	HH1	$1,70 \pm 0,01^{b,c,d}$	$1,80 \pm 0,01^{c,d}$	$6,2 \pm 1,1^{d,e,f}$
	017	$1,69 \pm 0,04^{b,c,d}$	$1,77 \pm 0,04^{c,d}$	$4,7 \pm 0,5^{f,g}$
	018	$1,70 \pm 0,02^{a,b,c}$	$1,81 \pm 0,01^{b,c,d}$	$6,7 \pm 0,8^{b,c,d}$
	038	$1,74 \pm 0,02^{a,b}$	$1,87 \pm 0,04^{a,b}$	$7,1 \pm 1,0^{a,b,c,d}$
	Media (n = 12)	—	—	$6,2 \pm 1,2$
AAAA	115	$1,69 \pm 0,03^{c,d}$	$1,79 \pm 0,02^{c,d}$	$6,0 \pm 0,8^{d,e,f}$
	118*	$1,65 \pm 0,04^d$	$1,75 \pm 0,06^{d,e}$	$6,5 \pm 1,3^{c,d,e}$
	Media (n = 6)	—	—	$6,2 \pm 1,0$
AB	HH8	$1,70 \pm 0,02^{a,b,c}$	$1,83 \pm 0,02^{b,c}$	$7,2 \pm 0,6^{a,b,c,d}$
	Media (n = 3)	—	—	$7,2 \pm 0,6$
AAB	055	$1,69 \pm 0,03^{c,d}$	$1,77 \pm 0,02^{c,d}$	$4,9 \pm 1,0^{f,g}$
	076	$1,71 \pm 0,05^{a,b,c}$	$1,78 \pm 0,07^{c,d}$	$4,1 \pm 1,1^g$
	Media (n = 6)	—	—	$4,5 \pm 1,1$
ABB	073	$1,70 \pm 0,01^{b,c}$	$1,75 \pm 0,01^{d,e}$	$3,3 \pm 0,9^{g,h}$
	087	$1,70 \pm 0,04^{a,b,c}$	$1,71 \pm 0,04^e$	$0,2 \pm 1,0^h$
	089	$1,72 \pm 0,02^{a,b,c}$	$1,78 \pm 0,04^{c,d}$	$3,5 \pm 1,1^{g,h}$
	Media (n = 9)	—	—	$2,4 \pm 1,8$

Los valores son el promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Valores con letras iguales en una misma columna no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). La condición de alimentado es la dieta de arvejas verdes. La referencia es el almidón de maíz. La media de los pesos promedios al día 0 en las dietas de almidón de banano y de referencia fue de $1,71 \pm 0,004$ mg ($n = 16$). * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

2.3. Actividad similar a α -amilasa

El almidón constituye el principal nutriente en la dieta de los coleópteros (Hemlata y col. 2012), por lo cual las α -amilasas desempeñan un papel fundamental en la vida de estos insectos. En las investigaciones previas (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010), el biomarcador actividad similar α -amilasa del gorgojo de arroz ha logrado correlacionarse con los parámetros de digestibilidad *in vitro* de los almidones.

A excepción de los almidones 076 (AAB) y 089 (ABB) el resto de las dietas promovió actividades α -amilolíticas significativamente mayores ($p < 0,05$) a la registrada en el almidón de referencia (**Tabla 8**). Resultados similares han sido reportados por García, (2003); Galeno (2006) y Martín, (2010), quienes evidenciaron que las dietas amiláceas poco digeribles como los almidones de la papa y del banano, tienden a promover en el gorgojo de arroz actividades α -amilolíticas superiores a la registrada en el almidón biodisponible del maíz. Galeno (2006) reportó para el almidón del plátano, una actividad enzimática 6 veces superior a la estimada para el almidón de referencia; sin embargo esta autora corrigió el valor del biomarcador por la ingesta del insecto. Martín (2010) reportó para almidones aislados del banano, actividades enzimáticas entre 1,10 y 2,74 veces superiores a la registrada en el almidón de referencia; siendo la actividad enzimática estimada para la dieta HH12, 2,58 veces superior. Este valor es menor al estimado en el presente estudio para la misma muestra de almidón.

Tabla 8. Actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.

Genomio	Dieta	Actividad similar a α -amilasa ($\mu\text{mol/s}\times\text{L}$)	Cociente de actividad similar a α -amilasa
—	Referencia	130 ± 27^h	1,00
AA	HH4	$312 \pm 21^{d,e}$	2,41
	HH12	$519 \pm 25^{a,b}$	4,01
	HH22	479 ± 42^b	3,69
	Media ($n = 9$)	437 ± 99	3,37
AAA	HH1	$280 \pm 36^{d,e}$	2,16
	017	551 ± 58^a	4,25
	018	318 ± 13^d	2,45
	038	$263 \pm 47^{d,e}$	2,03
	Media ($n = 15$)	353 ± 126	2,73
AAAA	115	406 ± 70^c	3,14
	118*	$309 \pm 16^{d,e}$	2,38
	Media ($n = 6$)	358 ± 70	2,76
AB	HH-08	$255 \pm 2^{e,f}$	1,97
	Media ($n = 3$)	255 ± 2	1,97
AAB	055	183 ± 33^g	1,41
	076	$163 \pm 29^{g,h}$	1,26
	Media ($n = 6$)	173 ± 30	1,33
ABB	073	$196 \pm 19^{f,g}$	1,51
	087	$292 \pm 59^{d,e}$	2,25
	089	$160 \pm 23^{g,h}$	1,24
	Media ($n = 9$)	216 ± 67	1,67

La actividad similar a α -amilasa está expresada en μmol de maltosa liberados por segundo en un litro del extracto acuoso del insecto. Los valores son el promedio $\pm$ la desviación estándar ($n = 3$). Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). La referencia es el almidón de maíz ($n = 6$). El cociente constituye la actividad enzimática correspondiente a la dieta entre la actividad enzimática correspondiente al almidón de referencia. Las actividades enzimáticas en la condición de ayuno y en la condición de alimentado fueron de 406 ± 77 ($n = 4$) y 1.161 ± 96 ($n = 9$) $\mu\text{mol/s}\times\text{L}$, respectivamente. * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

Un comportamiento similar ha sido reportado en otros coleópteros. Las investigaciones efectuadas por Wool y col. (1986) en el gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*; Coleóptera: Tenebrionidae) y en gorgojo falso de la harina (*Tribolium confusum*; Coleóptera: Tenebrionidae), demostraron que la composición de la dieta es determinante en la actividad α -amilasa del animal. En estos estudios, la maltosa y el almidón de maíz promovieron menores actividades enzimáticas a las registradas en las harinas o en las dietas altamente proteicas como la caseína. Esta relación inversa entre la digestibilidad de la dieta y la actividad α -amilolítica del insecto podría deberse a la existencia de mecanismos de regulación transcripcional. En *Drosophyla melanogaster* (Díptera: Drosophilidae), por ejemplo, se ha demostrado que las dietas ricas en glucosa reducen la actividad de las α -amilasas al reprimir la transcripción de los genes codificantes de estas enzimas (Hickey y Beckel, 1982; Magoulas y col., 1993). Más recientemente, se ha comprobado que en *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae), la expresión del gen de la α -amilasa está regulada por la biodisponibilidad de los azúcares reductores, la sacarosa y del almidón alimentario (Hemlata y col. 2012).

Los almidones 017 (AAA), HH12 y HH22 (AA) fueron evaluados por el biomarcador actividad similar α -amilasa como las dietas menos biodisponibles, mientras que 076 (AAB) y 089 (ABB) presentaron biodisponibilidades similares a la exhibida por el almidón de referencia (**Tabla 8**). En cuanto a los grupos genómicos, AA resultó ser el menos biodisponible, los híbridos (AB, AAB y ABB) presentaron la mayor biodisponibilidad y el resto de los genomios fueron evaluados con biodisponibilidades intermedias.

En el presente estudio, el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón resistente presentó una débil aunque significativa correlación con el biomarcador actividad similar a

α -amilasa ($r = 0,326$; $p = 0,029$; **Figura 10B**), pudiendo explicar sólo el 11% de su variabilidad. Se quiso comprobar, adicionalmente, si el contenido proteico de los almidones ensayados (**Tabla 9**) influyó en la actividad similar a α -amilasa del insecto, al constituir un componente importante de la dieta; sin embargo, no se obtuvo una correlación significativa entre ambas variables (**Figura 10E**).

En las investigaciones de García (2003) y de Galeno (2006) se realizaron análisis de correlación múltiple, encontrándose correlaciones estadísticamente significativas entre el biomarcador actividad similar α -amilasa del gorgojo de arroz y los parámetros almidón resistente total y magnitud final de hidrólisis. Martín (2010) aplicó un análisis de correlación simple entre los biomarcadores y los parámetros de digestibilidad, logrando correlacionar la actividad similar a α -amilasa con el contenido de almidón resistente total.

2.4. Excreción de ácido úrico

En la mayoría de los insectos, incluyendo el gorgojo de arroz, el ácido úrico es el principal producto de excreción del nitrógeno (Baker, 1976). La excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz ha demostrado ser un excelente biomarcador de la calidad proteica de los alimentos (López, 1999; Carmona y col., 2001). Más recientemente, se ha evaluado su desempeño como biomarcador de la digestibilidad de los almidones nativos y modificados (García, 2003; Galeno, 2006; Martín, 2010) y de otros alimentos farináceos (Alexander Laurentin, comunicación personal), mostrando correlacionarse con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*.

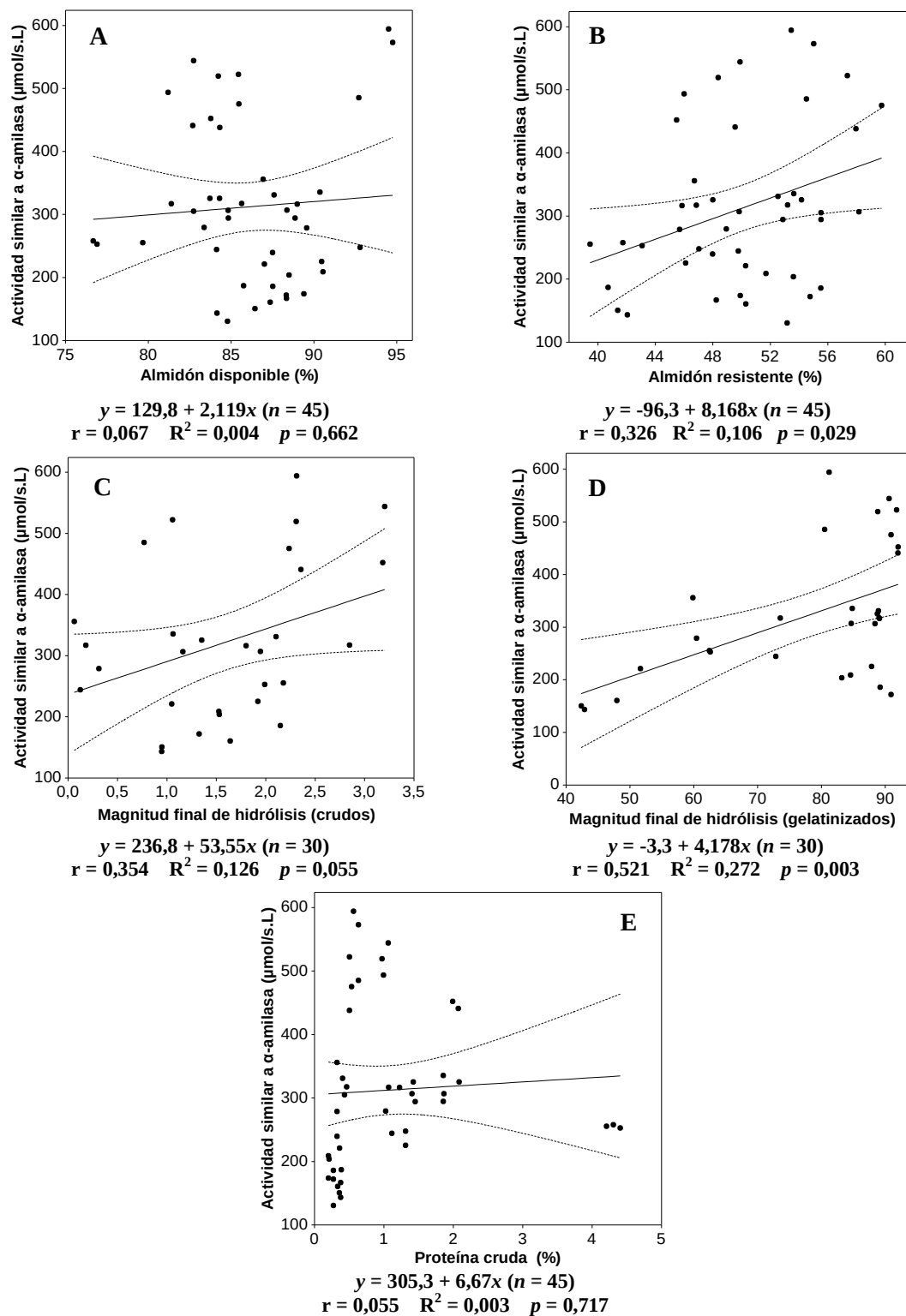


Figura 10. Gráficos de ajuste lineal entre el biomarcador actividad similar a α -amilasa del gorgojo de arroz, los parámetros de digestibilidad *in vitro* y el contenido de proteína cruda del almidón.

Las curvas punteadas indican el intervalo de confianza al 95%. Los datos de proteína cruda de los almidones de banana se muestran en la **Tabla 9**.

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

En vista de que la excreción de ácido úrico también incrementa en las dietas proteicas debido a la eliminación del exceso de aminoácidos que no es utilizado durante la traducción, el contenido de proteína del alimento puede influir en el desempeño del biomarcador como indicador de la digestibilidad (López, 1999). Los estudios llevados a cabo por López (1999) sugirieron que el requerimiento proteico del gorgojo de arroz se ubica entre 0,5–0,7%, concentración que es incluso superada por las dietas aprroteicas como los almidones aislados. Por lo tanto, resultó necesario correlacionar la excreción de ácido úrico del insecto con el contenido proteico de las dietas suministradas (**Tabla 9**), a fin de descartar una posible interferencia.

El contenido proteico de algunas dietas [HH4 (AA), 115 (AAAA) y HH8 (AB)] excedió por mucho el requerimiento del insecto; sin embargo, es notable que el almidón

HH8 (AB) presentó el mayor contenido de proteínas, pero indujo el menor nivel de excreción de ácido úrico (**Tabla 10**). Resulta evidente que este comportamiento excéntrico desvió la línea de regresión, de hecho, se obtuvo una correlación opuesta a la esperada ($r = -0,311$; $p = 0,038$; **Figura 11E**). Si se excluye esta dieta del análisis estadístico, no se obtiene una correlación significativa entre el biomarcador y el contenido de proteína cruda de los almidones ($r = 0,282$; $p = 0,071$).

En la **Tabla 10** se muestran los niveles de excreción de ácido úrico inducidos por las dietas de almidón de banano. Exceptuando HH8 (AB), el resto de las dietas promovió excreciones entre 1,40–3,04 veces superiores que la registrada en el almidón de referencia ($p < 0,05$). Galeno (2006) reportó para el almidón del plátano, una excreción 6 veces superior a la estimada en el almidón de maíz; sin embargo y al igual que con la actividad similar a α -amilasa, esta autora corrigió el valor del biomarcador excreción de ácido úrico por la ingesta del insecto. Martín (2010) reportó, para los almidones de los bananos, excreciones entre 1,25–1,91 veces superiores a la registrada en el almidón de referencia.

Los almidones 017 (AAA) y HH12 (AA) fueron evaluados por la excreción de ácido úrico como las dietas de menor biodisponibilidad, mientras que para HH8 (AB) se estimó una biodisponibilidad comparable a la del almidón de referencia. Entre los genomios, AA mostró ser el menos biodisponible, los grupos híbridos (AB, AAB y ABB) los más biodisponibles y los restantes grupos genómicos fueron evaluados con biodisponibilidades intermedias.

Tabla 9. Contenidos de proteína cruda en los almidones de banano.

Genomio	Dieta	Proteína cruda (%)
—	Referencia	$0,29 \pm 0,03^{k,l}$
AA	HH4	$1,86 \pm 0,01^c$
	HH12	$1,01 \pm 0,05^f$
	HH22	$0,51 \pm 0,02^h$
	Media (n = 9)	$1,12 \pm 0,59$
AAA	HH1	$1,07 \pm 0,05^f$
	017	$0,61 \pm 0,04^g$
	018	$0,43 \pm 0,03^i$
	038	$1,28 \pm 0,05^e$
	Media (n = 12)	$0,85 \pm 0,36$
AAAA	115	$2,05 \pm 0,05^b$
	118*	$1,42 \pm 0,02^d$
	Media (n = 6)	$1,73 \pm 0,34$
AB	HH8	$4,31 \pm 0,10^a$
	Media (n = 3)	$4,31 \pm 0,10$
AAB	055	$0,35 \pm 0,02^{j,k}$
	076	$0,27 \pm 0,00^l$
	Media (n = 6)	$0,31 \pm 0,05$
ABB	073	$0,20 \pm 0,01^m$
	087	$0,32 \pm 0,00^{j,k,l}$
	089	$0,37 \pm 0,01^{i,j}$
	Media (n = 9)	$0,30 \pm 0,08$

Los porcentajes son el promedio $\pm$ la desviación estándar sobre la base seca ($n = 3$). Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). Los valores correspondientes a los almidones de banano fueron suministrados por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Doctora Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. El valor correspondiente al almidón de referencia (almidón de maíz) fue estimado por Martín (2010). * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

Tabla 10. Excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de banano.

Genomio	Dieta	Excreción de ácido úrico (mg/kg)	Cociente de excreción de ácido úrico
—	Referencia	457 ± 71 ^g	1,00
AA	HH4	911 ± 70 ^{b,c,d}	1,99
	HH12	1.041 ± 76 ^b	2,27
	HH22	979 ± 67 ^{b,c}	2,14
	Media (n = 9)	977 ± 83	2,13
AAA	HH1	830 ± 84 ^{c,d,e}	1,82
	017	1.392 ± 76 ^a	3,04
	018	775 ± 82 ^{d,e,f}	1,69
	038	762 ± 125 ^{e,f}	1,66
	Media (n = 12)	940 ± 286	2,05
AAAA	115	952 ± 132 ^{b,c}	2,08
	118	829 ± 41 ^{c,d,e}	1,81
	Media (n = 6)	891 ± 110	1,95
AB	HH8	348 ± 79 ^g	0,76
	Media (n = 3)	348 ± 79	0,76
AAB	055	721 ± 72 ^{e,f}	1,58
	076	706 ± 123 ^{e,f}	1,54
	Media (n = 6)	713 ± 90	1,56
ABB	073	657 ± 83 ^f	1,44
	087	671 ± 69 ^f	1,47
	089	639 ± 57 ^f	1,40
	Media (n = 9)	656 ± 62	1,43

La excreción de ácido úrico está expresada en miligramos de ácido úrico excretado durante los 8 días del bioensayo, por el peso en kilogramos de los insectos sobrevivientes al día 8. Los valores son el promedio ± la desviación estándar ($n = 3$). Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, prueba de Fisher). La referencia es el almidón de maíz ($n = 9$). El cociente constituye la excreción correspondiente a la dieta entre la excreción correspondiente al almidón de referencia. Los niveles de excreción de ácido úrico en la condición de ayuno y en la condición de alimentado fueron de 11.345 ± 4.819 ($n = 4$) y 6.168 ± 1.116 ($n = 9$) mg/kg, respectivamente.

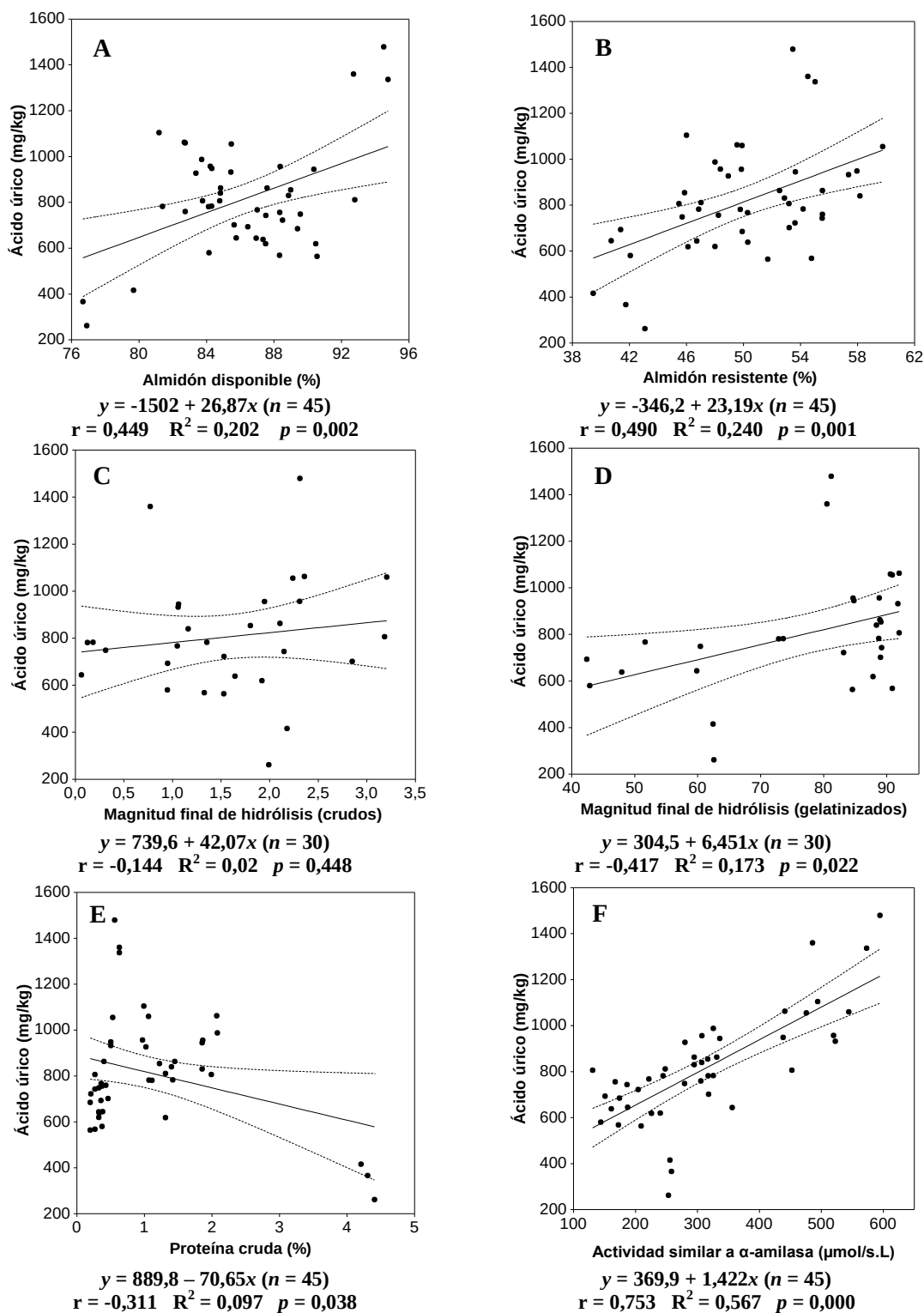


Figura 11. Gráficos de ajuste lineal entre el biomarcador excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz, los parámetros de digestibilidad *in vitro*, el contenido de proteína cruda del almidón y el biomarcador actividad similar a α -amilasa.

Las curvas punteadas indican el intervalo de confianza al 95%.

Tal como pudo comprobarse con el biomarcador actividad similar a α -amilasa, el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón resistente total presentó una débil pero significativa correlación con la excreción de ácido úrico ($r = 0,490$; $p = 0,001$; **Figura 11B**), pudiendo explicar el 24% de su variabilidad. Se encontró, además, una correlación positiva y significativa entre este biomarcador y el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón disponible (**Figura 11A**). No obstante, una correlación de tal naturaleza no parece tener sentido biológico, dado que la ingesta de almidón digestiva y metabólicamente disponible debería reducir el catabolismo proteico y, por ende, la excreción del metabolito. Los puntos excéntricos que pueden apreciarse en el gráfico de ajuste lineal correspondiente (**Figura 11A**), representan las muestras 017 y HH8; si ambos almidones son excluidos del análisis estadístico, es posible obtener una correlación negativa y significativa entre las variables excreción de ácido úrico y almidón disponible ($r = -0,439$; $p = 0,005$). Por último, es importante señalar que la excreción de ácido úrico mostró coincidencias parciales con el biomarcador actividad similar a α -amilasa. De hecho, ambos biomarcadores mostraron una moderada correlación ($r = 0,751$; $p = 0,000$; **Figura 11F**); pudiendo explicar el 57% de la variabilidad.

En los estudios de García (2003) y de Galeno (2006) se realizaron análisis de correlación múltiple, encontrándose correlaciones significativas entre el biomarcador excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz y los parámetros almidón resistente total y magnitud final de hidrólisis. Martín (2010) no obtuvo correlación alguna entre este biomarcador y los parámetros de digestibilidad *in vitro*.

3. Consideraciones finales

En el presente estudio se caracterizó la digestibilidad, tanto *in vivo* como *in vitro* de los almidones aislados de los frutos de 15 plantas del género *Musa*, clones (genomio): HH4, HH12 y HH22 (AA); HH1, 017, 018 y 038 (AAA); 115 y 118 (AAAA); HH8 (AB); 055 y 076 (AAB); 073, 087 y 089 (ABB).

Los análisis *in vitro* involucraron los métodos químicos y enzimáticos para la estimación de los parámetros de la digestibilidad: almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis. Los contenidos de almidón disponible fueron moderadamente altos, como cabría esperar en unas muestras aisladas de almidón, pero inferiores a las reportadas para los almidones aislados de otras fuentes amiláceas (García, 2003; Galeno, 2006); lo cual sugiere una considerable proporción de impurezas, posiblemente de mucílago y de otros materiales no amiláceos difíciles de separar durante el método de aislamiento. Por otra parte, los altos contenidos de almidón resistente y las bajas tasas de hidrólisis estimadas en los almidones crudos, fueron consistentes con la baja biodisponibilidad que ha sido reportada para estos alimentos en múltiples estudios (Englyst y Cumming, 1986; Faisant y col., 1995). La gelatinización tuvo un gran impacto en la susceptibilidad de los almidones de banano a la digestión enzimática, hallándose en algunos casos, cinéticas de hidrólisis similares a la exhibida por una dieta amilácea de alta biodisponibilidad, como lo es el almidón del maíz. Sin embargo, tales cinéticas fueron muy heterogéneas y fue posible identificar también, algunas tasas de hidrólisis relativamente bajas y atribuibles a la permanencia de altos contenidos de almidón lentamente digerible y de almidón resistente, o a una limitada extensión de la gelatinización.

Para los análisis de la digestibilidad *in vivo* se empleó el gorgojo de arroz (*S. oryzae*) como modelo animal. Se evaluó la supervivencia, la variación del peso, la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico de los insectos, como posibles biomarcadores de la digestibilidad de las dietas suministradas. La supervivencia y la variación de peso del gorgojo de arroz son, probablemente, biomarcadores útiles en las situaciones relativamente extremas de biodisponibilidad. El primero no contó con la suficiente sensibilidad para caracterizar la digestibilidad de las dietas de almidón ensayadas y el segundo no constituyó una respuesta biológica que pudiese relacionarse con los parámetros de la digestibilidad *in vitro*. Por otra parte, tanto la actividad similar a α -amilasa como la excreción de ácido úrico, se relacionaron inversamente con la digestibilidad de las dietas de almidón y mostraron débiles pero significativas correlaciones con el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón resistente. Es probable que el ajuste de los valores de la actividad similar a α -amilasa y de la excreción de ácido úrico por los niveles de ingesta del insecto, mejore el desempeño de estos biomarcadores (Martín, 2010). En el presente estudio no se consideró la cuantificación de la ingesta diaria del insecto debido a que tales estimaciones hubiesen duplicado el tiempo y el trabajo requerido para la realización de los análisis *in vivo*.

3.1. Digestibilidad relativa de los almidones de banano

A fin de valorar la digestibilidad relativa de los almidones de banano crudos, se estandarizaron (*Z-score*) los valores de almidón resistente total, parámetro que presentó el mayor carácter predictivo sobre las respuestas observadas *in vivo*, y los valores de los biomarcadores que mostraron el mejor desempeño: la actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz. Para cada variable, los almidones de los

bananos se distribuyeron en quintiles (**Tabla 11**), de acuerdo al *Z-score*. De esta forma resultó relativamente sencillo identificar las coincidencias entre el parámetro de digestibilidad *in vitro* y los biomarcadores.

En base al criterio estadístico, HH22 (AA) y 017 (AAA) presentaron las menores digestibilidades, mientras que HH8 (AB) y 089 (ABB) fueron los almidones más digeribles. Para estos últimos, se registraron unas biodisponibilidades que resultaron similares a la exhibida por el almidón de referencia (almidón de maíz), según los biomarcadores excreción de ácido úrico y actividad similar a α -amilasa, respectivamente. Existen algunos casos puntuales como 073 (ABB), 076 (AAB) y 118 (AAAA) que a pesar de presentar altos contenidos de almidón resistente, fueron valorados *in vivo* como almidones de intermedia, alta o muy alta digestibilidad, lo cual podría deberse a la presencia, en las fracciones disponibles, de altos contenidos de almidón de rápida digestión. La estimación de las fracciones de almidón rápida y lentamente digeribles (Englyst y col., 1992) podría ser útil para explicar estas discrepancias.

Se confirma la utilidad del bioensayo del gorgojo de arroz como primera aproximación en la caracterización de la biodisponibilidad de los almidones aislados del banano. La relativa brevedad de estos ensayos *in vivo* y su bajo costo económico, facilita el análisis de un gran número de muestras en cortos períodos de tiempo, y la identificación de aquellos almidones con características nutricionales de interés que posteriormente puedan ser evaluadas mediante estudios en animales superiores, incluyendo el hombre.

Tabla 11. Digestibilidad relativa de los almidones de banano.

Genomio	Almidón	Variables		
		Almidón resistente total	Actividad similar a α -amilasa	Excreción de ácido úrico
AA	HH4	Intermedia	Alta	Intermedia
	HH12	Alta	Muy baja	Baja
	HH22	Muy baja	Muy baja	Baja
AAA	HH1	Intermedia	Alta	Intermedia
	017	Baja	Muy baja	Muy baja
	018	Baja	Intermedia	Intermedia
	038	Alta	Alta	Alta
AAAA	115	Alta	Baja	Intermedia
	118*	Muy baja	Alta	Intermedia
AB	HH8	Muy alta	Alta	Muy alta
AAB	055	Intermedia	Muy alta	Alta
	076	Baja	Muy alta	Alta
ABB	073	Baja	Muy alta	Alta
	087	Alta	Alta	Alta
	089	Muy alta	Muy alta	Alta

La valoración se realizó en base al parámetro *in vitro* almidón resistente y de los biomarcadores actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico estandarizados (*Z-score*) mediante la fórmula: $Z = (x - \mu) / \sigma$. Se definieron los siguientes quintiles: muy alta digestibilidad ($Z < 20\%$), alta digestibilidad ($20\% \leq Z < 40\%$), digestibilidad intermedia ($40\% \leq Z < 60\%$), baja digestibilidad ($60\% \leq Z < 80\%$) y muy baja digestibilidad ($Z \geq 80\%$). * Sinónimo: CIEN-BTA-03.

3.2. Influencia del genomio en la digestibilidad de los almidones de banano

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugirieron una posible influencia de la composición genética del cultivar en la digestibilidad del almidón aislado (**Figura 12**). Exceptuando el genomio AB, que presentó presumiblemente una alta proporción de materiales no amiláceos (**Tabla 5**), el contenido de almidón disponible varió ligeramente entre los grupos genómicos (**Figura 12A**). En cuanto al almidón resistente total, los genomios AB y ABB exhibieron los menores porcentajes de este parámetro (**Figura 12B**). Las magnitudes finales de hidrólisis de los almidones de banano crudos (**Figura 12C**) y gelatinizados (**Figura 12D**), por su parte, fueron altamente variables, por lo cual su relación con la composición genética resultó poco clara.

Las respuestas biológicas ofrecieron una mayor sensibilidad. Los mayores valores de los biomarcadores actividad similar a α -amilasa (**Figura 12E**) y excreción de ácido úrico del gorgojo de arroz (**Figura 12F**) se estimaron en los grupos genómicos AA, AAA y AAAA, mientras que las menores respuestas fueron registradas en los grupos genómicos AB, AAB y ABB. Así, los almidones crudos de los bananos *M. acuminata* presentaron una menor digestibilidad que los almidones de los bananos híbridos. Se requiere la caracterización nutricional de un mayor número de clones a fin de confirmar estas observaciones.

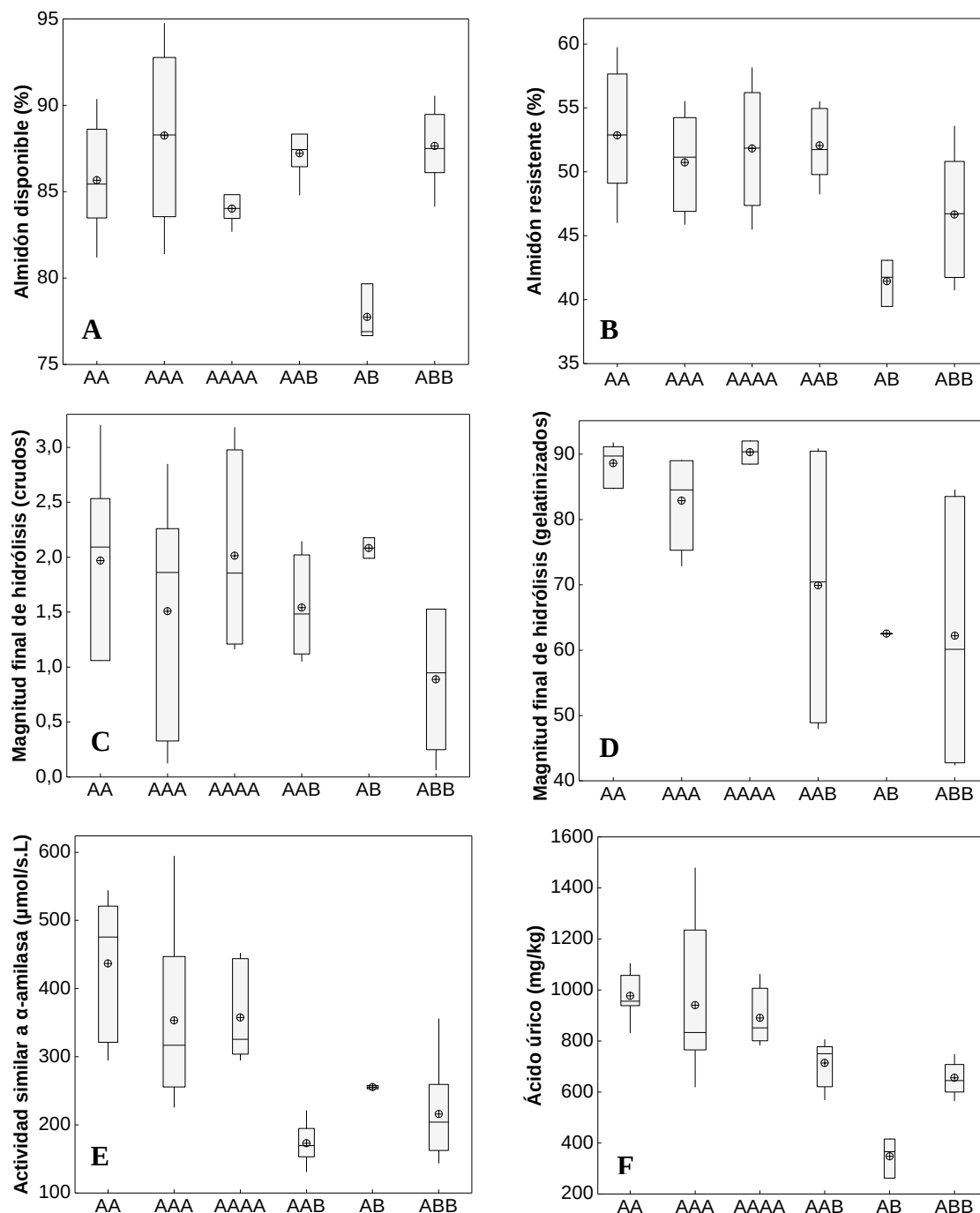


Figura 12. Influencia del genotipo en los parámetros *in vitro* y en los biomarcadores de la digestibilidad de los almidones de banana.

Los gráficos son diagramas de caja y bigotes. El círculo en el interior de cada caja muestra la posición de la media y la línea horizontal, la posición de la mediana. Los códigos entre dos y cuatro letras indican el genotipo: AA, $n = 9$; AAA, $n = 12$; AAAA, $n = 6$; AB, $n = 3$, AAB, $n = 6$ y ABB, $n = 9$, para almidón disponible, almidón resistente, actividad similar a α -amilasa y excreción de ácido úrico. AA, $n = 6$; AAA, $n = 8$; AAAA, $n = 4$; AB, $n = 2$; AAB, $n = 4$; ABB, $n = 6$, para las magnitudes finales de hidrólisis de los almidones crudos y gelatinizados.

En la literatura, no se reportan investigaciones orientadas hacia el estudio de las posibles relaciones existentes entre las características genéticas del banano y las propiedades nutricionales del almidón. Sin embargo, ya se ha evidenciado en algunas investigaciones previas (Marín, 2009; Dufour y col., 2010), que las propiedades químicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón aislado de esta fuente amilácea varían con los grupos de consumo: postre o cocción. Los bananos que son previamente sometidos a cocción para luego ser ingeridos, corresponden por lo general a los cultivares de plantas híbridas (*M. paradisiaca*), mientras que la mayor parte de los bananos de postre constituyen cultivares de *M. acuminata* (Ploetz y col., 2007). Cabe destacar que la necesidad o no de someter el banano a la cocción no parece relacionarse con una mayor o menor susceptibilidad del almidón a la digestión enzimática, sino a la proporción de almidón presente en el fruto. En el plátano *verdadero* crudo (Musa AAB, subgrupo plátano) el contenido de almidón es muy similar al del banano de postre verde (Englyst y Cumming, 1986). Sin embargo, la lenta degradación de los α -glucanos del plátano y de otros bananos de cocción a lo largo del período climatérico (Marriott y col., 1981), garantiza que el fruto alcance la mesa del consumidor con un alto contenido de almidón y que la pulpa sea difícilmente comestible sin previa cocción o fritura.

VI. CONCLUSIONES

1. Los almidones de los clones de banano presentaron moderados y altos contenidos de almidón disponible (78–94%), tal como cabría esperar en una muestra de almidón aislado, aunque inferiores a los reportados para aquellos provenientes de otras fuentes botánicas.
2. Los almidones de los clones de banano exhibieron un *muy alto* tenor de almidón resistente a la hidrólisis enzimática (41–58%), que es consistente con la baja biodisponibilidad que es atribuida a esta fuente amilácea. Este parámetro presentó el mayor carácter predictivo sobre las respuestas biológicas observadas *in vivo*.
3. Las tasas de α -amilólisis de los almidones crudos fueron muy bajas, estimándose magnitudes finales de hidrólisis que no excedieron el 3%. Las tasas de α -amilólisis de los almidones gelatinizados, por su parte, fueron muy superiores a las estimadas en los almidones crudos, lo cual sugirió la eliminación de gran parte del almidón resistente. Sin embargo, tales cinéticas presentaron una gran heterogeneidad, con magnitudes finales que variaron entre 43–93%.
4. Los almidones gelatinizados de los clones (genomio): HH1 (AAA), HH8 (AB), 055 (AAB), 087 y 089 (ABB), presentaron bajas tasas de α -amilólisis con magnitudes finales entre 43–73%, por lo cual se perfilan como potenciales ingredientes en la fabricación de productos comestibles de bajo índice glucémico.
5. La actividad similar a α -amilasa y la excreción de ácido úrico, pero no la supervivencia, ni la variación del peso del gorgojo de arroz, resultaron ser buenos

estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de banano, al registrarse respuestas biológicas que pudieron ser correlacionadas con el parámetro de digestibilidad *in vitro* almidón resistente.

6. Los almidones crudos de los clones 017 (AAA) y HH22 (AA) presentaron las menores digestibilidades, mientras que HH8 (AB) y 089 (ABB) fueron los almidones más digeribles. Según los análisis *in vivo*, estos últimos presentaron biodisponibilidades que resultaron similares a la exhibida por el almidón de maíz.
7. Se halló una aparente influencia del genomio del banano en la digestibilidad del almidón aislado. Los almidones crudos de *Musa acuminata* (AA, AAA y AAAA) presentaron digestibilidades inferiores a las estimadas en los almidones de los bananos híbridos (AB, AAB y ABB).
8. Se confirmó la utilidad del bioensayo del gorgojo de arroz como primera aproximación en la caracterización de la biodisponibilidad de los almidones aislados del banano.

VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J.J., Pacheco-Vargas, G., Osorio-Diaz, P., Bello-Pérez, L.A. (2012). Starch digestibility and glycemic index of cookies partially substituted with unripe banana flour. *Food Science and Technology*. **46**: 177-182.
- Andersen, I.H., Levine, A.S., Levitt, M.D. (1981). Incomplete absorption of the carbohydrate in all-purpose wheat flour. *The New England Journal of Medicine*. **304**(15): 891-892.
- Aparicio-Saguilán, A., Sáyago-Ayerdi, S.G., Vargas-Torres, A., Tovar, J., Ascencio-Otero, T.E., Bello-Pérez, L.A. (2006). Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch. *Journal of Food Composition and Analysis*. **20**(3-4): 175-181.
- Arora, T., Sharma, R., Frost, G. (2011). Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*. **56**: 511-515.
- Asp, N.-G. (1992). Resistant starch. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 1-148.
- Baker, D.H. (2008). Animal models in nutrition research. *The Journal of Nutrition*. **138**(2): 391-396.
- Baker, J.E. (1976). Nitrogenous excretory products of adults of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **53B**: 107-109.
- Baker, J.E. (1987). Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), by high-performance liquid chromatography and their interaction with partially-purified amylase inhibitors from wheat. *Insect Biochemistry*. **17**(1): 37-44.
- Baker, J.E., Woo, S.M. (1992). Digestion of starch granules by alpha-amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage, and detergent treatment. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **22**(6): 529-537.
- Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Sáyago-Ayerdi, S.G., Moreno-Damian, E. (2000). Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/Stärke*. **52**(2-3): 68-73.
- Bello-Pérez, L.A., Sáyago-Ayerdi, S.N., Méndez-Montealvo, G. (2004). *In vitro* digestibility of banana starch cookies. *Plant Foods for Human Nutrition*. **59**: 79-83.
- Berry, C.S. (1986). Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*. **4**: 301-314.

- Björck, I., Granfeldt, Y., Liljerberg, H., Tovar, J., Asp, N.-G. (1994). Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*. **59**(3): 699-705.
- Brouns, F., Kettlitz, B., Arrigoni, E. (2002). Resistant starch and "the butyrate revolution". *Trends in Food Science & Technology*. **13**: 251-261.
- Brown, A.C. (2010). **Understanding Food: Principles and Preparation**. 4.^a edición. Cengage Learning. Belmont, CA (EE.UU.).
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **23**: 85-112.
- Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H., Bello-Pérez, L.A. (2011). Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**: 1376-1382.
- Carmona-García, R., Aguirre-Cruz, A., Yee-Madeira, H., Bello-Pérez, L.A. (2009). Dual modification of banana starch: partial characterization. *Starch/Stärke*. **61**(11): 656-664.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A. (1997). Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales Venezolanos de Nutrición*. **10**(1): 20-26.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. (1998). Toxicología nutricional: un enfoque "artropocéntrico". *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **1**: 37-40.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. (2001). Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **3**: 53-56.
- Carmona, A., Casotto, M. (2001). Índice de eficiencia alimentaria (FER) en gorgojos de arroz (*Sitophilus oryzae*): herramienta para evaluar la utilización metabólica del alimento. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **3**: 49-52.
- Chen, W.J., Anderson, J.W., Jennings, D. (1984). Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **175**(2): 215-218.
- Cheng, H.-H., Lai, M.-H. (2000). Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *The Journal of Nutrition*. **130**(8): 1991-1995.

- Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson, G.R., Chopra, I. (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**(2): 161-165.
- Clarke, J.M., Topping, D.L., Bird, A.R., Young, G.P., Cobiac, L. (2008). Effects of high-amylose maize starch and butyrylated high-amylose maize starch on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats. *Carcinogenesis*. **29**(11): 2190-2194.
- Colonna, P., Leloup, V., Buléon A. (1992). Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 17-32.
- Cummings, J.H., Beatty, E.R., Kingman, S.M., Bingham, S.A., Englyst, H.N. (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition*. **75**: 733-747.
- de la Torre-Gutiérrez, L., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D. (2008). Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chemistry*. **106**: 1138-1144.
- Dufour, D., Gibert, O., Giraldo, A., Sánchez, T., Reynes, M., Pain, J.-P., González, A., Fernández, A., Díaz, A. (2009). Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of cultivated Colombian musaceae (*Musa* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 7870-7876.
- Englyst, H.N., Wiggins, H.S., Cumming, J.H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. **107**: 307-318.
- Englyst, H.N., Cumming, J.H. (1986). Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **44**: 42-50.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cumming, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 33-50.
- Englyst, H.N., Hudson, G.J. (2000). Carbohydrates. Págs. 61-76 en: Garrow, J.S., James, W.P.T., Ralph, A. **Human Nutrition and Dietetics**. 10.^a edición. Churchill Livingstone. Edimburgo (Escocia).
- Faisant, N., Buléon, A., Colonna, P., Molis, C., Lartigue, S., Galmiche, J.P., Champ, M. (1995). Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy human: structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition*. **73**: 111-123.
- Ferguson, L.R., Tasman-Jones, C., Englyst, H.N., Harris, P.J. (2000). Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutrition and cancer*. **36**(2): 230-237.

- Galeno, F. (2006). **Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano**. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Gallant, D.J., Bouchet, A., Buleón, A., Pérez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 3-16.
- Gamero, M., Laurentin, A., Bernal, C., Galindo, I., Diez, N. (2010). Toxicidad *in vivo* y proteómica comparativa para el estudio de la expresión de proteínas con actividad insecticida presentes en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. *RET Revista de Estudios Transdisciplinarios*. **2**(1): 101-109.
- Gamet, L., Daviaud, D., Pouxviel, C. (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *International Journal of Cancer*. **52**: 286-289.
- Ganong, W.F. (2002). **Fisiología Médica**. 18.^a edición. El Manual Moderno. México D.F.
- García, O. (2003). **Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados, utilizando el bioensayo con el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae***. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Gil, A. (2010). **Tratado de nutrición**. 2.^a edición. Médica Panamericana. Madrid.
- González-Quilen, C., Laurentin, A. (2012). Método de extracción del ácido úrico excretado por el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) alimentado con diferentes dietas. *Acta Científica Venezolana*. **63**(supl. 1), pág. 192 (Resumen). LXII Convención Anual de AsoVAC. Caracas, 18–23 de noviembre.
- Goñi, I., García-Diz, L., Mañas, E., Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*. **56**(4): 445-449.
- Granfeldt, Y., Drews, A., Björck, I. (1995). Arepas made from high amylose corn flour produce favorably low glucose and insulin responses in healthy humans. *The Journal of Nutrition*. **125**(3): 459-465.
- Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., Kiriya, S. (1999). Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *The American Society for Nutritional Sciences*. **129**(5): 942-948.
- Hemlata, M.K., Bhide, A.J., Gupta, V.S., Giri, A.P. (2012). Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene*. **501**: 1-7.
- Hernández-Nava, R.G., Berrios, J.d.J., Pan, J., Osorio-Díaz, P., Bello-Pérez, L.A. (2009). Development and characterization of spaghetti with high resistant starch content

- supplemented with banana starch. *Food Science and Technology International*. **15**: 73-78.
- Hickey, D.A., Benkel, B. (1982). Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: Effects of dietary carbohydrate. *Biochemical Genetics*. **20**: 1117-1129.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*. **141**(2): 295-306.
- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A.-C., Asp, N.-G., Larsson, K., Lundquist, I. (1983). Digestibility of amylose-lipid complexes *in-vitro* and *in-vivo*. *Starch/Stärke*. **35**(9): 294-297.
- Holm, J., Björck, I., Sjöberg, L.-B., Lundquist, I. (1985). Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *Journal of Cereal Science*. **3**: 193-206.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N.-G. (1986). A rapid method for analysis of starch. *Starch/Stärke*. **38**: 224-226.
- Hostettler, F., Borel, E., Deuel, H. (1951). Über die reduktion der 3,5 dinitrosalicylsäure durch Zucker. *Helvetica Chimica Acta*. **34**: 2132-2139.
- Imberty, A., Buléon A., Tran V., Pérez, S. (1991). Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke*. **43**(10): 375-384.
- Klowden, M.J. (2007). **Physiological systems in insects**. 2.^a edición. Academic Press. Moscow, ID (EE.UU.).
- Laurentin, A. (2004). **Starch pyrodextrins: *In vitro* fermentation and physiological effects**. Tesis (Ph.D.). Universidad de Glasgow. Glasgow (Escocia).
- Laurentin, A., Edwards, C.A. (2013). Fiber: resistant starch and oligosaccharides. en: Caballero, B., Allen, L., Prentice, A. **Encyclopedia of Human Nutrition**. 3.^a edición. Academic Press. Waltham, MA (EE.UU.).
- Leathwood, P., Pollet, P. (1988). Effects of slow release carbohydrates in the form of bean flakes on the evolution of hunger and satiety in man. *Appetite*. **10**(1): 1-11.
- Lehmann, U., Robin, F. (2007). Slowly digestible starch—its structure and health implications: a review. *Trends in Food Science & Technology*. **18**: 346-355.
- Lin, Y., Vonk, R.J., Slooff, M.J.H., Kuipers, F., Smit, M.J. (1995). Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *British Journal of Nutrition*. **74**: 197-207.

- Lorini, I., Krzyzanowski, F.C., França-Neto, J.d.B., Henning, A.A. (2010). Principais Pragas e Métodos de Controle em Sementes durante o Armazenamento—Série Sementes. *Embrapa Soja.Circular Técnica*. **73**: 1-10.
- Lovera, M. (2008). **Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.)**. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- López, Y. (1999). **Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae***. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Magoulas, C., Bally-Cuif, L., Loverre-Chyurlia, A., Benkel, B., Hickey, D.A. (1993). A short 5'-flanking region mediates glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **134**: 507-515.
- Marín, J. (2009). **Estudio del almidón presente en frutos de variedades de musáceas cultivadas en Venezuela**. Tesis (Doctor en Ciencias). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Marriott, J., Robison, M., Karikari, S.K. (1981). Starch and sugar transformation during the ripening of plantains and bananas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **32**: 1021-1026.
- Martín, V. (2010). **Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones de plátano, variedades hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012**. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2002). **Bioquímica**. 3.^a edición. Pearson Educación. Madrid.
- Mondal, S.K., Ray, B., Thakur, S., Ghosal, P.K. (2001). Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudate from *Musa paradisiaca*. *Fitoterapia*. **72**(3): 263-271.
- Morais, M.B., Feste, A., Miller, R.G., Lifschitz, C.H. (1996). Effect of resistant and digestible starch on intestinal absorption of calcium, iron, and zinc in infant pigs. *Pediatric Research*. **39**: 872-876.
- Muir, J.G., Young, G.P., O'Dea, K. (1994). Resistant starch—implications for health. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. **18**: 23-32.
- Munro, H.N. (1951). Carbohydrate and fat as factors in protein utilization and metabolism. *Physiological Reviews*. **31**(4):449-488.

- Nugent, A.P. (2005). Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*. **30**: 27-54.
- O'Keefe, S.J.D., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., Mawhinney, T. (2009). Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *The Journal of Nutrition*. **139**(11): 2044-2048.
- Oates, C.G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*. **8**: 375-382.
- Pelissari, F.M., Andrade-Mahecha, M., do Amaral Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2012). Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Starch/Stärke*. **64**(5): 382-391.
- Pérez, E., Bahnassey, Y.A., Breene, W.M. (1993). A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch/Stärke*. **45**(6): 211-214.
- Pérez, E., Marín, J. (2009). Situación actual de las harinas de banano: Usos potenciales en la agroindustria nacional. *Producción agropecuaria*. **2**(1): 65-68.
- Phillips, J., Muir, J.G., Birkett, A., Lu, Z.X., Jones, G.P., O'Dea, K. (1995). Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *American Society for Clinical Nutrition*. **62**: 121-130.
- Ploetz, R.C., Kepler, A.K., Daniells, J., Nelson, S.C. (2007). Banana and plantain—an overview with emphasis on Pacific island cultivar. Págs. 1-27 en: Elevitch, C.R. **Species profiles for Pacific island agroforestry**. Permanent Agriculture Resources. Holualoa, HI (EE.UU.).
- Regmi, P.R., van Kempen, T., Matte, J.J., Zijlstra, R.T. (2011). Starch with high amylose and low *in vitro* digestibility increases short-chain fatty acid absorption, reduces peak insulin secretion, and modulates incretin secretion in pigs. *The Journal of Nutrition*. **141**: 398-405.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. (2006). Resistant Starch—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **5**: 1-17.
- Sarko, A., Wu, H.-C.H. (1978). The crystal structures of A-, B- and C-polymorphs of amylose and starch. *Starch/Stärke*. **30**(3): 73-78.
- Simmonds, N.W., Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **55**: 302-312.
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*. **21**: 168-180.

- Stephen, A.M., Haddad, A.C., Phillips, S.F. (1983). Passage of carbohydrate into the colon: direct measurements in humans. *Gastroenterology*. **85**(3): 589-595.
- Szwarcbort, J. (1980). **Efectos de algunos factores antinutricionales presentes en granos de leguminosas sobre el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.)**. Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Tester, R.F., Sommerville, M.D. (2003). The effect of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinisation, swelling and α -amilase hydrolysis of maize and wheat starches. *Food Hydrocolloids*. **17**: 41-54.
- Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. **39**: 151-165.
- Tester, R.F., Qi, X., Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*. **130**: 39-54.
- Thorne, M.J., Thompson, L.U., Jenkins, D.J.A. (1983). Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **38**: 481-488.
- Topping, D.L., Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*. **81**(3): 1031-1064.
- Tovar, J., Björck, I., Asp, N.-G. (1992). Digestibility of starch in legumes using the rat. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**(2): 141-142.
- Valmayor, R.V., Jamaluddin, S.H., Silayoi, B., Kusumi, S., Danh, L.D., Pascua, O.C., Espino R.R.C. (2000). **Banana cultivar names and synonyms in southeast Asia**. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Asia and the Pacific Office. Laguna (Filipinas).
- van Munster, I.P., Tangerman, A., Nagengast, F.M. (1994). Effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism, and mucosal proliferation. *Digestive Diseases and Sciences*. **39**(4): 834-842.
- Vasanthan, T., Hoover, R. (1992). A comparative study of the composition of lipids associated with starch granules from various botanical sources. *Food Chemistry*. **43**: 19-27.
- Vatanasuchart, N., Niyomwit, B., Wongkrajang, K. (2012). Resistant starch content, *in vitro* starch digestibility and physico-chemical properties of flour and starch from Thai bananas. *Journal of Science and Technology*. **6**(2): 259-271.
- von Loesecke, H.W. (1950). **Bananas**. 2.^a edición. Interscience. Nueva York.

- Weurding, R.E., Veldman, A., Veen, W.A., van der Aar, P., Verstegen, M.W. (2001). *In vitro* starch digestion correlates well with rate and extent of starch digestion in broiler chickens. *American Society for Nutritional Sciences*. **131**: 2336-2342.
- Willis, H.J., Eldridge, A.L., Beiseigel, J., Thomas, W., Slavin, J.L. (2009). Greater satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects. *Nutritional Research*. **29**: 100-105.
- Wolever, T.M.S. (2003). Carbohydrate and the regulation of blood glucose and metabolism. *Nutritional Reviews*. **61**(5): 40-48.
- Wool, D., Namir, Z., Bergerson, O. (1986). Dietary regulation of amylase activity levels in flour beetles (Coleoptera: Tenebrionidae): (*Tribolium*). *Annals of the Entomological Society of America*. **79**: 407-413.
- Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigné, C., Rayssiguier, Y., Remésy, C. (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*. **86**: 479-485.
- Zhang, P., Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Hamaker, B.R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*. **59**: 443-458.
- Zhang, P., Hamaker, B.R. (2012). Banana starch structure and digestibility. *Carbohydrate Polymers*. **87**: 1552-1558.
- Zobel, H.F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke*. **40**(2): 44-50.