

Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Instituto de Biología Experimental



Pirodextrinas de almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) brasileño: Producción y análisis estructural

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

Caracas, Junio de 2020



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
VICERRECTORADO ACADÉMICO
COMISIÓN CLASIFICADORA CENTRAL DEL
PERSONAL DOCENTE Y DE INVESTIGACIÓN**

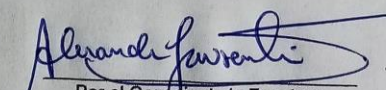


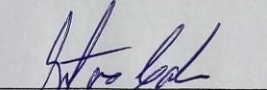
ACTA PARA TRABAJO DE ASCENSO A LA CATEGORÍA DE ASOCIADO

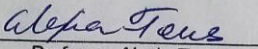
Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el trabajo de Ascenso a la categoría ASOCIADO, presentado por la Profesora Mighay Carlet Lovera Fuchs, Titular de la C.I. N°. 17.482.187, bajo el Título "Pirodextrinas de almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) brasilero: Producción y análisis estructural", a los fines de su ascenso en el escalafón docente universitario a la categoría de ASOCIADO, según lo establecido en los artículos 95 y 96 de la Ley de Universidades, y dejan constancia de lo siguiente:

1. Leído como fue dicho Trabajo por cada uno de los miembros del Jurado, se fijó el día martes, 4 de mayo de dos mil veintiuno, a las nueve horas para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que esta hizo a distancia y en forma síncrona, utilizando la plataforma Zoom, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió a las preguntas que le fueron formuladas, todo ello conforme a lo dispuesto en el Artículo 87 del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la Universidad Central de Venezuela.
2. Finalizada la defensa del Trabajo de Ascenso, el Jurado decidió por UNANIMIDAD, de acuerdo a los Artículos 95 y 96 del Reglamento citado, el ADMITIRLO, por considerar sin hacerse solidario de las ideas expuestas por la autora, que se trata de un trabajo personal que significa un aporte a la materia por cuanto a que trabajó con el almidón de ñame, una materia prima poco conocida y estudiada, el trabajo desarrollado utilizó diferentes disciplinas y tocó diversas áreas del conocimiento científico: aspectos bioquímicos, nutricionales y de la tecnología de alimentos; también utilizó herramientas de investigación muy novedosas para el estudio estructural de las pirodextrinas que le permitieron sugerir su uso como un ingrediente funcional, todo de conformidad a lo pautado en los Artículos 77 y siguientes del Reglamento del Personal Docente y de Investigación de la Universidad Central de Venezuela.
3. De conformidad al Artículo 97 del mismo Reglamento el Jurado POR UNANIMIDAD, acordó otorgar Mención Honorífica.

En fe de lo cual se levanta la presente Acta, en Caracas a los cuatro días del mes de mayo de dos mil veintiuno dejándose también constancia de que conforme al Artículo 93 del Reglamento citado, que actuó como Coordinador del Jurado el profesor Alexander Laurentin.


Por el Consejo de la Facultad
Coordinador - Profesor Alexander Laurentin


Por el Consejo de la Facultad
Profesor Gustavo Cabrera


Profesora Alexia Torres
Por el Consejo de Desarrollo
Científico y Humanístico

Nota: Legalmente conveniente motivación de los eventos evaluativos

Resumen

El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de pirodextrinización del almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) brasileiro para producir pirodextrinas amarillas con baja digestibilidad *in vitro* y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. El almidón nativo fue aislado a partir de tubérculos de ñame cultivados en el Nordeste brasileiro y para la optimización del proceso de piroconversión fue utilizado un diseño experimental central compuesto rotatable con dos factores: concentración de ácido (0,65–2,99 g de HCl/kg de almidón, en base seca) y tiempo de incubación (53–307 min). Los mayores niveles de ambos factores tuvieron un efecto negativo sobre el contenido de almidón disponible (AD), pero influenciaron positivamente la diferencia de color (ΔE). La mejor condición para producir pirodextrinas con menor AD fue encontrada tratando el almidón nativo con 1,82 g de HCl/kg por 307 min a 140 °C, la cual produjo una pirodextrina amarilla con 46,6 % de AD, 24,5 de ΔE y 6,6 % de equivalentes de dextrosa. Las pirodextrinas presentaron un rango de masa molecular promedio en peso entre 36–332 kDa, determinadas por cromatografía de exclusión por tamaño a alta resolución. El análisis de los espectros infrarrojo mostró una menor ocurrencia de los enlaces glucosídicos α -(1,4) en sus cadenas poliméricas y una disminución en el grado de orden en las capas externas de los gránulos piroconvertidos. En los espectros ^1H -RMN de las pirodextrinas se observó la presencia de enlaces no amiláceos como α -(1,2), β -(1,2), β -(1,4) y β -(1,6). Las alteraciones en la estructura molecular explicaron en parte la reducción de la digestibilidad (30–54 % de AD en relación al almidón nativo, $p < 0,05$), evaluada *in vitro* mediante la hidrólisis consecutiva con la α -amilasa y la amiloglucosidasa. Las pirodextrinas obtenidas a partir del almidón de ñame resultaron ser materiales promisorios como fibras alimentarias muy solubles y poco viscosas con potenciales aplicaciones en el área de alimentos.

Este trabajo fue realizado en el **Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos** del Núcleo de Biología Experimental, en la *Universidade de Fortaleza*, Ceará, Brasil, bajo la supervisión del Dr. Renato de Azevedo Moreira, y en el **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular** de la *Universidade Federal do Ceará*, bajo la supervisión del Dr. Hermógenes David de Oliveira, durante mi permiso por Excedencia Activa (2016-2018) de la *Universidad Central de Venezuela*.

DEDICATORIA

A mi abuelo
Luis Florencio Lovera Vega

El Profesor
El Maestro Panadero

Saudades de você

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Dr. Renato de Azevedo Moreira y Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira por la oportunidad brindada para la realización de mi Pasantía de Investigación en Brasil y por ponerme a disposición las instalaciones y recursos del *Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos*, del Núcleo de Biología Experimental de la Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Agradezco toda la confianza, enseñanza, orientación y amistad recibida.

A los profesores Dr. Hermógenes David de Oliveira y Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidade Federal do Ceará, UFC) por su tutoría, orientación y sus contribuciones en la corrección de los manuscritos finales de las publicaciones.

A la Dra. Maria do Socorro Rocha Bastos (*Laboratório de Embalagens de Alimentos*, Agroindústria Tropical – Fortaleza, Ceará, Embrapa) por su colaboración, apoyo y gestión para la realización de los análisis de RMN.

Al Prof. PhD. Alexander Laurentin por su apoyo, orientación y asesoría sobre el proceso de pirodextrinización y su aporte en las correcciones finales del artículo científico.

A los Ms. George Meredite Cunha de Castro y Francisco Rogênio da Silva Mendes, y a los Dr. Lorena Mara Alexandre e Silva y Venícios Gonçalves Sombra por su contribución en la realización del diseño experimental, los análisis de espectroscopía de infrarrojo, RMN y cromatografías, respectivamente.

A todos mis colegas del *Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas* (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, UFC), *Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos* (Núcleo de Biología Experimental, UNIFOR), *Laboratório de Embalagens de*

Alimentos (Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza, Ceará) y *Laboratório de Polímeros* (Dpto. Química Orgânica e Inorgânica, UFC) por el apoyo y los gratos momentos vividos durante mi estadía en Brasil.

Agradezco al programa PAEC OEA-GCUB-2015 (Programa de Alianzas para la Educación y la Capacitación, Organización de Estados Americanos y el Grupo Coimbra de las Universidades Brasileñas) y a CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*), por el apoyo financiero con la beca de postgrado para realizar estudios en Brasil, haciendo posible mi estadía académica y de investigación en las universidades brasileñas (UFC y UNIFOR).

A la UCV por la aprobación de mi permiso por Excedencia Activa. A la Facultad de Ciencias, al IBE, al CBC, a la Escuela de Biología y especialmente a mis colegas de la Unidad Docente de Bioquímica, Dra. María Carolina Pérez Gordones, Dra. Meris Casotto y Dr. Alexander Laurentin por el apoyo recibido.

Doy gracias a mi querida familia de amigos y colegas latinoamericanos que me acompañaron durante mi estadía en el extranjero, así como a mis amados padres, hermanos y abuelos, por su apoyo incondicional en la realización y culminación exitosa de una meta más en mi carrera profesional y experiencia de vida.

A todos ellos, sinceramente,

Muito obrigada!

Tabla de contenido

I. Introducción	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Pirodextrinas.....	3
2.2. El ñame en Brasil: cultivo y almidón	4
2.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las pirodextrinas	5
III. Objetivos.....	7
IV. Materiales y Métodos	8
4.1. Materia prima y reactivos.....	8
4.2. Extracción del almidón.....	8
4.3. Composición química del almidón.....	9
4.4. Proceso de piroconversión.....	9
4.5. Digestibilidad y caracterización fisicoquímica.....	11
4.5.1. Almidón disponible.....	11
4.5.2. Parámetros de color.....	11
4.5.3. Equivalentes de dextrosa.....	12
4.6. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB)	12
4.7. Distribución del tamaño molecular de las pirodextrinas	13
4.8. Análisis estructural por espectroscopía	14
4.8.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	14
4.8.2. Espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN)	14
4.9. Análisis estadístico	15
VI. Resultados y discusión	16
Extracción del almidón y caracterización química	16
Efectos del proceso de pirodextrinización	17
<i>Almidón disponible</i>	19
<i>Parámetros de color</i>	21
<i>Equivalentes de dextrosa</i>	23
Tamaño y morfología granular	27
Distribución de tamaño molecular de las pirodextrinas.....	29

Análisis estructural por FTIR	31
Análisis estructural por ^1H -RMN	33
VII. Conclusiones.....	36
VIII. Consideraciones finales	37
IX. Bibliografía.....	38
X. Apéndice.....	43
XI. Publicaciones	47

Índice de figuras

Figura 1.	Fórmula estructural de la NUTRIOSE®06, producto basado en pirodextrinas.....	6
Figura 2.	Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de la concentración de ácido (X_1) y el tiempo de incubación (X_2) sobre las características de las pirodextrinas de almidón de ñame brasileiro. (a) contenido de AD, (b) índice ΔE y (c) valor ED.	20
Figura 3.	Aspecto visual del almidón de ñame nativo y las pirodextrinas.....	22
Figura 4.	Gráfico de superficie de respuesta en 3D para las características de las pirodextrinas de almidón de ñame brasileiro en función de la concentración de ácido y el tiempo de incubación. (a) contenido de AD, (b) índice ΔE y (c) valor ED.....	26
Figura 5.	Micrografías de los gránulos de las pirodextrinas y del almidón de ñame nativo, obtenidas por MEB a diferentes aumentos.....	28
Figura 6.	Espectros infrarrojos de las pirodextrinas y del almidón de ñame nativo.....	32
Figura 7.	Espectros de ^1H -RMN de las pirodextrinas en la región de 4,0 a 5,6 ppm.....	34

Índice de tablas

Tabla 1.	Matriz del DCCR 2 ² utilizado para la producción de pirodextrinas a partir del almidón de ñame brasileiro.....	10
Tabla 2.	Caracterización química del almidón de ñame (% en bs, excepto la humedad).....	16
Tabla 3.	Digestibilidad y caracterización fisicoquímica de las pirodextrinas amarillas producidas a partir del almidón de ñame brasileiro.....	18
Tabla 4.	Características de la masa molecular de las pirodextrinas de almidón de ñame.....	29

I. Introducción

Los cambios en la dieta hacia un aumento en la ingesta de fibra alimentaria se han asociado con una reducción en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular y cáncer colorrectal (Lockyer y col., 2016). Esta es una de las razones que explican el creciente interés en la industria alimentaria por fortalecer sus productos con fibra alimentaria y/o sus análogos fisiológicos, buscando satisfacer así la demanda de los consumidores por alimentos procesados más saludables (Kapuśniak y Nebesny, 2017). Uno de estos carbohidratos análogos a la fibra alimentaria es la pirodextrina.

Diferentes grupos de investigación han estudiado el proceso de pirodextrinización o conversión térmica del almidón, –las etapas tecnológicas del proceso y las condiciones de piroconversión como: concentración del catalizador ácido, temperatura y tiempo de incubación–, con el objetivo de producir almidones modificados con propiedades fisicoquímicas, reológicas y térmicas que sean de utilidad para el sector industrial. La piroconversión no es un proceso nuevo, históricamente ha sido el primer método para modificar almidones nativos, introducido a fines del siglo XIX para la producción de agentes adhesivos en la industria de papel (Le Thanh-Blicharz y col., 2016). Sin embargo, sus aplicaciones en el área de alimentos son alternativas relativamente más recientes (últimos 20 años), que han surgido a medida que se conocen las características nutricionales de las pirodextrinas, aquellas relacionadas con la digestibilidad (*in vitro* e *in vivo*), fermentabilidad y capacidad de modular el crecimiento de bacterias probióticas.

Existe un interés particular por elucidar las alteraciones estructurales que se promueven en el almidón durante el proceso de pirodextrinización y cómo se asocian estas

modificaciones directa o indirectamente con las propiedades funcionales y nutricionales reportadas para las pirodextrinas. Por esta razón, es evidente el mayor esfuerzo de los investigadores en el análisis químico estructural usando técnicas espectroscópicas. Sin embargo, son escasos los estudios sobre pirodextrinas que reportan una caracterización estructural de este tipo, en conjunto con la optimización del proceso de pirodextrinización del almidón, con especial interés en almidones de fuentes no convencionales como el ñame.

El siguiente Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asociado de la UCV, aborda la investigación recientemente publicada por Lovera y colaboradores (*Carbohydrate Polymers*, 2020, 116382), sobre la pirodextrinización del almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) brasileiro para producir pirodextrinas amarillas de baja digestibilidad *in vitro*, usando un diseño central compuesto rotatable 2^2 y la metodología de superficie respuesta para evaluar el efecto aislado y combinado de la concentración de ácido y del tiempo de incubación sobre el contenido de almidón disponible, la diferencia de color y el valor de equivalentes de dextrosa en las pirodextrinas. Además, se incluyen los resultados de mi Tesis de Maestría (Fuchs, 2018) sobre los análisis estructurales a nivel supramolecular (granular) y molecular de las pirodextrinas de ñame brasileiro, a través de un estudio por microscopía electrónica de barrido, cromatografía de exclusión por tamaño y espectroscopía en el infrarrojo. Adicionalmente, se incorpora el análisis comparativo de los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de las 11 pirodextrinas. La presente investigación contribuye a ampliar la comprensión del proceso de piroconversión del almidón y aporta evidencia estructural sobre el tamaño molecular y los enlaces glucosídicos no amiláceos presentes, que explican en parte la reducción de la digestibilidad en las pirodextrinas, así como, su semejanza estructural a las fibras alimentarias y, por tanto, sus posibles efectos fisiológicos.

II. Antecedentes

2.1. Pirodextrinas

La pirodextrina es un almidón modificado en condiciones de baja humedad por la acción del calor o por una combinación de calor y un catalizador ácido (Laurentin, 2004). Con este tratamiento físico las moléculas de almidón experimentan las siguientes reacciones químicas: hidrólisis, transglucosidación y repolimerización de los glucanos para formar una estructura compleja (Wurzburg, 1986). El resultado de este tratamiento es un producto soluble en agua fría, con baja o nula viscosidad en solución, parcialmente resistente a la digestión o indigerible, altamente fermentable en el colon y con la capacidad de afectar el crecimiento de bacterias probióticas, actuando como prebióticos (Laurentin y Edwards, 2004; Barczyńska y col., 2015; Le Thanh-Blicharz y col., 2015).

Uno de los principales efectos de la pirodextrinización es el aumento de la solubilidad en agua fría y la reducción de la viscosidad (Laurentin y Edwards, 2004). Los dos parámetros varían ampliamente según las condiciones de pirodextrinización. Las pirodextrinas son muy solubles en agua fría (> 95 %) y tienen una viscosidad baja o nula (Lovera y col., 2020), en comparación con el almidón nativo que es insoluble (<1 %) y después de la gelatinización forma soluciones altamente viscosas, incluso a bajas concentraciones (Fuchs, 2018). Además, las pirodextrinas son de color amarillo a crema debido a la formación durante el calentamiento de compuestos coloridos de bajo peso molecular (Le Thanh-Blicharz y col., 2016).

Las pirodextrinas se clasifican como un aditivo alimentario [INS N° 1400] (FAO, 2001) y un ingrediente alimentario (EU Commission Directive, 2000). Existen varios productos

basados en pirodextrinas disponibles comercialmente (NUTRIOSE® y Fibersol®), los cuales se producen a nivel industrial a partir de almidones de maíz, papa y trigo (Ohkuma y col., 1997; Lefranc-Millot, 2008). Sin embargo, los almidones no convencionales obtenidos a partir de lenteja, sorgo, ocumo criollo, sagú y frijoles también han resultado apropiados para preparar pirodextrinas (Laurentin y col., 2003; Campechano-Carrera y col., 2007), debido a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales.

2.2. El ñame en Brasil: cultivo y almidón

La región Nordeste de Brasil es la principal zona productora de ñame del país (género *Dioscorea*, familia Dioscoreaceae) y el ñame amarillo (*D. cayennensis* Lam. Cultivar “inhame-da-Costa”) junto con el ñame de agua (*D. alata* L. cultivar “inhame São Tomé”) son los cultivos de *Dioscorea* más importantes para el consumo humano. A pesar de su amplia distribución e importancia como fuente farmacológica y alimentaria, los ñames se denominan especies subutilizadas (Siqueira, 2011). Por ello, su estudio y utilización ayudaría aún más al desarrollo del ñame como cultivo sostenible, así como al procesamiento del valor agregado de sus almidones (Zhu, 2015). Por ejemplo, el género *Dioscorea* es una fuente de almidones nativos cuyas propiedades funcionales, fisicoquímicas y características nutricionales, si se explotan suficientemente, podrían generar aplicaciones interesantes en la industria alimentaria y no alimentaria (Amani y col., 2005; Otegbayo y col., 2014).

El almidón de ñame (*Dioscorea* spp.) es una excelente fuente de almidón resistente debido a la baja digestibilidad *in vitro* encontrada en algunas especies (Riley y col., 2014; Lovera y col., 2017) y podría usarse como alternativa a otros almidones de tubérculos y raíces —como la papa o la yuca—, para producir pirodextrinas y potenciales carbohidratos

prebióticos. Sin embargo, la pirodextrinización de almidones de *Dioscorea* spp. ha sido poco estudiada. Recientemente Luo y col. (2019) prepararon pirodextrinas rociando el almidón de ñame chino (*Dioscorea opposita* Thunb.) con una solución de ácido clorhídrico (0,01 M), usando una concentración final de ácido de 0,7–2,3 g de HCl/kg de almidón en base seca, temperaturas y tiempos de calentamiento de 130–170 °C y 30–120 minutos, respectivamente. Estas pirodextrinas presentaron un contenido de la fracción resistente a la digestión enzimática en el rango de 11,8–71,3 %, con índices de blancura de 80,7–34,5 % y solubilidad en agua entre 14,3–98,4 %. Estos autores también prepararon una dextrina resistente a la digestión enzimática usando simultáneamente una piroconversión y una modificación química en presencia de un ácido orgánico (ácido cítrico) como agente modificador. La dextrina finalmente obtenida presentó características que la hacían adecuada para su uso en bebidas, como fibras alimentarias solubles y carbohidratos prebióticos.

2.3. Digestibilidad *in vitro* de las pirodextrinas

La pirodextrinización se considera un proceso prometedor para la producción de almidón resistente (AR). El AR se define como la suma del almidón y los productos de su degradación que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992). Los cambios en la estructura molecular como el tamaño de los glucanos, el mayor grado de ramificación de las cadenas y la presencia de enlaces glucosídicos atípicos al almidón (Bai y Shi, 2016; Han y col., 2018), hacen que las pirodextrinas sean un tipo específico de AR, pero generalmente no se incluyen en la clasificación nutricional de AR1 a AR5 (Le Thanh-Blicharz y col., 2016). Sin embargo, algunos autores incluyen a las pirodextrinas en el AR4, una categoría propuesta para almidones modificados químicamente y también

físicamente, y que presentan enlaces químicos no amiláceos (Laurentin y Edwards, 2013; Raigond y col., 2015).

El análisis estructural de las pirodextrins ha revelado su naturaleza compleja, con la formación durante la piroconversión de los enlaces glucosídicos 1→2, 1→3 y 1→6 (Ohkuma y Wakabayashi, 2001; Okuma y Matsuda, 2002; Bai y Shi, 2016; Han y col. 2018; Luo y col., 2019), tanto en la conformación α como β , con una reducción simultánea de los enlaces 1→4 (Le Thanh-Blicharz y col., 2016). En la Figura 1 se muestra la fórmula estructural de la NUTRIOSE®06, un producto basado en pirodextrinas de la empresa ROQUETTE (Lestrem, Francia). La indigestibilidad de las pirodextrinas se ha atribuido principalmente a la formación de los enlaces atípicos al almidón durante las reacciones de transglucosidación (Siljeström y col., 1989; Laurentin y Edwards, 2004). Sin embargo, la presencia de compuestos de color marrón-crema formados durante el calentamiento, también pueden contribuir con la reducción de la digestibilidad (Le Thanh-Blicharz y col., 2016).

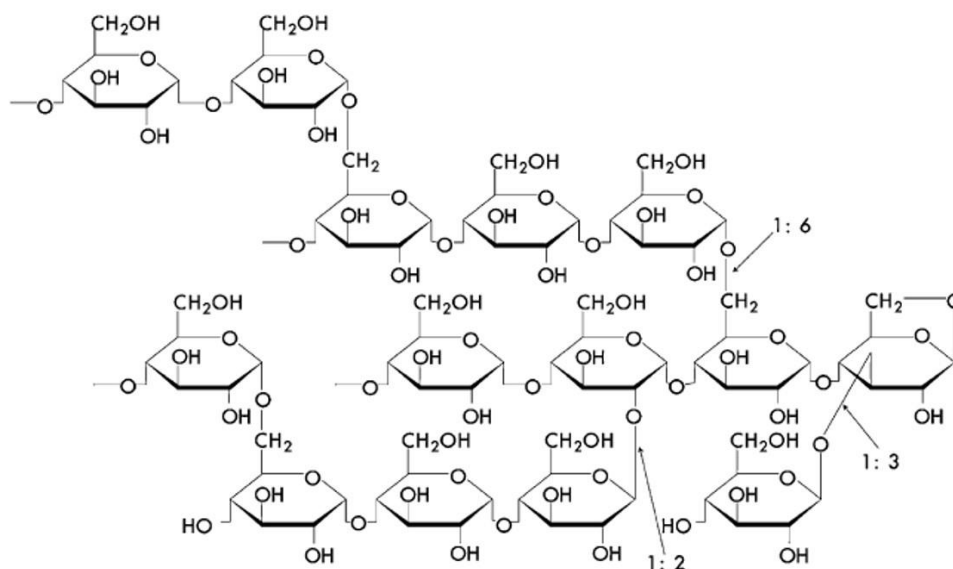


Figura 1. Fórmula estructural de la NUTRIOSE®06, producto basado en pirodextrinas.

Tomado de Lefranc-Millot (2008).

III. Objetivos

Objetivo general

Optimizar la piroconversión del almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) brasileiro para producir pirodextrinas amarillas de baja digestibilidad *in vitro*, y evaluar los efectos de la concentración de ácido y del tiempo de incubación sobre la digestibilidad y algunas características fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de las pirodextrinas.

Objetivos específicos

1. Aislar el almidón de ñame (*Dioscorea* sp.) a partir de tubérculos cultivados en el Nordeste brasileiro y determinar su composición química.
2. Producir pirodextrinas a partir del almidón de ñame brasileiro empleando un diseño central compuesto rotatable (2^2), con la concentración de ácido y el tiempo de incubación como factores independientes.
3. Evaluar el efecto de la concentración de ácido y del tiempo de incubación sobre el contenido de almidón disponible, la diferencia de color y el valor de equivalentes de dextrosa en las pirodextrinas.
4. Analizar la morfología granular de las pirodextrinas mediante microscopía electrónica de barrido.
5. Estimar la masa molecular promedio de las pirodextrinas por cromatografía de exclusión por tamaño a alta resolución.
6. Analizar la estructura molecular de las pirodextrinas mediante las técnicas de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y de resonancia magnética nuclear de protones.

IV. Materiales y Métodos

4.1. Materia prima y reactivos

Los tubérculos de ñame (*Dioscorea* sp.) fueron adquiridos en el mercado local en Fortaleza, estado de Ceará, en la región Nordeste de Brasil. Los reactivos y las enzimas utilizadas fueron de grado analítico (EC: 3.2.1.1 y EC: 3.2.1.3) adquiridas de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

4.2. Extracción del almidón

El almidón fue extraído a partir de tubérculos de ñame de acuerdo con la metodología descrita por Pérez y col. (2011) con pequeñas variaciones. Brevemente, una porción de la parte comestible del tubérculo fue homogeneizada con el doble de su volumen en agua destilada, durante 2 minutos en una licuadora industrial Skymssen (LAR-06MB, Santa Catarina, Brasil) y el homogenizado recogido fue filtrado a través de una malla de muselina. La operación de molienda y filtrado fue repetida tres veces. La suspensión resultante fue centrifugada (Hitachi Koki, Himac CR-22G III, Tokio, Japón) a $276 \times g$ durante 15 minutos, para facilitar la separación del mucílago viscoso. El sedimento fue lavado dos veces resuspendiéndolo en agua destilada y obtenido por centrifugación bajo las mismas condiciones, luego se secó en una estufa a 45 °C durante 48 horas. El almidón fue triturado en un mini molino (Philips Walita, Brasil) hasta obtener un polvo fino, el cual fue pasado a través de un tamiz de 80 mesh y almacenado en una bolsa plástica sellada dentro de un desecador.

4.3. Composición química del almidón

El almidón nativo se analizó para determinar la proteína cruda ($N \times 6,25 \%$), cenizas y grasa cruda siguiendo los métodos descritos en la AACC (2003): 46–11A; 08–17 y 30–10, respectivamente. El contenido de amilosa se determinó colorimétricamente de acuerdo con el método ISO 6647-1 (2007). El contenido de humedad se determinó gravimétricamente para el almidón nativo y las pirodextrinas, secando 2 g de la muestra a 130 °C durante 2 horas. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

4.4. Proceso de piroconversión

Las pirodextrinas fueron producidas utilizando un diseño central compuesto rotatable (DCCR) 2^2 , con 5 niveles y 11 ensayos (4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 3 repeticiones del punto central, C), para evaluar los efectos aislados y combinados de la concentración de ácido (X_1) y del tiempo de incubación (X_2) sobre el contenido de almidón disponible (AD), la diferencia de color (ΔE) y el valor de equivalentes de dextrosa (ED) de las pirodextrinas producidas a partir del almidón nativo (Tabla 1). La concentración de ácido se expresó como una proporción final de ácido/almidón (g de HCl/kg de almidón, en base seca, bs) y el tiempo de incubación en minutos.

La piroconversión se realizó de acuerdo con Laurentin y col. (2003) con modificaciones. Brevemente, se colocaron 22 g (bs) de almidón de ñame brasileiro en un mortero y se pulverizó un volumen específico (entre 0,18 y 0,82 ml) de la solución de HCl 2,2 M sobre el almidón, a una proporción final de ácido/almidón como se muestra en la Tabla 1, se mezcló bien y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente (etapa de

pre-tratamiento). Luego, se calentó en una estufa a 140 °C (temperatura fija para todos los ensayos) durante el tiempo correspondiente (etapa de piroconversión). La pirodextrina obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos, fue molida, pasada a través de un tamiz de 80 mesh y almacenada en un recipiente de plástico cerrado dentro de un desecador hasta su uso. Se determinó el contenido de AD, el índice ΔE y el valor ED de las pirodextrinas (por triplicado) y se evaluaron los efectos aislados y combinados de las variables independientes, usando la metodología de superficie respuesta. Fue seleccionada la condición óptima de pirodextrinización que produjo el contenido de AD y el índice ΔE más bajo en comparación con el almidón nativo, y un valor de ED < 10.

Tabla 1. Matriz del DCCR 2² utilizado para la producción de pirodextrinas a partir del almidón de ñame brasileiro.

Ensayo	Valores reales de las variables independientes (valor codificado)	
	Concentración de ácido (X ₁)	Tiempo de incubación (X ₂)
	(g de HCl/kg de almidón, bs)	(minutos)
1	0,99 (-1)	90 (-1)
2	0,99 (-1)	270 (+1)
3	2,65 (+1)	90 (-1)
4	2,65 (+1)	270 (+1)
5	0,65 (- α)	180 (0)
6	2,99 (+ α)	180 (0)
7	1,82 (0)	53 (- α)
8	1,82 (0)	307 (+ α)
9 (C)	1,82 (0)	180 (0)
10 (C)	1,82 (0)	180 (0)
11 (C)	1,82 (0)	180 (0)

4.5. Digestibilidad y caracterización fisicoquímica

4.5.1. Almidón disponible

El contenido de AD en el almidón nativo y las pirodextrinas se evaluó siguiendo el protocolo multienzimático de Holm y col. (1986) con modificaciones. El AD representa la fracción digerible una vez que el almidón ha sido gelatinizado. Brevemente, se incubó una suspensión del almidón o pirodextrina (300 mg bs dispersado en 20 ml de agua destilada) con 100 μ L de la α -amilasa termoestable (200 U/ml) de *Bacillus licheniformis* durante 20 minutos en un baño de agua a ebullición, y seguidamente, este material fue digerido con la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* a 60 °C durante 30 minutos (3,5 U/ml). La glucosa liberada se cuantificó usando el ensayo colorimétrico de glucosa oxidasa/peroxidasa (estuche Glicose Liquiform; Labtest Diagnóstica S. A, Brasil). El porcentaje de AD se calculó de acuerdo a la ecuación (1):

$$AD (\%) = \frac{Cantidad\ de\ glucosa\ (\mu g) \times 10^{(a)} \times 100^{(b)} \times 0,9^{(c)}}{0,05^{(d)} \times 0,5^{(e)} \times 1000^{(f)} \times peso\ seco\ de\ la\ muestra\ (mg)} \times 100 \quad (1)$$

donde:

- ^(a) Volumen final luego de la digestión con amiloglucosidasa, en mililitros.
- ^(b) Volumen final luego de la digestión con α -amilasa termoestable, 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.

4.5.2. Parámetros de color

Los parámetros de color se midieron según Le Thanh-Blicharz y col. (2016) mediante el método de reflexión en un colorímetro Konica Minolta (modelo CR 410, Osaka, Japón),

usando el sistema de clasificación del CIEL*a*b*. La diferencia de color o índice ΔE se determinó por comparación con el almidón nativo, usando la ecuación (2):

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

donde:

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

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

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

4.5.3. Equivalentes de dextrosa

El número de grupos reductores en el almidón nativo y las pirodextrinas se determinó de la siguiente manera: 20 ml de una suspensión (1 % p/v, bs) se gelatinizó en un baño de agua a ebullición durante 20 minutos. Después de enfriarse, la solución se transfirió a un balón aforado de 50 ml, se completó el volumen con agua destilada y se mezcló. Los azúcares reductores se midieron de acuerdo con el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) con 1 ml de reactivo DNS y un volumen igual de muestra gelatinizada (Hostettler y col., 1951). El equivalente de dextrosa se expresó como un porcentaje del azúcar reductor (dextrosa pura) calculado en base seca (Le Thanh-Blicharz y col., 2016).

4.6. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras secas de pirodextrinas y el almidón de ñame nativo fueron montadas sobre soportes, fijadas con cinta adhesiva y recubiertas con una película delgada de oro haciendo vacío. La morfología de los gránulos se observó en un microscopio electrónico de barrido InspectTM de la FEI Company (modelo S50, Oregón, USA). Las imágenes generadas

fueron escaneadas a diferentes aumentos usando potenciales de aceleración de 15–20 kV. Los tamaños promedio de los gránulos fueron determinados midiendo el diámetro y la longitud de 10 gránulos en una micrografía. Los análisis de MEB fueron realizados en la Central Analítica del Departamento de Física de la *Universidade Federal do Ceará*, Brasil.

4.7. Distribución del tamaño molecular de las pirodextrinas

La masa molecular promedio en peso (M_w) y la masa molecular promedio en número (M_n) de las pirodextrinas se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño a alta resolución (HPSEC del inglés *high-performance size exclusion chromatography*) con un instrumento Shimadzu (modelo LC-20AD, Kyoto, Japón) a temperatura ambiente, utilizando la columna lineal PolySepTM SEC GFC-P (7,8 × 300 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil fue nitrato de sodio acuoso (0,1 M) con un flujo de 1 ml/min. Las muestras (c = 1 mg/ml) se disolvieron en la fase móvil a 70 °C con agitación y se filtraron antes del análisis a través de microfiltros de 0,45 µm, de acuerdo con Le Thanh-Blicharz y col. (2016) y se inyectaron 100 µL del filtrado en un sistema HPSEC. Se usó un refractómetro diferencial como detector (modelo RID-10A, instrumento Shimadzu). Un estuche de pullulanos (ShodexTM P-82, Showa Denko, Kawasaki, Japón) con M_w de 5,9 a 788 kDa fueron usados como estándares para la curva de selectividad. La columna y el detector se mantuvieron a 30,7 °C y 40 °C, respectivamente. El M_w , M_n y el índice de polidispersidad (I) de las muestras fueron calculados usando las ecuaciones (3), (4) y (5), respectivamente:

$$M_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i \quad (3)$$

$$M_n = \sum n_i M_i / n_i \quad (4)$$

$$I = M_w / M_n \quad (5)$$

donde:

M_i representa el peso molecular de las muestras calculado a partir de la curva estándar y n_i representa la señal del detector de índice de refracción (Trithavisup y col., 2019).

4.8. Análisis estructural por espectroscopía

4.8.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El espectro infrarrojo de las pirodextrinas y del almidón de ñame nativo se registró en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR (modelo IRTrace-100, Kyoto, Japón) a temperatura ambiente. La muestra (2 mg, bs) se mezcló con KBr (200 mg), se trituro en un mortero y se prensó en tabletas antes de la medición. Se usó una región del infrarrojo medio (400 a 4000 cm^{-1}) para escanear la muestra a una resolución de 4 cm^{-1} por 64 escaneos.

4.8.2. Espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) de las pirodextrinas se obtuvieron con un espectrómetro Agilent DD2 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) de 600 MHz (14,1 Teslas), equipado con una sonda One Probe™ de diámetro interno de 5 mm (^1H -F/ ^{15}N ^{31}P), de detección inversa y gradiente de campo en el eje “Z”. Aproximadamente 10 mg de las muestras se diluyeron en 550,0 μl de solución de D_2O /3-trimetilsilil-2,2,3,3-tetradeterio propionato de sodio (TSP) (0,17 mg/ml). Los sobrenadantes se transfirieron a tubos portamuestra de 5 mm de diámetro externo. Los espectros de ^1H -RMN se adquirieron usando pulsos calibrados, 64 escaneos, 32k de puntos de dominio de tiempo con una ventana espectral de 16,0 ppm y un retraso de relajación de

2,0 segundos a 25 °C. Se utilizó el TSP como patrón interno para establecer la escala de desplazamiento químico ($\delta = 0$ ppm) reportado como partes por millón (ppm).

La asignación de las resonancias en los espectros de ^1H -RMN en las pirodextrinas se realizó por comparación con los datos recientes existentes (Bai y Shi, 2016; Han y col., 2018; Luo y col., 2019). Todos los experimentos de RMN fueron realizados por la Dra. Lorena Mara Alexandre Sillva del *Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais* en Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Brasil.

4.9. Análisis estadístico

Para el diseño experimental y el análisis estadístico se aplicó el software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Las variables respuesta se ajustaron mediante un modelo de regresión polinomial de segundo orden, utilizando un análisis de regresión múltiple. La calidad del modelo se evaluó mediante coeficientes de determinación (R^2 y $\text{Adj-}R^2$), el valor de precisión adecuado (Noordin y col., 2004; Germec y col. 2019) y el análisis de varianza (ANOVA). Para describir los efectos aislados y combinados de los factores sobre las tres variables respuestas, se generaron gráficos de superficie respuesta en 3D. Los datos también se analizaron utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba *a posteriori* de Duncan para la comparación de las medias, además de los análisis de correlaciones simples ($p < 0,05$), empleando el mismo software.

V. Financiamiento

Esta investigación recibió apoyo de la UNIFOR, la agencia CAPES y el programa PAEC OEA-GCUB quienes me otorgaron la beca académica para realizar estudios en Brasil.

VI. Resultados y discusión

Extracción del almidón y caracterización química

La composición química del almidón de ñame se muestra en la Tabla 2. El contenido de humedad ($13,8 \pm 0,2$ %) estuvo en el rango reportado para los almidones comerciales y de *Dioscorea* spp. (Swinkels, 1985; Jiang y col., 2012), al igual que los contenidos de proteína cruda, cenizas y grasa cruda (Amani y col., 2004; Nwokocha y Williams, 2011). En general, los bajos niveles de proteína (< 1 %), grasa y cenizas ($< 0,3$ %) indicaron una alta pureza en el almidón (Lovera y col. 2020). El alto contenido de AD también reflejó un nivel de pureza satisfactorio. Se podría esperar que el contenido de almidón total en el almidón de ñame (no determinado) sea similar al contenido de AD aquí reportado porque los almidones crudos no contienen fracciones retrogradadas que disminuyan el contenido de AD (Lovera y col. 2017).

Tabla 2. Caracterización química del almidón de ñame (% en bs, excepto la humedad).

Componente	(%)
Humedad	$13,8 \pm 0,2$
Proteína cruda	$0,71 \pm 0,28$
Grasa cruda	$0,24 \pm 0,04$
Cenizas	$0,21 \pm 0,02$
Amilosa	$9,33 \pm 0,18$
AD	$96,6 \pm 2,1$

El almidón de ñame nativo presentó un contenido de amilosa aparente inferior al reportado para otros almidones de *Dioscorea* spp., en el rango de 13,58–20,05 %

(amilopectina: 79,95–86,42 % versus 90,67 %) (Jiang y col., 2012). El contenido de amilosa en este estudio fue cuantificado igualmente mediante el método colorimétrico con yodo, pero utilizando muestras no desgrasadas y esto generalmente proporciona contenidos de amilosa más bajos porque los lípidos pueden formar complejos de inclusión con la amilosa (Zhu, 2015). Este bajo contenido de amilosa fue consistente con una alta digestibilidad *in vitro* del almidón de ñame, resultados similares a los reportados por Riley y col. (2014).

Efectos del proceso de pirodextrinización

La Tabla 3 presenta la digestibilidad y algunas características fisicoquímicas de las pirodextrinas amarillas obtenidas por piroconversión del almidón de ñame brasileiro. Los tratamientos relativamente suaves (< 1 g de HCl/kg de almidón) como el 1 y el 5 no afectaron el contenido de AD ($p > 0,05$) pero produjeron pirodextrinas notablemente más claras ($p < 0,05$) que aquellas obtenidas por tratamiento fuertes ($> 2,5$ g de HCl/kg de almidón) como el 3, 4 y 6, que generaron las pirodextrinas de menor digestibilidad en comparación con el almidón nativo ($p < 0,05$). En general, un tiempo de calentamiento prolongado como en el tratamiento 8 (Pir-8), condujo a un menor contenido de AD en relación a los tratamientos más cortos, como el 11 y el 7, todos usando 1,82 g de HCl/kg de almidón. Esta tendencia también se observó con una concentración de ácido de 0,99 g/kg, pero curiosamente, no con 2,65 g/kg. Como se esperaba, el almidón de ñame brasileiro fue piroconvertido rápidamente utilizando altas concentraciones de ácido y no se encontraron diferencias significativas en el contenido de AD al aumentar el tiempo de incubación de 90 a 270 min (Pir-3 y Pir-4, respectivamente). Luo y col. (2019) reportaron un aumento brusco del contenido de la fracción resistente en los primeros 60 minutos de piroconversión, y luego este aumento disminuye lentamente con tiempos de calentamiento más largos.

Tabla 3

Digestibilidad y caracterización fisicoquímica de las pirodextrinas amarillas producidas a partir del almidón de ñame brasileiro.

Modificado de Lovera y col. (2020).^{1, 2, 3}

Pirodextrinas	AD (%, bs)	² Reducción en el AD (%)	Parámetros de color				ED (%, bs)
			<i>L</i> [*]	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	ΔE	
1	95,4 ± 2,9 ^a	1,2	92,3 ± 0,03 ^c	0,11 ± 0,00 ^g	7,3 ± 0,07 ^j	4,0 ± 0,0 ^h	2,8 ± 0,0 ^d
2	67,4 ± 1,7 ^b	30,2	93,4 ± 0,04 ^b	-0,28 ± 0,00 ^h	10,0 ± 0,03 ⁱ	6,2 ± 0,0 ^g	3,4 ± 0,0 ^c
3	44,1 ± 1,7 ^d	54,4	60,4 ± 0,51 ^h	5,3 ± 0,04 ^c	30,5 ± 0,24 ^b	43,5 ± 0,2 ^b	7,4 ± 0,1 ^a
4	44,2 ± 3,2 ^d	54,3	63,5 ± 0,51 ^g	5,8 ± 0,06 ^b	31,4 ± 0,18 ^a	41,7 ± 0,3 ^c	7,3 ± 0,1 ^a
5	86,2 ± 6,9 ^a	10,7	91,4 ± 0,16 ^c	0,49 ± 0,07 ^e	9,6 ± 0,27 ⁱ	6,5 ± 0,2 ^g	1,6 ± 0,0 ^f
6	44,2 ± 1,4 ^d	54,2	56,3 ± 0,78 ⁱ	6,0 ± 0,12 ^a	28,8 ± 0,32 ^c	45,9 ± 0,5 ^a	7,5 ± 0,2 ^a
7	67,6 ± 6,3 ^b	30,0	83,6 ± 0,22 ^d	-0,46 ± 0,07 ⁱ	20,4 ± 0,23 ^h	19,7 ± 0,3 ^f	7,3 ± 0,1 ^a
8	46,6 ± 2,3 ^d	51,7	83,4 ± 0,46 ^d	0,43 ± 0,04 ^e	25,1 ± 0,06 ^d	23,9 ± 0,2 ^e	6,6 ± 0,1 ^b
9 (C)	49,8 ± 5,5 ^{c, d}	48,4	80,2 ± 0,09 ^e	1,2 ± 0,02 ^d	23,6 ± 0,11 ^f	24,3 ± 0,1 ^e	6,4 ± 0,1 ^b
10 (C)	53,4 ± 5,3 ^c	44,7	80,4 ± 0,15 ^e	1,2 ± 0,03 ^d	24,7 ± 0,24 ^e	25,0 ± 0,3 ^d	6,6 ± 0,1 ^b
11 (C)	54,2 ± 3,9 ^c	43,9	76,7 ± 0,13 ^f	1,2 ± 0,06 ^d	21,3 ± 0,12 ^g	24,9 ± 0,1 ^d	6,6 ± 0,2 ^b
Almidón nativo	96,6 ± 2,1 ^a	—	94,6 ± 0,62 ^a	0,29 ± 0,07 ^f	4,0 ± 0,46 ^k	—	1,8 ± 0,1 ^e

¹Los valores son los promedios ± desviación estándar del análisis por triplicado. Los promedios en las columnas que no comparten las mismas letras de superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$; prueba de Duncan).

² La reducción en el contenido de AD se calculó como $(AD_{\text{nativo}} - AD_{\text{pirodextrinizado}}) \times 100 / AD_{\text{nativo}}$.

³C, punto central; bs, base seca; AD, almidón disponible; ΔE , diferencia de color; ED, equivalente de dextrosa; Pir, pirodextrina.

Almidón disponible

El contenido de AD en las pirodextrinas fue significativamente menor al almidón nativo, con la excepción de las Pir-1 y Pir-5 ($p > 0,05$) (Lovera y col., 2020). Las pirodextrinas producidas se agruparon en cuatro categorías en función de su reducción en el contenido de AD en comparación con el almidón nativo, una forma más fácil de estimar la fracción no digerible reportada por Laurentin y col. (2003). Estos grupos fueron: aquellas con la mayor reducción en la digestibilidad con 52–54 % (Pir-3, Pir-4, Pir-6 y Pir 8), el grupo con valores intermedios entre 44–48 % (Pir-9, Pir-10 y Pir-11), seguido por el grupo con una disminución del 30 % en AD (Pir-2 y Pir-7) y finalmente, aquellas con la menor reducción en el contenido de AD y que resultaron estadísticamente similares ($p > 0,05$) al almidón de ñame nativo (Pir-1 y Pir-5) (Lovera y col., 2020). El contenido de AD correlacionó negativamente con el índice ΔE y el valor ED ($r_{\Delta E} = -0,844$; $r_{ED} = -0,850$; $p < 0,05$; $n = 33$).

La concentración de ácido, el tiempo de incubación y su interacción tuvieron una influencia significativa ($p < 0,05$) sobre el contenido de AD de las pirodextrinas (Apéndice 1). La concentración de ácido tuvo la mayor influencia en el contenido de AD, siendo significativos tanto los coeficientes lineales como cuadráticos. Sin embargo, la concentración de ácido y el tiempo de incubación en términos lineales afectaron negativamente el contenido de AD, aunque la interacción tuvo un efecto positivo en esta variable (Fig. 2a). El modelo matemático ($R^2 = 0,9861$; $p < 0,05$) que ilustra el comportamiento del contenido AD en términos de las variables independientes codificadas está representado por la ecuación (6):

$$AD (\%) = 178,08 - 73,10 X_1 + 9,88 X_1^2 - 0,372 X_2 + 0,00034 X_2^2 + 0,094 X_1 X_2 \quad (6)$$

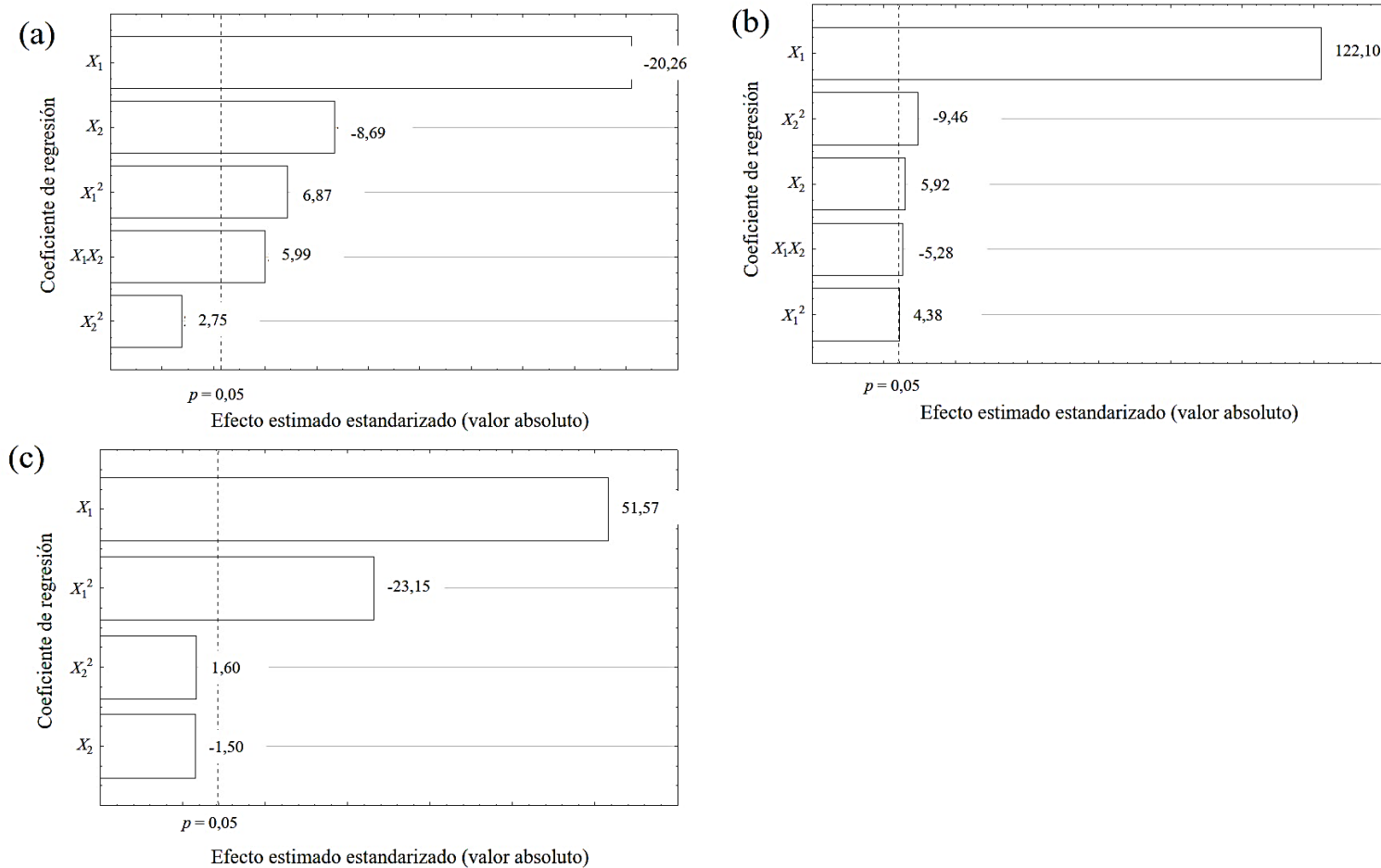


Figura 2. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de la concentración de ácido (X_1) y el tiempo de incubación (X_2) sobre las características de las pirodextrinas de almidón de ñame brasileiro. (a) contenido de AD, (b) índice ΔE y (c) valor ED. Tomado de Lovera y col. (2020).

La piroconversión del almidón produjo una disminución en el contenido de AD similar a lo reportado por diferentes autores (Laurentin y col., 2003; Campechano-Carrera y col., 2007). Laurentin y col. (2003) consiguieron una disminución del 55–65 % en la digestibilidad de las pirodextrinas de almidón de yuca, utilizando las mismas condiciones de piroconversión que en las Pir-1, Pir-2, Pir-3, Pir 4 y el punto central, aunque pulverizando un volumen constante (0,5 ml) de la solución ácida sobre el almidón. Estos autores reportaron que los contenidos de las fracciones no digeribles producidas por la piroconversión difieren según la fuente de almidón utilizada. Se ha reportado que un bajo contenido de amilosa en el almidón de ñame podría conferir una mayor resistencia al tratamiento con ácido y a la modificación térmica (Amani y col., 2005), esto sugiere que se necesitaría una condición de piroconversión más extrema para disminuir su digestibilidad (Lovera y col., 2020).

Parámetros de color

La Figura 3 presenta el aspecto visual del almidón nativo y de las pirodextrinas producidas a partir del almidón de ñame brasileiro. Las pirodextrinas fueron de color crema, amarillo o marrón y se caracterizaron por tener valores más bajos de blancura (L^*) y más altos de a^* y b^* que el almidón de ñame nativo (Tabla 3), resultando más clara la Pir-5 y más oscura la Pir-6. Se encontró una correlación inversa entre L^* y los parámetros a^* y b^* ($r_{a^*} = -0,944$; $r_{b^*} = -0,872$; $p < 0,05$; $n = 33$) y una relación positiva entre a^* y b^* ($r = 0,744$; $p < 0,05$; $n = 33$) (Lovera y col., 2020). Estas correlaciones indicaron un predominio de los colores rojo y amarillo en las pirodextrinas, lo que refuerza la idea del progreso de la caramelización durante el calentamiento. Luo y col. (2019) reportaron una disminución del índice de blancura de las pirodextrinas con la utilización de concentraciones crecientes de HCl.

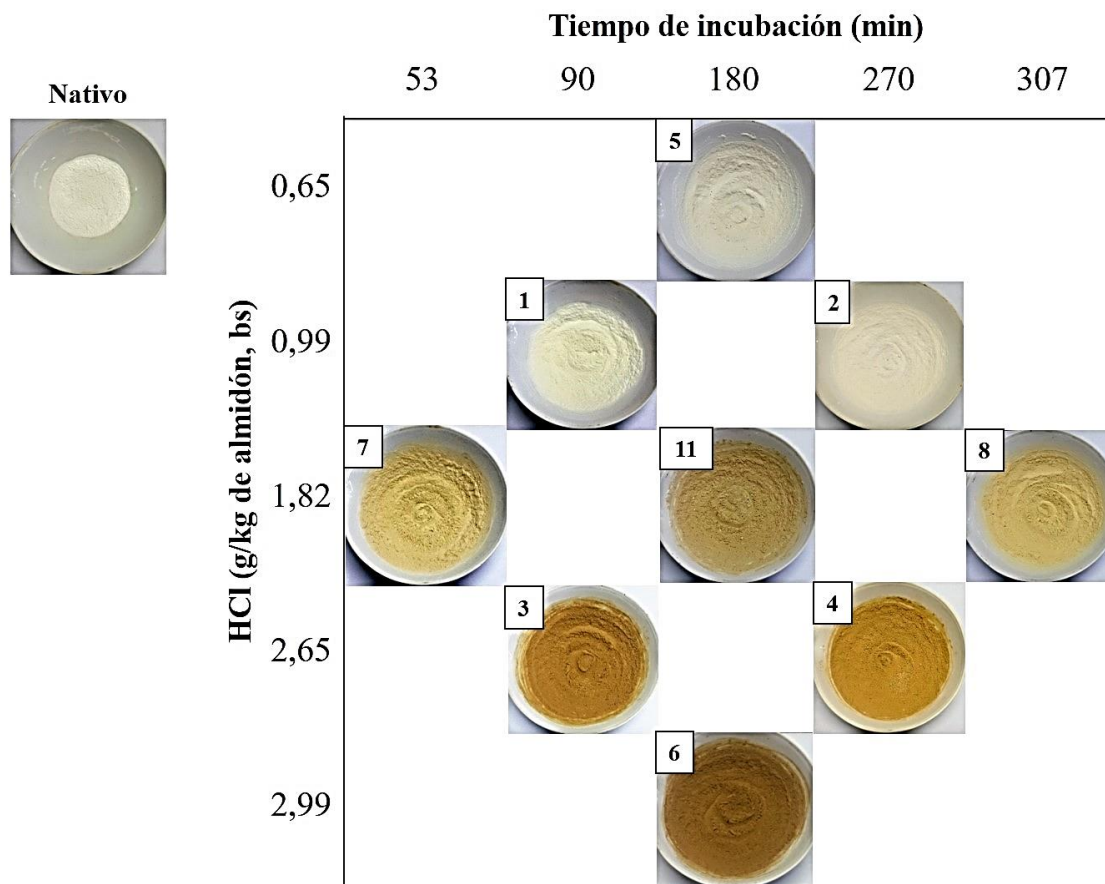


Figura 3. Aspecto visual del almidón de ñame nativo y las pirodextrinas.

Tomado de Lovera y col. (2020).

La concentración de ácido, el tiempo de incubación y su interacción tuvieron una influencia significativa ($p < 0,05$) sobre el índice de ΔE (Apéndice 2). Similar a la variable AD, el análisis de significancia de los coeficientes de cada factor mostró que la concentración de ácido tuvo la mayor influencia sobre el índice ΔE y ambos coeficientes (lineales y cuadráticos) fueron significativos. El tiempo de incubación tuvo un efecto menor pero significativo sobre el índice ΔE , tanto en sus valores lineales como cuadráticos. Los términos lineales de la concentración de ácido y el tiempo de incubación afectaron positivamente el índice ΔE , aunque la interacción tuvo un efecto negativo

en esta variable (Fig. 2b). El modelo de regresión final ($R^2 = 0,9776$; $p < 0,05$) para el índice ΔE de las pirodextrinas está representado por la ecuación (7):

$$\Delta E = -19,81 + 18,43 X_1 + 1,02 X_1^2 + 0,100 X_2 - 0,00019 X_2^2 - 0,013 X_1 X_2 \quad (7)$$

El color en las pirodextrinas depende directamente de las condiciones de pirodextrinización, siendo los tratamientos fuertes los que conducen a una mayor variación de los parámetros de color, como ha sido reportado por diversos autores (Laurentin y col., 2003; Campechano-Carrera y col., 2007; Lin y col., 2018). Terpstra y col. (2010) produjeron pirodextrinas amarillas calentando el almidón de papa durante 5 horas a 165 °C y con $\sim 1,85$ g de HCl/kg de almidón, y reportaron la presencia de estructuras similares a agregados de fragmentos de glucanos intensamente coloridos, unidos físicamente y probablemente aun susceptibles de repolimerizarse y transglucosidarse. Condiciones de piroconversión similares fueron utilizadas en la Pir-8 que resultó de coloración amarilla y presentó baja digestibilidad *in vitro* (Lovera y col., 2020).

El índice ΔE correlacionó positivamente con la ED ($r_{ED} = 0,846$; $p < 0,05$; $n = 33$) y negativamente con el contenido de AD; resultados similares fueron encontrados por Le Thanh-Blicharz y col. (2016) para pirodextrinas comerciales de almidón de papa.

Equivalentes de dextrosa

El proceso de piroconversión aumentó significativamente los valores de ED (Tabla 3), con excepción de la Pir-5 (ligeramente menor que el almidón nativo; $p < 0,05$), lo que sugiere que esta pirodextrina fue poco hidrolizada (Lovera y col., 2020). De acuerdo a Okhuma y col. (1997), las pirodextrinas comerciales de almidones de maíz y de papa presentan valores de ED entre 1 y 10, como los reportados en esta investigación. Sin embargo, la cuantificación de los azúcares

reductores se analizó en muestras gelatinizadas y dado que las pirodextrinas no se neutralizaron después de la piroconversión, no es posible descartar que la digestión haya continuado durante la gelatinización, y con ello, el aumento del contenido de azúcares reductores en la muestra.

Sólo la concentración de ácido, pero no el tiempo de incubación tuvo una influencia significativa ($p < 0,05$) sobre el valor ED (Apéndice 3 y Fig. 2c). Los aumentos lineales y cuadráticos de la concentración de ácido afectaron el valor ED. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9784$; $p < 0,05$) exhibió un excelente resultado experimental que se ajusta al modelo matemático propuesto para el valor ED, representado por la ecuación (8):

$$ED (\%) = - 3,09 + 8,51 X_1 - 1,64 X_1^2 - 0,0042 X_2 + 0,00001 X_2^2 \quad (8)$$

La disminución en los valores de ED a concentraciones de ácido más altas probablemente está asociado a la descomposición térmica y/o al proceso de oxidación del extremo reductor (Lovera y col., 2020). Le Thanh-Blicharz y col. (2016) reportaron que el grado de oxidación durante la piroconversión es limitado e independiente del tipo de pirodextrina. En este estudio, el ED se correlacionó positivamente con el índice ΔE y negativamente con el contenido de AD.

Los coeficientes de determinación R^2 y $Adj-R^2$ para los tres modelos cuadráticos fueron superiores a 0,95, lo cual es deseable. Además, el valor de probabilidad de la prueba de falta de ajuste fue no significativo, excepto para el índice ΔE (Apéndice 1, 2 y 3). Sin embargo, la adecuación de los modelos calculada a través del valor de precisión adecuado para las tres respuestas AD, ΔE y ED fueron 23,1, 18,7 y 23,4, respectivamente (Lovera y col., 2020); indicando que son modelos confiables que se pueden usar para navegar el espacio experimental y predecir las respuestas.

Las ecuaciones (6)–(8) se representaron como gráficos de superficie de respuesta en 3D en las Figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 4a, el aumento de la concentración de ácido y el tiempo de incubación causó una disminución en el contenido de AD de las pirodextrinas. Sin embargo, en las condiciones de pirodextrinización utilizadas en este estudio, la respuesta alcanzó un valor mínimo en lugar de alcanzar el valor óptimo. Los valores críticos para obtener un contenido mínimo de AD del 41,6 % fueron 3,18 g de HCl/kg de almidón y 109 minutos de calentamiento. Para el índice ΔE y el valor ED (Fig. 4b y 4c, respectivamente), una alta concentración de ácido provocó un aumento en ambas respuestas, alcanzando un punto de silla en lugar del valor óptimo. Este comportamiento fue más evidente para la variable ED, con un valor estimado de 7,5 % utilizando 2,59 g de HCl /kg de almidón y 215 minutos de calentamiento.

Las Pir-3, Pir-4, Pir-6 y Pir-8 fueron las menos digeribles y más oscuras, con la excepción de la Pir-8. A pesar de que la Pir-8 presentó un contenido de AD ligeramente superior ($p > 0,05$) que las Pir-3, Pir-4 y Pir-6, ésta fue seleccionada como el tratamiento de pirodextrinización óptimo porque producía una pirodextrina más clara (Tabla 3 y Fig. 3) (Lovera y col., 2020). La Pir-8 utiliza el mayor tiempo de calentamiento con una concentración de ácido no mayor a 2,0 g de HCl/kg de almidón (Tabla 1 y Fig. 3). Según estos resultados, el uso de 1,82 g de HCl/kg de almidón con 307 minutos de calentamiento a 140 °C es una condición adecuada para preparar una pirodextrina de ñame brasileiro con las características de color y digestibilidad *in vitro* deseadas. Además, el punto central del diseño de DCCR –condición de piroconversión evaluada por Laurentin y col. (2003)–, también demostró ser eficiente para preparar pirodextrinas amarillas con apariencia y digestibilidad similares a la Pir-8, pero producidas en un tiempo más corto (180 minutos), lo que es tecnológicamente más ventajoso (Lovera y col., 2020).

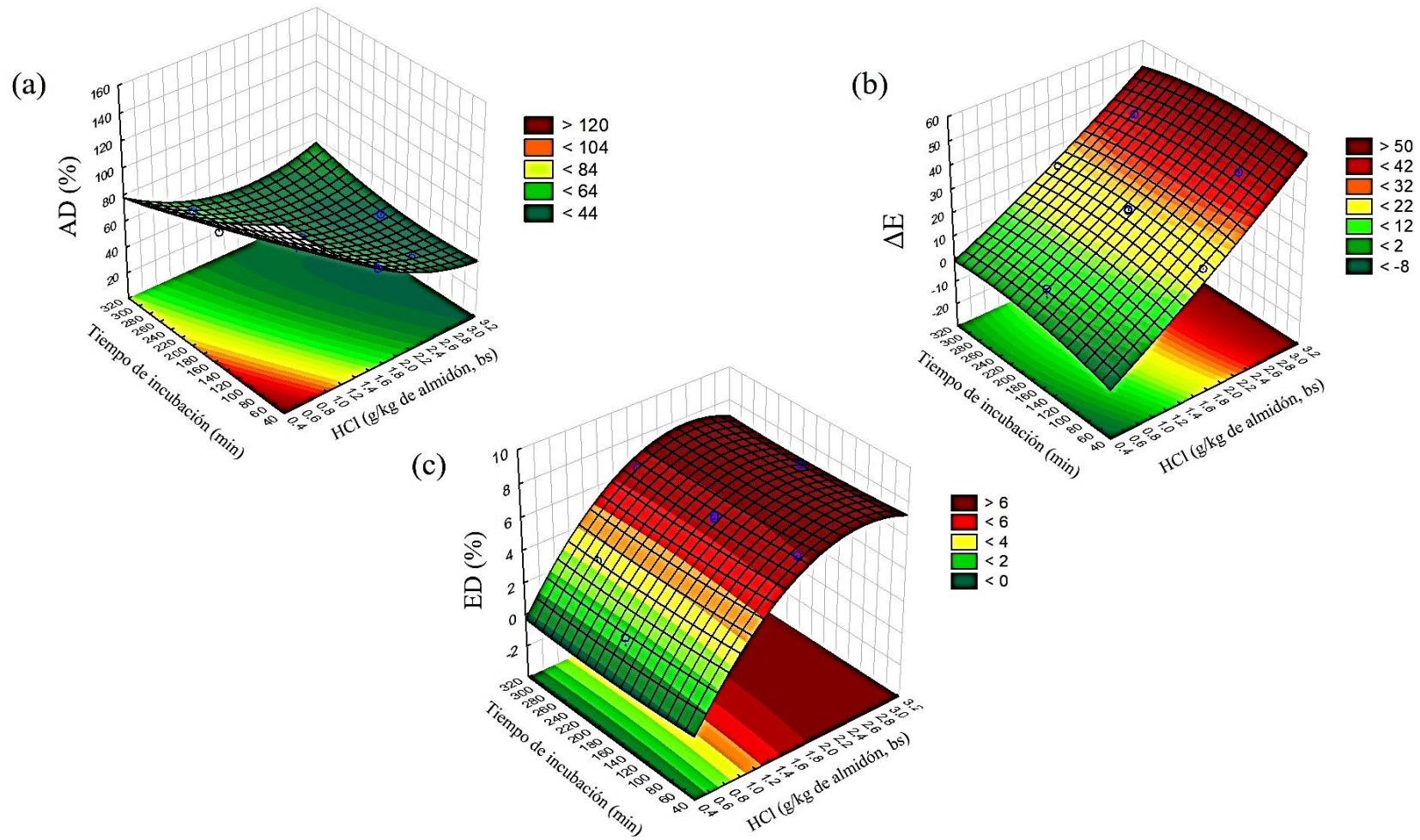


Figura 4. Gráfico de superficie de respuesta en 3D para las características de las pirodextrinas de almidón de ñame brasileiro en función de la concentración de ácido y el tiempo de incubación. (a) contenido de AD, (b) índice ΔE y (c) valor ED. Tomado de Lovera y col. (2020).

Tamaño y morfología granular

Las micrografías electrónicas de barrido de las pirodextrinas y el almidón de ñame nativo se presentan en la Figura 5. La longitud y el diámetro de los gránulos nativos estuvo entre 10,5–37,3 μm y 10,2–31,9 μm , respectivamente, con una relación longitud/diámetro de 1,33, similar a lo reportado por Nwokocha y Williams (2011) y Riley y col. (2006). Los gránulos presentaron formas ovales, elipsoides, poligonales y redondeadas, de superficies lisas con marcas circulares (indicadas con una flecha blanca), las cuales parecen ser características de esta fuente de almidón, tal como reportaron Andrade y col. (2017).

La morfología de los gránulos de pirodextrina (Fig. 5, imágenes 1-11) fue similar al almidón nativo (Fuchs, 2018). Resultados similares fueron encontrados para las pirodextrinas de almidón de yuca y de papa (Laurentin y col., 2003; Le Thanh-Blicharz y col., 2016). En general, los gránulos de pirodextrina mantuvieron su forma granular, pero se observó un ligero aumento en la longitud y en el diámetro (13,2–49,0 y 9,7–36,9 μm , respectivamente), lo que podría sugerir hinchamiento. De acuerdo con Stasiak y col. (2011), la falta de cambios significativos en la morfología de los gránulos es una consecuencia del bajo contenido de humedad en la pirodextrinización. Sin embargo, una observación más detallada de las imágenes de MEB permitió evidenciar diferentes grados de daño en los gránulos pirodextrinizados (indicados con una flecha negra): aglomeración y/o fusión de gránulos (Pir-7 y Pir-8); gránulos parcialmente digeridos (pirodextrinas 2, 3, 4, 6, 9 y 10); gránulos en forma de rosquillas (Pir-5) y estructuras tipo “fantasmas” producidas por la fracción de amilopectina (Pir-8 y Pir-11). Se ha reportado que estos gránulos "fantasmas" en las pirodextrinas indigeribles desaparecen cuando la muestra se suspende en agua, lo que sugiere que estos cambios no influyen en la digestibilidad (Laurentin y col., 2003).

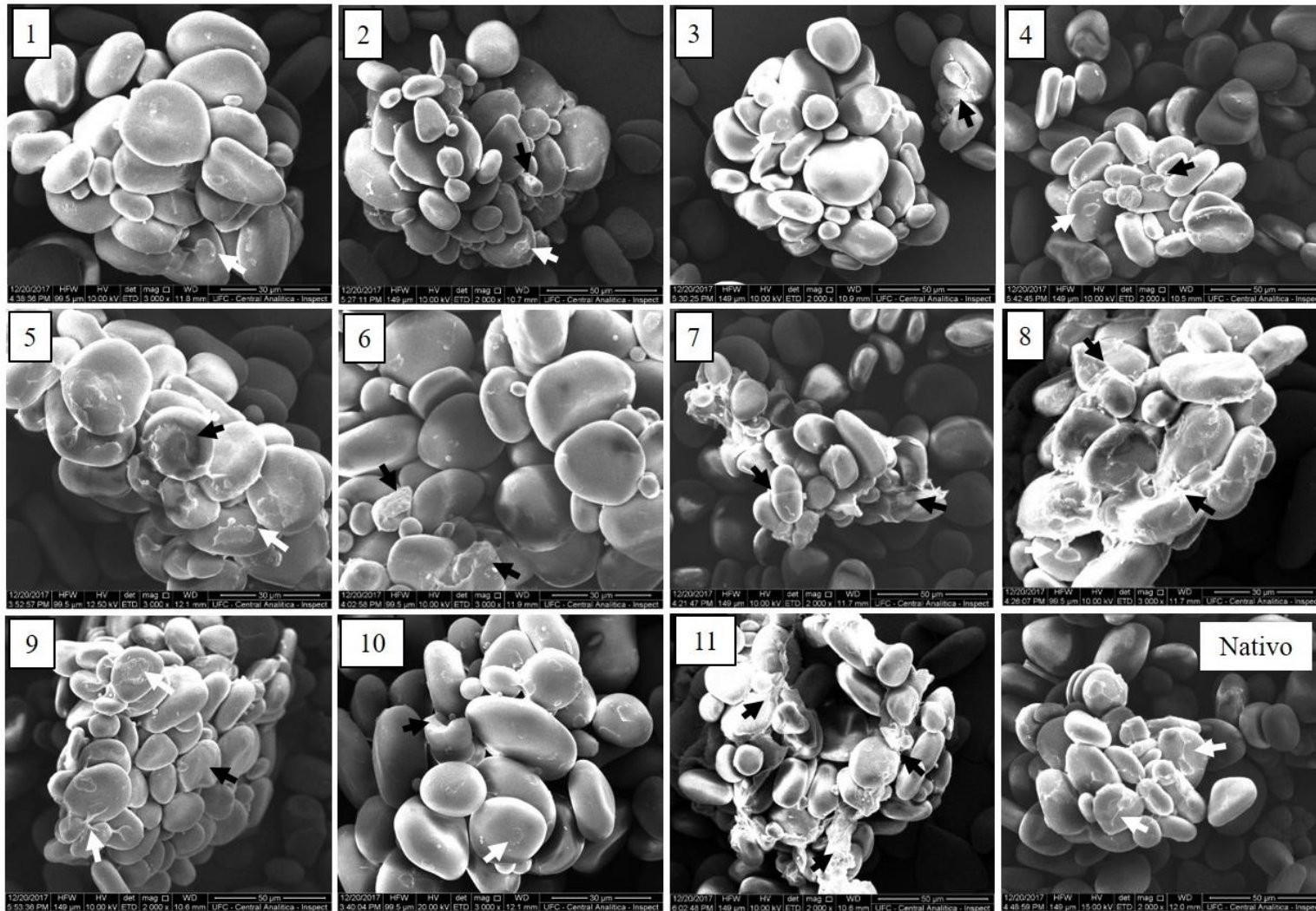


Figura 5. Micrografías de los gránulos de las pirodextrinas y de almidón de ñame nativo, obtenidas por MEB a diferentes aumentos.

Modificado de Fuchs (2018).

Distribución de tamaño molecular de las pirodextrinas

La distribución de tamaño molecular de las pirodextrinas determinada por HPSEC se muestra en la Tabla 4. Los valores de M_w y M_n de las pirodextrinas producidas en este estudio estuvieron en el rango de 36,1–332 kDa y 15,1–29,5 kDa, respectivamente (Fuchs, 2018). Estos valores de M_w fueron mucho menores a los reportados para el almidón de ñame blanco (23.200 kDa) (Nwokocha y Williams, 2011) y otros almidones de *Dioscorea* spp. (188.000–327.000 kDa) (Rolland-Sabaté y col., 2003). La disminución en el M_w de las pirodextrinas fue de 10^3 – 10^4 veces en comparación con las reportadas para diferentes almidones de ñame nativos.

Tabla 4. Características de la masa molecular de las pirodextrinas de almidón de ñame. Modificado de Fuchs (2018).

Pirodextrinas	M_w (kDa)	M_n (kDa)	I
1	104	21,8	4,75
2	70,7	19,7	3,59
3	45,3	15,7	2,89
4	65,6	16,3	4,03
5	332	29,5	11,3
6	47,7	15,7	3,04
7	42,6	15,3	2,79
8	46,4	15,2	3,05
9	36,1	15,1	2,40
10	44,6	16,1	2,77
11	46,1	15,4	2,98

M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; I, índice de polidispersidad.

El índice de polidispersidad indica la variación de la masa molecular del polímero o amplitud del pico gaussiano, el cual estuvo en el rango de 2,4–11,3. Estos valores fueron mayores a los reportados para las pirodextrinas de almidón de yuca (1,7–1,9) preparadas con concentraciones de ácido 0,4–0,6 g de HCl/kg de almidón, temperaturas de 100 y 120 °C y tiempos de incubación de 60, 120 y 180 minutos (Trithavisup y col., 2019). La polidispersidad fue mayor con tratamientos de piroconversión menos severos (Tabla 4, Pir-1 y Pir-5), lo que indica tamaños moleculares más variados. Con la excepción de la Pir-5 (332 kDa) todas las pirodextrinas eluyeron en el intervalo de masa molecular intermedia (IMW), con M_w entre 36–104 kDa (Tabla 4). No se separaron moléculas de muy baja ($M_w < 8$ kDa) y baja (< 36 kDa) masa molecular. De acuerdo con Laurentin y col. (2003) las pirodextrinas producidas en estas condiciones consisten en una mezcla compleja de moléculas con M_w por debajo de 105 kDa, similar a lo obtenido en este estudio con la excepción de la Pir-5.

La reducción de la masa molecular en las pirodextrinas confirma los cambios estructurales que ocurren durante la pirodextrinización, como ha sido reportado por diversos autores (Le Thanh-Blicharz y col., 2016; Trithavisup y col., 2019). Además, estos resultados explican la alta solubilidad en agua a 25 °C y casi nula viscosidad de la mayoría de estas pirodextrinas de ñame (datos no mostrados), lo que hace que sean ideales como fibras alimentarias altamente solubles y no viscosas, por ejemplo, para ser usadas en la alimentación enteral (Fuchs, 2018; Lovera y col., 2020).

Análisis estructural por FTIR

Los espectros infrarrojos de las pirodextrinas y el almidón de ñame nativo se presentan en la Figura 6. En la región de los grupos funcionales se identificó la presencia de las bandas O–H (–OH, grupo hidroxilo) y C–H (–CH₂, grupo metileno), asociada con el modo de vibración de estiramiento de estos enlaces a 3544 cm⁻¹ y 2924 cm⁻¹, respectivamente (Fuchs, 2018). La banda débil entre 1370–1464 cm⁻¹ se atribuyó al movimiento de torsión y flexión de –CH₂. En la región huella dactilar, entre 800–1200 cm⁻¹, se encuentran los modos de vibración de estiramiento C–C, C–O y de flexión C–O–H (Zhang y col., 2010).

Los espectros FTIR de las pirodextrinas y el almidón nativo fueron similares en las bandas de vibración de los enlaces O–H, C–H y C–O, lo que refleja la similitud en las estructuras químicas básicas (Fuchs, 2018). Sin embargo, los cambios en la intensidad máxima indican cambios conformacionales en el almidón (Zheng y col., 2016). Se observó una reducción de la banda –OH a 3544 cm⁻¹ después de la piroconversión, que está relacionada con la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, o cuando el nuevo extremo reductor (como un catión glucosilo) reacciona con grupos hidroxilos adyacentes al polímero hidrolizado, formando nuevos enlaces glucosídicos entre las cadenas de almidón. Sin embargo, no se detectaron picos que confirmen la aparición de enlaces glucosídicos atípicos (Fuchs, 2018).

Según Fuchs (2018) la diferencia más importante entre los espectros FTIR fue la menor intensidad de la banda fuerte a 1647 cm⁻¹ asignada al enlace glucosídico α -(1,4) como fue reportada por Le Thanh-Blicharz y col. (2016). El proceso de pirodextrinización conduce a una disminución significativa en el número de enlaces α -(1,4) como consecuencia de las

reacciones de hidrólisis, lo que también se comprueba con la reducción en la masa molecular del polisacárido observada en la Tabla 4.

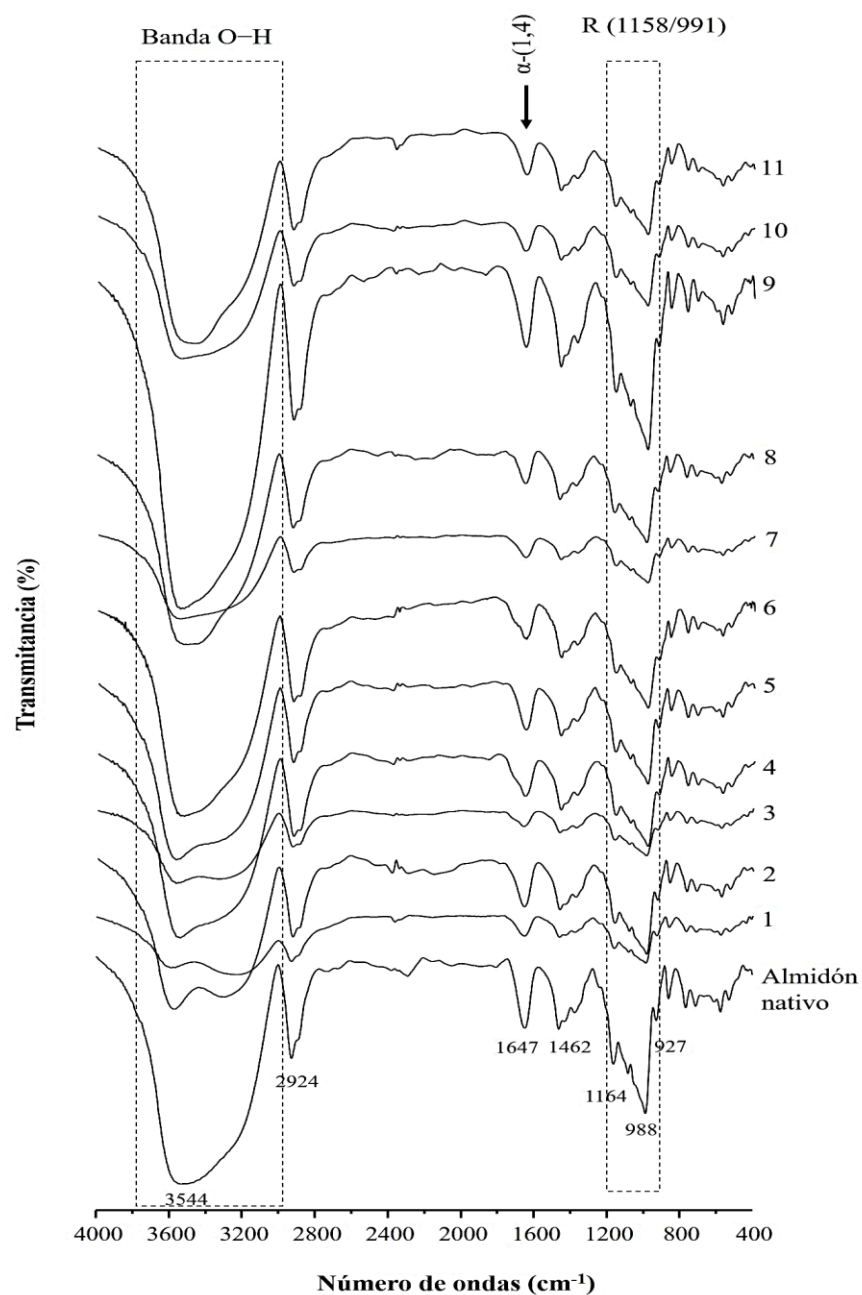


Figure 6. Espectros infrarrojos de las pirodextrinas y del almidón de ñame nativo.

Modificado de Fuchs (2018).

Los espectros FTIR de las pirodextrinas no revelaron ninguna banda nueva a 1735 cm^{-1} (Fuchs, 2018), asignada a las vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo presentes en bajas concentraciones, y que serían los responsables del color de las pirodextrinas, como reportaron Le Thanh-Blicharz y col. (2016). Sin embargo, según estos autores, para evidenciar esta banda en los espectros de las pirodextrinas se deben extraer estos compuestos con un solvente orgánico (cloroformo o metanol).

La producción de pirodextrinas dio como resultado modificaciones físicas en la región de $800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ (Fuchs, 2018). Las bandas entre $1159\text{--}1083\text{ cm}^{-1}$ y 991 cm^{-1} están asociadas a la estructura ordenada y amorfa del almidón, respectivamente (Van Soest y col., 1995) y el radio $1158/991\text{ cm}^{-1}$ (R) se relaciona linealmente con el grado de orden en las capas externas del gránulo (Sevenou y col., 2002). Los valores de R para las pirodextrinas fueron menores que para el almidón nativo ($1,08\text{--}1,26$ versus $1,58$), lo que indica una disminución en el ordenamiento de los polímeros, sin embargo, no se encontraron grandes diferencias entre las pirodextrinas (Fuchs, 2018). Por su parte, en el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido no fue detectada la presencia de un pico endotérmico entre $70\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (datos no mostrados), con la excepción de la Pir-5 (Fuchs, 2018), lo que confirma la desorganización y la degradación de los polímeros (amilosa y amilopectina).

Análisis estructural por ^1H -RMN

La Figura 7 muestra la comparación de los espectros ^1H -RMN de las pirodextrinas en la región de $4,0$ a $5,6\text{ ppm}$. De acuerdo a los datos publicados de los desplazamientos químicos del ^1H en la región de $4,4\text{--}5,5\text{ ppm}$ (resonancias de los protones anoméricos) (Bai y Shi, 2016; Han y col., 2018; Luo y col., 2019), las señales a $5,32$ y $4,97\text{ ppm}$ corresponden

a los enlaces glucosídicos internos α -(1,4) y α -(1,6), respectivamente. Para todas las pirodextrinas, las señales a 5,47; 5,23; 5,14; 4,65 y 4,52 ppm, corresponden respectivamente a: el residuo 1,6-anhidro- β -D-glucopiranosilo (levoglucosano), el extremo α -reductor, α -(1,2), β -(1,2) y β -(1,6). Las señales del extremo β -reductor y del β -(1,4) aun cuando fueron observadas entre 4,6–4,7 ppm, no fueron asignadas debido a su baja intensidad y resolución.

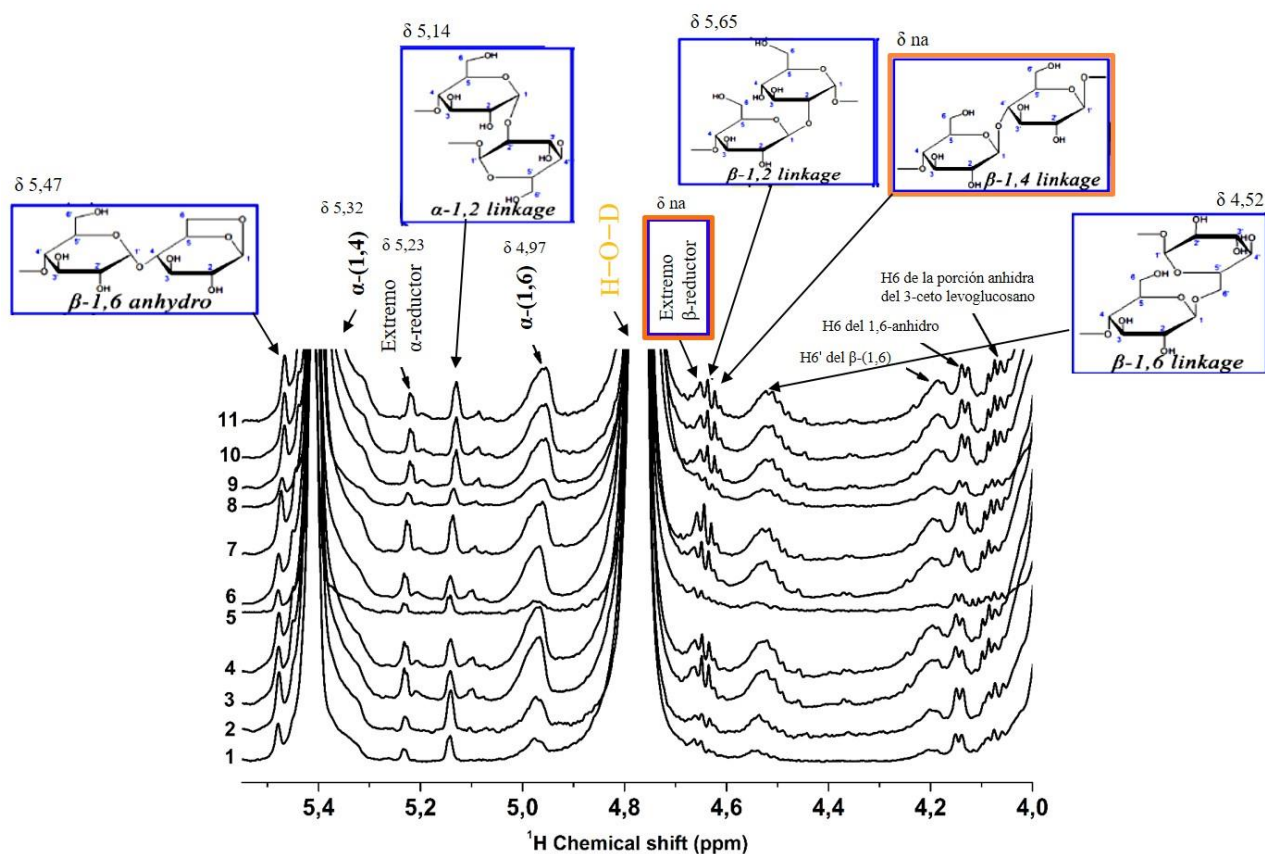


Figure 7. Espectros de ^1H -RMN de las pirodextrinas en la región de 4,0 a 5,6 ppm.

El análisis de los espectros de ^1H -RMN de las Pir-1 y Pir-5 mostró una reducción en la intensidad de las señales tanto de los enlaces α -(1,4) y α -(1,6), como en los enlaces no amiláceos α -(1,2), β -(1,2), β -(1,4) y β -(1,6). Mientras que, en los tratamientos más severos (Pir-3, Pir-4, Pir-6, Pir-8 y Pir-9–11) la señal de los enlaces no amiláceos fue de mayor intensidad, con la excepción de la Pir-8 (Fig. 7, Apéndice 4). Las Pir-2 y Pir-7 preparadas

bajo condiciones diferentes (Tabla 1 y Fig. 3), generaron pirodextrinas con ~ 67 % de AD (30 % de reducción en la digestibilidad), sin embargo, los espectros ^1H -RMN sugieren dos patrones de enlaces glucosídicos también diferentes, pero que tienen en común la mayor intensidad de la señal de resonancia a 5,14, que corresponde al enlace α -(1,2).

Los espectros de ^1H -RMN de las Pir-5 y Pir-8 fueron similares, con la reducción de la intensidad de las señales de los enlaces típicos y atípicos del almidón. Las Pir-5 y Pir-8 fueron producidas con la menor concentración final de ácido y con el mayor tiempo de incubación (Tabla 1 y Fig. 3), respectivamente, y presentaron contenidos de AD significativamente diferentes (Tabla 3). Interesantemente, estos resultados sugieren que condiciones de piroconversión distintas pueden producir patrones de enlaces glucosídicos similares, lo que indica que otros factores pudieran estar influyendo en la digestibilidad *in vitro* de estas pirodextrinas. Las uniones glucosídicas atípicas, tales como α -(1,2), β -(1,2), β -(1,4) y β -(1,6) han sido previamente reportadas (Okuma y Matsuda, 2002; Laurentin, 2004; Bai y Shi, 2016; Han y col. 2018; Luo y col., 2019) y la indigestibilidad de las pirodextrinas ha sido principalmente atribuida a la formación de estos enlaces durante las reacciones de transglucosidación (Siljeström y col., 1989), porque el contenido de almidón retrogradado es muy bajo tanto en el almidón nativo como en las muestras pirodextrinizadas (Laurentin y col., 2003). Sin embargo, una mayor despolimerización de las moléculas (Tabla 4); un aumento de los puntos de ramificación α -(1,6) y β -(1,6) (Fig. 7) y una mayor presencia de compuestos coloridos formados durante la degradación térmica del almidón (Fig. 3) —efectos promovidos con tiempos prolongados de calentamiento—, podrían en conjunto contribuir con la mayor reducción de la digestibilidad en la Pir-8 con respecto a la Pir-5 (52 % versus 11 %).

VII. Conclusiones

- El uso de 1,82 g de HCl/kg de almidón y ~ 5 horas de calentamiento a 140 °C fue apropiado para preparar una pirodextrina amarilla (Pir-8) con baja digestibilidad *in vitro* y propiedades fisicoquímicas similares a las pirodextrinas comerciales de almidón de papa.
- La concentración final de ácido y el tiempo de incubación afectaron negativamente el contenido de AD y positivamente el índice ΔE .
- La piroconversión del almidón de ñame brasileiro resultó en una disminución del 30–54 % del contenido de AD, con cambios en sus propiedades fisicoquímicas.
- La piroconversión no ocasionó mayores cambios morfológicos a nivel de la estructura granular del almidón.
- Las pirodextrinas resultaron ser mezclas de derivados del almidón con masas moleculares promedio entre 36–332 kDa.
- Los análisis estructurales mostraron una reducción significativa de los enlaces α -(1,4), con la presencia de enlaces atípicos como α -(1,2), β -(1,2), β -(1,4) y β -(1,6) y una pérdida del grado de orden en las capas externas del gránulo.

VIII. Consideraciones finales

Dilucidar la estructura química de las pirodextrinas es importante para establecer la relación estructura-función de los almidones pirodextrinizados y explicar así, no solo su digestibilidad sino sus posibles efectos fisiológicos como fibras alimentarias. En este sentido, sobre el proceso de piroconversión del almidón de ñame brasileiro, la evidencia experimental encontrada sugiere lo siguiente: 1) un efecto de las reacciones de hidrólisis con la reducción de los enlaces α -(1,4), del tamaño molecular y el consecuente aumento del valor de ED% en las etapas iniciales de la piroconversión; 2) un efecto de las reacciones de transglucosidación con el aumento de los enlaces no amiláceos α -(1,2), β -(1,2), β -(1,4), β -(1,6) y el 1,6-anhidro- β -D-glucopiranosilo, formados cuando los nuevos extremos reductores activados (catión glucosilo) reaccionan con los grupos hidroxilos de cadenas adyacentes o por deshidratación intramolecular del catión glucosilo; además de un aumento de los puntos de ramificación principalmente α -(1,6) y β -(1,6), lo que se asocia directamente con una disminución de la digestibilidad (aumento de las fracciones resistentes debido a impedimentos estéricos) y una mayor estabilidad térmica del polímero, y 3) un efecto general sobre la estructura supramolecular, aparentemente similar a los gránulos nativos pero latentemente frágil a nivel interno por disminución del grado de orden en las capas externas, lo que hace que los gránulos piroconvertidos (“fantasmas”) sean rápidamente susceptibles a la desintegración en agua a temperatura ambiente. El resultado final de la piroconversión es una pirodextrina altamente soluble (> 95 % a 25 °C), de baja o nula viscosidad en solución, con una coloración amarilla y una disminución de 30–54 % en su digestibilidad *in vitro*, lo que puede usarse como una fibra alimentaria soluble, cuyos efectos fisiológicos y potenciales aplicaciones industriales deben ser estudiadas.

IX. Bibliografía

- AACC. 2001. AACC International (2003). Approved methods of analysis, 11th ed., AACC International; St Paul, MN.
- Amani, N. G. G., Buleon, A., Kamenan, A., y Colonna, P. (2004). Variability in starch physicochemical and functional properties of yam (*Dioscorea* sp.) cultivated in Ivory Coast. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 84, 2085–96.
- Amani, N. G. G., Kamenan, A., Rolland-Sabaté, A., y Colonna, P. (2005). Stability of yam starch gels during processing. *African Journal of Biotechnology*, 4, 94–101.
- Andrade, L. A., Barbosa, N. A., y Pereira, J. (2017). Extraction and properties of starches from the non-traditional vegetables yam and taro. *Polímeros*, 27, 151–157.
- Asp, N. G. (1992). Resistant starch. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S1.
- Bai, Y., y Shi, Y.-C. (2016). Chemical structures in pyrodextrin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 151, 426–433.
- Barczyńska, R., Śliżewska, K., Libudzisz, Z., Kapuśniak, K., y Kapuśniak, J. (2015). Prebiotic properties of potato starch dextrins. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 69, 1031–1041.
- Campechano-Carrera, E., Corona-Cruz, A., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. (2007). Effect of pyrodextrinization on available starch content of lima bean (*Phaseolus lunatus*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) starches. *Food Hydrocolloid*, 21, 472–479.
- Commission Directive 2000/63/EC amending Directive 96/77/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colors and sweeteners. *Official Journal of the European Communities* L 277, 43, 1–61. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2000:277:TOC>. Acceso: 26 de junio de 2019.
- FAO (2001). Modified starches. In: Compendium of Food Additive Specifications. Addendum 9. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 57th session, Rome. FAO Food and Nutrition Paper - 52 Add. 9.

- Fuchs, M. C. L. (2018). Pirodextrinização do amido de inhame brasileiro (*Dioscorea* sp.) e caracterização físico-química das dextrinas resistentes. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará.
- Germec, M., Ozcan, A., y Turhan, I. (2019). Bioconversion of wheat bran into high value-added products and modelling of fermentations. *Industrial Crops and Products*, 139, 111565.
- Han, X., Kang, J., Bai, Y., Xue, M., y Shi, Y. C. (2018). Structure of pyrodextrin in relation to its retrogradation properties. *Food chemistry*, 242, 169–173.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., y Asp, N.-G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch-Stärke*, 38, 224–226.
- Hostettler, F., Borel, E., y Deuel, H. (1951). Über die reduktion der 3,5-dinitrosalicylsäure durch Zucker [About the reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid by sugars]. *Helvetica Chimica Acta*, 34, 2132–2139.
- ISO 6647-1 (2007). International Organization for Standardization. Rice -- Determination of amylose content -- Part 1: Reference method.
- Jiang, Q., Gao, W., Li, X., Xia, Y., Wang, H., Wu, S., Huang, L., Liu, C., y Xiao, P. (2012). Characterizations of starches isolated from five different *Dioscorea* L. species. *Food Hydrocolloids*, 29, 35–41.
- Kapuśniak, K., y Nebesny, E. (2017). Enzyme-resistant dextrans from potato starch for potential application in the beverage industry. *Carbohydrate Polymers*, 172, 152–158.
- Laurentin, A. (2004). Starch pyrodextrans: in vitro fermentation and physiological effects. PhD thesis. Glasgow University.
- Laurentin, A., Cárdenas, M., Ruales, J., Pérez, E., y Tovar, J. (2003). Preparation of indigestible pyrodextrans from different starch sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5510–5515.
- Laurentin, A., y Edwards, C. A. (2004). Differential fermentation of glucose based carbohydrates in vitro by human faecal bacteria: a study of pyrodextrinised starches from different sources. *European Journal of Nutrition*, 43, 183–189.

- Laurentin A., y Edwards C.A. (2013). Fiber: Resistant Starch and Oligosaccharides. In: B. Caballero (ed.). **Encyclopedia of Human Nutrition**, third edition (Vol. 2, pp. 246–253). Waltham, MA: Academic Press.
- Lefranc-Millot, C. (2008). NUTRIOSE® 06: a useful soluble dietary fiber for added nutritional value. *Nutrition Bulletin*, 33, 234–239.
- Le Thanh-Blicharz, J., Blaszcak, W., Szwengiel, A., Pauksza, D., y Lewandowicz, G. (2016). Molecular and supermolecular structure of commercial pyrodextrins. *Journal of Food Science*, 81, 2135–2142.
- Le Thanh-Blicharz, J., Sip, A., Malcher, A., Prochaska, K., y Lewandowicz, G. (2015). The effect of surface activity of pyrodextrins on their assimilability by selected strains of bacteria from genus *Lactobacillus*. *Starch-Stärke*, 67, 267–75.
- Lin, C.-L., Lin, J.-H., Zeng, H.-M., Wu, Y.-H., y Chang, Y.-H. (2018). Indigestible pyrodextrins prepared from corn starch in the presence of glacial acetic acid. *Carbohydrate Polymers*, 188, 68–75.
- Lockyer, A., Spiro, S., y Stanner, S. (2016). Dietary fiber and the prevention of chronic disease—should health professionals be doing more to raise awareness? *Nutrition Bulletin*, 41, 214–231.
- Lovera, M., Pérez, E., y Laurentin, A. (2017). Digestibility of starches isolated from stem and root tubers of arracacha, cassava, cush-cush yam, potato and taro. *Carbohydrate Polymers*, 176, 50–55.
- Lovera, M., de Castro, G. M. C., da Rocha Pires, N., Bastos, M. D. S. R., Araújo, M. L. H., Laurentin, A., Moreira, R.A. y de Oliveira, H. D. (2020). Pyrodextrinization of yam (*Dioscorea* sp.) starch isolated from tubers grown in Brazil and physicochemical characterization of yellow pyrodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 116382.
- Luo, S. Z., Wu, X. Z., Xu, P. L., Pan, L. H., Zheng, Z., Cao, L. L., Zhao, Y. Y. y Jiang, S. T. (2019). Enzyme-resistant dextrin from Chinese yam starch for potential application in beverage industry: preparation, physicochemical properties and in vitro digestion. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 17, 140–147.
- Noordin, M. Y., Venkatesh, V. C., Sharif, S., Elting, S., y Abdullah, A. (2004). Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel. *Journal of Materials Processing Technology*, 145, 46–58.

- Nwokocha, L. M., y Williams, P. A. (2011). Comparative study of physicochemical properties of breadfruit (*Artocarpus altilis*) and white yam starches. *Carbohydrate Polymers*, 85, 294–302.
- Ohkuma, K., Hanno, Y., Inada, K., Matsuda, I., y Katta, Y. (1997). Indigestible dextrin, U.S. Patent 5.620.873.
- Ohkuma, K., y Wakabayashi, S. (2001). Fibersol-2: A soluble, non-digestible, starch-derived dietary fiber. In McCleary, B. V. and Prosky, L. (Eds.), **Advanced Dietary Fiber Technology** (pp. 509–523). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Okuma, K., y Matsuda, I. (2002). Indigestible fraction of starch hydrolysates and their determination method. *Journal of Applied Glycoscience*, 49, 479–85.
- Otegbayo, B., Oguniyan, D., y Akinwumi, O. (2014). Physicochemical and functional characterization of yam starch for potential industrial applications. *Starch-Stärke*, 66, 235–250.
- Pérez, E., Gilbert, O., Rolland-Sabaté, A., Jimenéz, Y., Sánchez, T., Giraldo, A., Pontoire, B., Guilois, S., Lahon, M.-C., Reynes, M., y Dufour, D. (2011). Physicochemical, functional and macromolecular properties of waxy yam starches discovered from “Mapuey” (*Dioscorea trifida*) genotypes in the Venezuelan Amazon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 263–273.
- Raigond, P., Ezekiel R., y Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1968–1978.
- Riley, C. K., Bahado-Singh, P. S., Wheatley, A. O. B., y Asemota, H. N. (2014). Physicochemical properties of low-amylose yam (*Dioscorea* spp.) starches and its impact on α -amylase degradation in vitro. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3, 448–454.
- Riley, C. K., Wheatley, A. O., y Asemota, H. N. (2006). Isolation and characterization of starches from eight *Dioscorea alata* cultivars grown in Jamaica. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1528–36.
- Rolland-Sabaté, A., Amani, N. G., Dufour, D., Guilois, S., y Colonna, P. (2003). Macromolecular characteristics of ten yam (*Dioscorea* spp.) starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 927–936.

- Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A., y Mitchell, J. R. (2002). Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 79–85.
- Siljeström, M., Björck, I., y Westerlund, E. (1989). Transglycosidation reactions following heat treatment of starch—effects on enzymic digestibility. *Starch-Stärke*, 41, 95–100.
- Siqueira, M. V. B. M. (2011). Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. *Horticultura Brasileira*, 29, 16–20.
- Stasiak, M., Rusinek, R., Molenda, M., Fornal, J., y Błaszczak, W. (2011). Effect of potato starch modification on mechanical parameters and granules morphology. *Journal of Food Engineering*, 102, 154–62.
- Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and properties of commercial native starches. *Starch-Stärke*, 37, 1–5.
- Terpstra, K. R., Woortman, A. J., y Hopman, J. C. (2010). Yellow dextrins: Evaluating changes in structure and colour during processing. *Starch-Stärke*, 62, 449–457.
- Trithavisup, K., Krusong, K., y Tananuwong, K. (2019). In-depth study of the changes in properties and molecular structure of cassava starch during resistant dextrin preparation. *Food Chemistry*, 297, 124996.
- Van Soest, J. J., Tournois, H., de Wit, D., y Vliegenthart, J. F. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 279, 201–214.
- Wurzburg, O. B. (1986). Converted starches. In O. B. Wurzburg (Ed.). **Modified starches: Properties and uses** (pp. 17–40). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Zhang, J., Chen, F., Liu, F., y Wang, Z. W. (2010). Study on structural changes of microwave heat-moisture treated resistant *Canna edulis* Ker starch during digestion in vitro. *Food Hydrocolloids*, 24, 27–34.
- Zheng, Y., Wang, Q., Li, B., Lin, L., Tundis, R., Loizzo, M. R., y Xiao, J. (2016). Characterization and prebiotic effect of the resistant starch from purple sweet potato. *Molecules*, 21, 932.
- Zhu, F. (2015). Isolation, composition, structure, properties, modifications, and uses of yam starch. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 357–386.

X. Apéndice

Apéndice 1. Significancia del modelo de regresión (valores F) y los efectos de las variables independientes sobre el contenido de AD de los almidones pirodextrinizados.¹

Fuente de variación	SC	GL	MC	F	p -valor
<i>Lineal</i>					
X_1 (HCl)	2241,86	1	2241,86	408,11	0,0024*
X_2 (Tiempo de incubación)	414,67	1	414,67	75,48	0,0130*
<i>Interacción</i>					
$X_1 X_2$	197,40	1	197,40	35,93	0,0267*
<i>Cuadrático</i>					
X_1^2	259,32	1	259,32	47,21	0,0205*
X_2^2	41,68	1	41,68	7,59	0,1104
Regresión (modelo)	3154,93	5	3154,93	358,16	—
Error residual	44,04	5	8,81	—	—
Falta de ajuste	33,06	3	11,02	2,00	0,3498
Error puro	10,99	2	5,49	—	—
Total SC	3160,68	10	—	—	—
$R^2 = 0,9861$					
Adj- $R^2 = 0,9721$					
Valor de presición adecuado: 23,1					

¹AD, almidón disponible; SC, Suma de cuadrados; GL, Grados de libertad; MC, Medias de cuadrados. * Factores significativos ($p < 0,05$).

Apéndice 2. Significancia del modelo de regresión (valores F) y los efectos de las variables independientes sobre el índice ΔE de los almidones pirodextrinizados.¹

Fuente de variación	SC	GL	MC	F	p-valor
<i>Lineal</i>					
X_1 (HCl)	2136,98	1	2136,98	14909,17	<0,0001*
X_2 (Tiempo de incubación)	5,01	1	5,01	34,98	0,0274*
<i>Interacción</i>					
$X_1 X_2$	4,00	1	4,00	27,91	0,0340*
<i>Cuadrático</i>					
X_1^2	2,75	1	2,75	19,16	0,0484*
X_2^2	12,81	1	12,81	89,40	0,0110*
Regresión (modelo)	2161,55	5	2161,55	217,79	—
Error residual	49,63	5	9,92	—	—
Falta de ajuste	49,34	3	16,45	114,74	0,0086*
Error puro	0,287	2	0,143	—	—
Total SC	2216,41	10	2216,41	—	—
$R^2 = 0,9776$					
Adj- $R^2 = 0,9552$					
Valor de presición adecuado: 18,7					

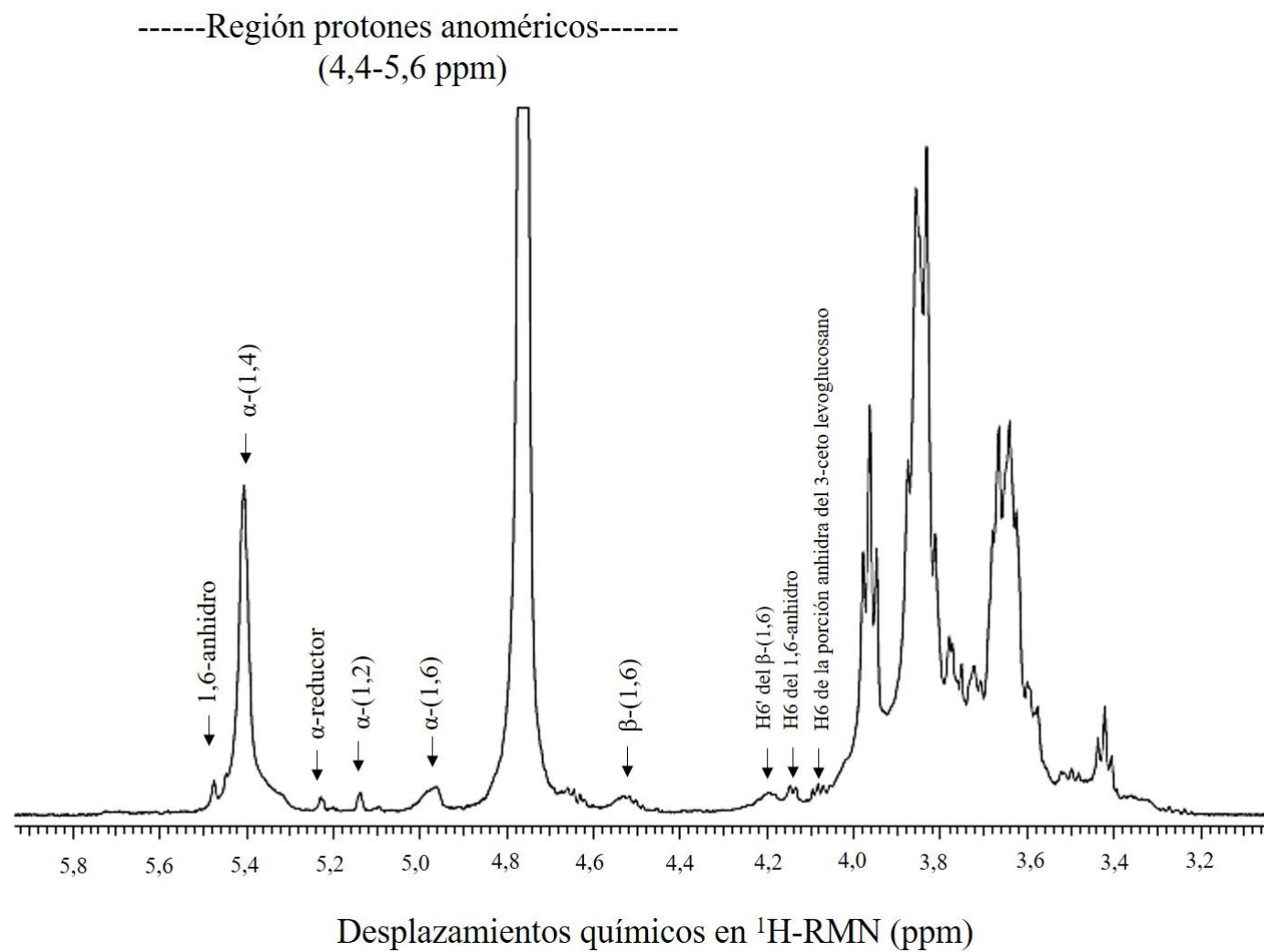
¹ ΔE , diferencia de color; SC, Suma de cuadrados; GL, Grados de libertad; MC, Medias de cuadrados. * Factores significativos ($p < 0,05$).

Apéndice 3. Significancia del modelo de regresión (valores F) y los efectos de las variables independientes sobre el valor de ED de los almidones pirodextrinizados.¹

Fuente de variación	SC	GL	MC	F	p-valor
<i>Lineal</i>					
X_1 (HCl)	35,46	1	35,46	2659,91	0,0004*
X_2 (Tiempo de incubación)	0,030	1	0,030	2,24	0,2735
<i>Cuadrático</i>					
X_1^2	7,14	1	7,14	535,84	0,0019*
X_2^2	0,034	1	0,034	2,56	0,2505
Regresión (modelo)	42,67	4	42,67	265,14	—
Error residual	0,966	6	0,161	—	—
Falta de ajuste	0,939	4	0,235	17,61	0,0545
Error puro	0,027	2	0,013	—	—
Total SC	44,62	10	—	—	—
$R^2 = 0.9784$					
Adj- $R^2 = 0.9639$					
Valor de presición adecuado: 23,4					

¹ED, equivalentes de dextrosa; SC, Suma de cuadrados; GL, Grados de libertad; MC,

Medias de cuadrados. * Factores significativos ($p < 0,05$)



Apéndice 4. Espectro de ^1H -RMN (a 25 °C) de la Pir-8 en la región de 3,2 a 5,8 ppm.

XI. Publicaciones

Este trabajo ha rendido y generará los principales productos científicos:

1. **Fuchs, M. C. L.** (2018). Pirodextrinização do amido de inhame brasileiro (*Dioscorea* sp.) e caracterização físico-química das dextrinas resistentes. Dissertação do Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Brasil. Pós-graduação em Bioquímica.
2. **Lovera, M.,** de Castro, G. M. C., da Rocha Pires, N., Bastos, M. D. S. R., Araújo, M. L. H., Laurentin, A., Moreira, R.A. y de Oliveira, H. D. (2020). Pyrodextrinization of yam (*Dioscorea* sp.) starch isolated from tubers grown in Brazil and physicochemical characterization of yellow pyrodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 116382.
3. **Lovera, M.,** Silva, L. M. A., Vidal, C. S., Mendes, F. R. S., Sombra, V. G., Bastos, M. S. R., & Moreira, R. A. (2020). Molecular structure of pyrodextrins from Brazilian yam (*Dioscorea* sp.) starch. *Carbohydrate Polymers*, 0: 00-00 [en preparación].