



UNIVERSIDAD CENTRAL  
DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**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**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO  
Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela, por el bachiller  
Víctor Miguel Martín Granado  
como requisito parcial para optar  
por el título de Licenciado en  
Biología.

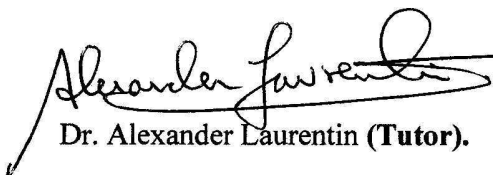
Tutor: Dr. Alexander Laurentin

CARACAS, VENEZUELA  
SEPTIEMBRE 2010

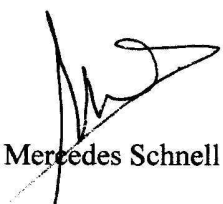
## ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del **Br. VÍCTOR MIGUEL MARTÍN GRANADO**, C.I.: 17.983.661, titulado **“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”**, para optar por el 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 diez días del mes de septiembre de dos mil diez.



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 15/09/2010, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **Martín G. Víctor M.** titular de la cédula de identidad No. 17.983.661; titulado: "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.", 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 veintinueve días del mes de septiembre del año dos mil diez.

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



GA/br.-

Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Polisacáridos Vegetales** y en el **Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo**, ambos del Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela; bajo la supervisión del profesor Alexander Laurentin.

## Resumen

El almidón es un polisacárido de origen vegetal y representa una fuente de alimento importante en animales. Los estudios de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* del almidón han sido de interés al evaluar aspectos relacionados con su biodisponibilidad. En Venezuela, el plátano se presenta como fuente alternativa de almidón dada su importancia tanto a nivel agronómico como de consumo por parte de la población. En este estudio, se evaluó la digestibilidad de almidones de plátano, variedades: hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012; utilizando almidón de maíz como referencia.

La digestibilidad *in vitro* fue analizada mediante la determinación de los parámetros: almidón potencialmente disponible, almidón resistente total y tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*, mientras que la digestibilidad *in vivo* de los almidones de plátano fue evaluada mediante el uso del bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.).

Se encontró que todos los almidones de plátano poseen un 93 – 99% de almidón potencialmente disponible, a excepción de la variedad HH-12 (82%). El contenido de almidón resistente total se encontró entre 55 y 64% para todas las variedades; de las cuales hartón común y topocho cenizo presentaron los mayores niveles, mientras que cambur 012 y cambur negro, presentaron los menores. En cuanto a la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*, se encontró que todos los almidones crudos de plátano poseen velocidades iniciales menores que 2%, las cuales aumentaron cuando fueron gelatinizados (56 – 61%). Las magnitudes finales de hidrólisis de los almidones crudos fueron menores a 4%, y aumentaron al gelatinizarlos (71 – 81%).

Los biomarcadores supervivencia, variación de peso, agua corporal, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y excreción de ácido úrico, no mostraron diferencias relacionadas con la digestibilidad *in vitro* de los almidones. No obstante, los biomarcadores grasa corporal y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, presentaron diferencias que correlacionaron con el contenido de almidón resistente presente en los almidones. A partir de los análisis de correlación realizados, se encontró que el almidón resistente total, fue el mejor estimador de las respuestas encontradas *in vivo*; correlacionándose negativamente con la grasa corporal ( $R^2 = 0,43$ ;  $p = 0,008$ ) y positivamente con la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa ( $R^2 = 0,33$ ;  $p = 0,03$ ).

En cuanto a la digestibilidad *in vivo* de los almidones de plátano, las variedades hartón común y HH-12 fueron los menos biodisponibles, mientras que el almidón de cambur 012 presentó la mayor biodisponibilidad y no presentó diferencias significativas con respecto al almidón de maíz (considerado de alta biodisponibilidad). Los almidones de plátano de las variedades cambur negro y topocho cenizo presentaron una biodisponibilidad intermedia.

En base a los resultados encontrados en este estudio, los almidones crudos de plátano se perfilan como buenas fuentes de almidón para la formulación de alimentos dirigidos a consumidores con necesidades nutricionales especiales, tales como personas diabéticas y obesas. Además, los biomarcadores grasa corporal y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, del bioensayo del gorgojo de arroz, resultaron ser útiles y eficaces en la caracterización de la digestibilidad *in vivo* de almidones de plátano.

## **Dedicatoria**

A mi madre:  
Angela.

A mi abuela:  
Fina.

A mi tía:  
Sori.

A mi hermana:  
Stephanie.

Les dedico este trabajo con el mismo afecto que me han brindado a lo largo de mi vida. Sin ustedes mi mundo estaría sumergido en un vórtice de caos y oscuridad. Las amo.

## Agradecimientos

A Dios, a la Virgen María y al Ángel de mi Guarda.

A mi familia:

Mamá, abuela Fina, tía Sori, Stephanie, Papá, Víctor Andrés, Víctor Alejandro,  
abuela Yoya y abuelo Carmelo.

A mi novia:

Marianny.

A mi tutor:

Alexander.

A las profesoras y compañeras de laboratorio:

Ana, Meris y Mighay.

A los jurados:

Mercedes, Elevina y Zurima.

Gracias a todos por haber ayudado de manera directa o indirecta en la elaboración y optimización de este trabajo. Sin su ayuda nunca lo hubiera logrado.

# Índice de Contenido

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                           | <b>1</b>  |
| <b>ANTECEDENTES .....</b>                                          | <b>5</b>  |
| <b>Aspectos generales del almidón .....</b>                        | <b>5</b>  |
| <b>Biodisponibilidad del almidón .....</b>                         | <b>9</b>  |
| Almidón resistente .....                                           | 11        |
| Almidón físicamente inaccesible (AR <sub>1</sub> ) .....           | 13        |
| Gránulos resistentes (AR <sub>2</sub> ) .....                      | 13        |
| Almidón retrogradado (AR <sub>3</sub> ) .....                      | 13        |
| Almidón modificado químicamente (AR <sub>4</sub> ) .....           | 14        |
| Otras fuentes de almidón resistente .....                          | 14        |
| Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del almidón ..... | 16        |
| <b>Características de las fuentes de almidón.....</b>              | <b>17</b> |
| <b>Bioensayo del gorgojo de arroz .....</b>                        | <b>19</b> |
| <b>Estudios de digestibilidad de almidones de plátano .....</b>    | <b>20</b> |
| <b>OBJETIVOS .....</b>                                             | <b>25</b> |
| Objetivo general.....                                              | 25        |
| Objetivos específicos.....                                         | 25        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                  | <b>26</b> |
| Muestras .....                                                     | 26        |
| Digestibilidad <i>in vitro</i> de almidones .....                  | 26        |
| Almidón potencialmente disponible .....                            | 27        |
| Almidón resistente total.....                                      | 28        |
| Tasa de $\alpha$ -amilólisis <i>in vitro</i> .....                 | 30        |
| Digestibilidad <i>in vivo</i> de almidones .....                   | 32        |
| Preparación de las dietas de almidones .....                       | 33        |
| Bioensayo del gorgojo de arroz .....                               | 33        |
| Determinación de la supervivencia.....                             | 34        |
| Determinación de la variación de peso.....                         | 34        |
| Determinación de la actividad similar a $\alpha$ -amilasa.....     | 35        |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Determinación de la composición corporal .....                                      | 36        |
| Contenido de agua corporal.....                                                     | 36        |
| Contenido de grasa corporal .....                                                   | 37        |
| Contenido de nitrógeno proteico y de nitrógeno cuticular .....                      | 38        |
| Excreción de ácido úrico .....                                                      | 39        |
| <b>Contenido de proteína en los almidones estudiados .....</b>                      | <b>41</b> |
| <b>Análisis estadístico .....</b>                                                   | <b>42</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                                 | <b>43</b> |
| <b>Digestibilidad <i>in vitro</i> de almidones .....</b>                            | <b>43</b> |
| Almidón potencialmente disponible .....                                             | 43        |
| Almidón resistente total.....                                                       | 45        |
| Tasa de $\alpha$ -amilólisis <i>in vitro</i> .....                                  | 47        |
| <b>Digestibilidad <i>in vivo</i> de almidones .....</b>                             | <b>51</b> |
| Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de plátano.....     | 51        |
| Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de plátano..... | 55        |
| Cambios en la composición corporal.....                                             | 59        |
| Agua corporal .....                                                                 | 62        |
| Grasa corporal.....                                                                 | 63        |
| Nitrógeno proteico .....                                                            | 67        |
| Nitrógeno cuticular .....                                                           | 69        |
| Actividad similar a $\alpha$ -amilasa .....                                         | 70        |
| Excreción de ácido úrico .....                                                      | 74        |
| <b>Consideraciones finales y perspectivas futuras .....</b>                         | <b>78</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>                                                           | <b>82</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                             | <b>84</b> |

## Índice de Tablas

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla I. Clasificación nutricional del almidón. ....                                                                                                                | 12 |
| Tabla II. Propiedades fisiológicas de los ácidos grasos de cadena corta.....                                                                                        | 16 |
| Tabla III. Contenido de almidón potencialmente disponible y almidón resistente total de los almidones de las diferentes variedades de plátano.....                  | 44 |
| Tabla IV. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de $\alpha$ -amilólisis in vitro de los almidones de plátano.....                                           | 51 |
| Tabla V. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo, de referencia y de almidones de plátano. .... | 60 |
| Tabla VI. Cociente ayuno/alimentado para el bioensayo del gorgojo de arroz. ....                                                                                    | 61 |
| Tabla VII. Contenido de humedad del almidón de referencia y de los almidones de plátano.....                                                                        | 63 |
| Tabla VIII. Contenido de proteínas del almidón de referencia y de los almidones de plátano. ....                                                                    | 65 |
| Tabla IX. Actividad similar a $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y los almidones de plátano. ....                       | 71 |
| Tabla X. Excreción de ácido úrico en el gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles, de referencia y los almidones de plátano. ....                        | 76 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Molécula de amilosa. ....                                                                                                                                                        | 5  |
| Figura 2. Molécula de amilopectina.....                                                                                                                                                    | 6  |
| Figura 3. Esquema metodológico utilizado en el análisis de la digestibilidad in vivo de los almidones. ....                                                                                | 32 |
| Figura 4. Tasa de $\alpha$ -amilólisis in vitro de los almidones de plátano. ....                                                                                                          | 50 |
| Figura 5. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo. ..                                                                                         | 53 |
| Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de almidones de plátano.....                                                               | 54 |
| Figura 7. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo. ....                                                                                   | 56 |
| Figura 8. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y los almidones de plátano.....                                                                     | 58 |
| Figura 9. Gráficos de dispersión entre el biomarcador grasa corporal y los parámetros de digestibilidad in vitro del almidón y su contenido de proteína cruda. ....                        | 66 |
| Figura 10. Gráficos de dispersión entre el biomarcador actividad similar a $\alpha$ -amilasa y los parámetros de digestibilidad in vitro del almidón y su contenido de proteína cruda..... | 73 |
| Figura 11. Gráficos de dispersión entre el biomarcador excreción de ácido úrico y los parámetros de digestibilidad in vitro del almidón y su contenido de proteína cruda. ....             | 77 |

## Introducción

El almidón es la sustancia de reserva de las plantas y se encuentra en grandes cantidades en cereales, leguminosas, raíces y tubérculos (Spoehr y Milner, 1935). Los factores que han hecho al almidón un material de reserva ideal en plantas también lo han convertido en un atractivo alimento para los animales. Pocos nutrientes tienen un contenido de energía, por gramo, mayor que el almidón; siendo las grasas la principal excepción. Las proteínas tienen un contenido energético bastante alto, por gramo de material seco, pero en los alimentos usualmente se encuentran altamente hidratadas. Además, el rendimiento energético se ve disminuido debido al requerimiento de energía para el metabolismo de los productos de digestión proteicos (French, 1973).

Existen diferentes estudios de digestibilidad *in vivo* de los almidones, realizados a partir de la década de 1980, como el llevado a cabo por Englyst y Cummings (1986), en los cuales se encontró que no todo el almidón que era suministrado, al organismo biológico utilizado como modelo, era digerido y absorbido; encontrándose, usualmente, parte de esta fracción resistente a la digestión, en las heces. En la década siguiente, se definió al almidón resistente a la digestión enzimática como la suma del almidón y los productos de su digestión que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992). Esta definición revolucionó la idea que existía a inicios de la década de 1980, ya que se pensaba que los almidones se digerían completamente en el intestino delgado.

En el mismo año de 1992 se realizó otro estudio que permitió clasificar al almidón resistente en tres grupos: almidón físicamente inaccesible, gránulos de almidón intrínsecamente resistentes y almidón retrogradado (Englyst y col., 1992). Además, se

realizaron estudios acerca de diferentes propiedades físicas y fisicoquímicas del almidón que podrían afectar su digestibilidad, como lo son el tamaño molecular, el patrón de arreglo cristalino de la molécula, la gelatinización y la retrogradación. (Gallant y col., 1992; Colonna y col., 1992).

En estudios más recientes, se ha propuesto un nuevo grupo de almidones resistentes (modificados químicamente), ya que a partir de ciertas modificaciones químicas del almidón se han preparado almidones modificados con cantidades de almidón resistente mayores a las de los respectivos almidones nativos (Tovar y col., 1992; Tovar, 1994; Laurentin, 1999; Tovar y col., 1999; Bello-Pérez y col., 2002). Además, existen otras fuentes de almidón resistente como lo son los almidones que han sido modificados mediante ciertos procesos físicos drásticos, como por ejemplo la pirodextrinización, en los cuales se han encontrado fracciones de almidón resistente mayores a las encontradas en los respectivos almidones nativos (Laurentin y col., 2003; Laurentin, 2004).

Existen evidencias sobre determinados efectos fisiológicos del almidón resistente que han sido considerados beneficiosos para el organismo. Estos efectos son producidos por los ácidos grasos de cadena corta generados por la fermentación del almidón resistente, por parte de la microflora del colon, a partir de las fracciones de almidón no digeridas ni absorbidas que llegan al intestino grueso (Bird y col., 2000; Topping y Clifton, 2001; Laurentin, 2004). Los efectos de los ácidos grasos de cadena corta, sumados a los efectos intrínsecos de menor digestibilidad del almidón resistente, han llevado a que alimentos con altos contenidos de estas fracciones sean considerados como alimentos funcionales (Niba, 2002). Además, podrían ser excelentes opciones en la formulación de dietas para personas con necesidades nutricionales especiales como diabéticos y obesos (Robertson y col., 2003; World Health Organization, 2003; Zhang y col., 2007).

En Venezuela, el plátano se presenta como una fuente alternativa de almidón dada su importancia tanto a nivel agronómico como de consumo por parte de la población (Silva, 2000). Por esta razón y las mencionadas anteriormente, es importante el análisis de la digestibilidad de almidones de diferentes variedades de esta fuente.

Existen estudios en los que se ha analizado la digestibilidad *in vitro* de diferentes almidones nativos y modificados de plátano, y de alimentos preparados con estos almidones; encontrándose en todos ellos, digestibilidades menores a las referencias utilizadas (almidones o preparaciones de maíz o trigo). Esta disminución en la digestibilidad *in vitro* ha sido atribuida a contenidos de almidón resistente mayores, o contenidos de almidón potencialmente disponible o tasas de hidrólisis enzimática menores, que los encontrados en las respectivas referencias (Silva, 2000; Bello-Pérez y col, 2004; Aparicio-Saguilán y col., 2005; Aparicio-Saguilán y col., 2007; Aparicio-Saguilán y col., 2008; Hernández y col., 2008; Osorio-Díaz y col., 2008; Rendon-Villalobos y col., 2008; Marín, 2009).

En estudios recientes, García (2003) y Galeno (2006) evaluaron la digestibilidad *in vivo* de diferentes almidones nativos y modificados (incluido el almidón de plátano) mediante la utilización del bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). En estos estudios se correlacionaron las respuestas observadas *in vivo* con diversos parámetros de digestibilidad *in vitro* como fueron el almidón potencialmente disponible, el almidón resistente total y la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*. Entre los resultados, se corroboró la menor digestibilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, del almidón nativo de plátano de la variedad hartón común, con respecto al almidón nativo de maíz. Además, se encontró que el almidón resistente total fue el parámetro que mejor predecía las respuestas observadas *in vivo* y que

los biomarcadores actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y excreción de ácido úrico fueron los que mejor caracterizaron la digestibilidad *in vivo* de estos almidones.

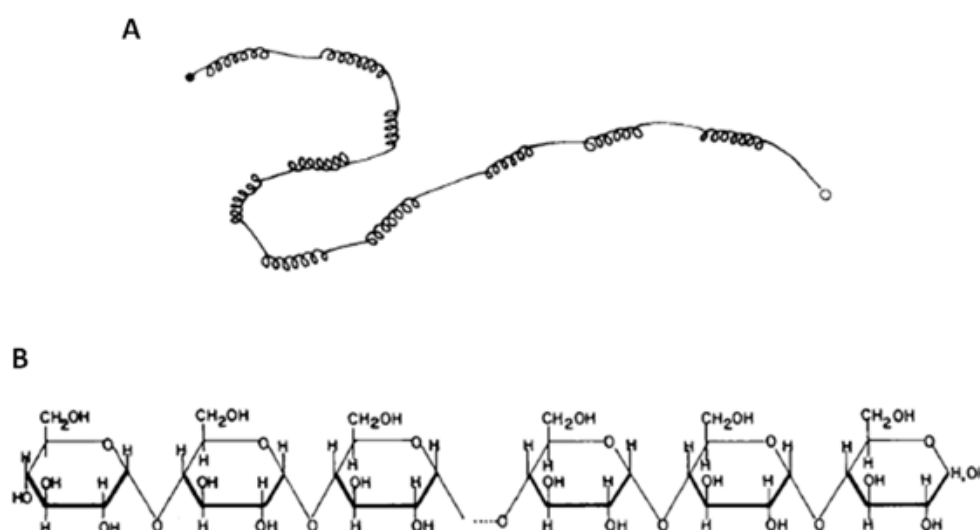
En base a todas las evidencias mencionadas anteriormente, en este trabajo se realizó el estudio de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de los almidones de cinco variedades de plátano, a saber: hartón común (AAB), cambur negro (AAA), topocho cenizo (ABB), HH-12 (AA) y cambur 012 (AAAA); utilizando el almidón de maíz como referencia. El análisis de digestibilidad *in vitro* se realizó determinando el almidón potencialmente disponible, el almidón resistente total y la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*, de cada almidón. El análisis de digestibilidad *in vivo* se realizó mediante la estimación de los biomarcadores supervivencia, variación de peso, composición corporal, actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y excreción de ácido úrico, del bioensayo del gorgojo de arroz. Además, se realizaron correlaciones entre los parámetros medidos a partir de ambas aproximaciones metodológicas con la finalidad de corroborar la validez de la utilización del bioensayo del gorgojo de arroz como método para la estimación de la biodisponibilidad de almidones de plátano.

## Antecedentes

### Aspectos generales del almidón

Desde el punto de vista químico, el almidón es un homopolisacárido compuesto por monómeros de  $\alpha$ -D-glucopiranososa y pertenece a la clase denominada glucanos (polímeros de glucosa). El almidón está principalmente compuesto por dos tipos de moléculas: la amilosa y la amilopectina (Krishnaswamy y Sreenivasan, 1948).

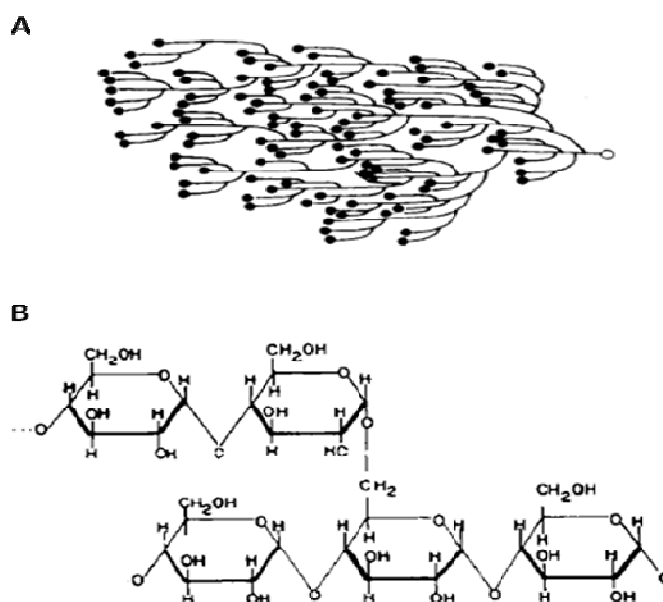
La amilosa (Figura 1) es un polímero esencialmente lineal, que tiene enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre los residuos de glucosa adyacentes (French, 1973). Su estructura primaria sencilla y regular permite que adquiera una conformación secundaria helicoidal. Esto es debido al ángulo que se crea, entre residuos adyacentes, mediante el enlace glucosídico  $\alpha(1\rightarrow4)$  (Gallant y col., 1992). La longitud de la molécula de amilosa es variable. En base a estudios de peso molecular se conoce que la cantidad de residuos de glucosa puede variar desde cientos hasta miles, en esta molécula (French, 1973).



**Figura 1. Molécula de amilosa.**

Modificado de French (1973) y Gallant y col. (1992). A. Representación esquemática.  
B. Estructura química.

La amilopectina (Figura 2) es un polímero ramificado que, además de poseer los enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  como la amilosa, tiene enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  aproximadamente cada 10-20 residuos que generan las ramificaciones mencionadas (French, 1973). La amilopectina posee un peso molecular mucho mayor al de la amilosa, pudiendo alcanzar órdenes de  $10^8$  (Nelson y Cox, 2004). Esta molécula parece estar compuesta por cadenas cortas (12-20 residuos), cadenas largas (40-45 residuos) y cadenas con un promedio de residuos mayor a 60 (Gallant y col., 1992).



**Figura 2. Molécula de amilopectina.**

Modificado de French (1973) y Gallant y col. (1992). A. Representación esquemática.  
B. Estructura química.

Los almidones contienen, generalmente, 15-20% de amilosa y 80-85% de amilopectina (Mayes y Bender, 2003); sin embargo, estas relaciones son variables y pueden

encontrarse almidones ricos en amilosa, así como también almidones compuestos principalmente por amilopectina (almidones “waxy”).

El almidón es almacenado en las plantas en forma de gránulos altamente condensados que tienden a adquirir una conformación macromolecular semi-cristalina; confiriéndoles un patrón de difracción de rayos X característico. Estos patrones se han diferenciado en tres grupos denotados como A, B y C.

El patrón del tipo A es exhibido por almidones de cereales como arroz, trigo y maíz. La unidad básica o celda unitaria de esta estructura cristalina contiene doce residuos de glucosa localizados en dos cadenas entrelazadas de forma paralela originando una doble hélice que gira en el sentido de las agujas del reloj. Cada doble hélice está rodeada por seis hélices vecinas y están empaquetadas de manera ortorrómbica, con la existencia de cuatro moléculas de agua entre las hélices. La estabilización de esta estructura se da por la formación de puentes de hidrógeno y a través de fuerza de van der Waals (Imberty y col., 1988, citado por Marín, 2009; Gallant y col., 1992).

El patrón del tipo B es encontrado en algunos almidones de tubérculos, raíces y maíz con alto contenido de amilosa (mayor que 40%), así como almidones retrogradados. La celda unitaria de esta estructura cristalina contiene doce residuos de glucosa localizados en dos cadenas entrelazadas de forma paralela originando una doble hélice que gira en el sentido de las agujas del reloj. Estas hélices se empaquetan de manera hexagonal, creando una cavidad que contiene agua (36 moléculas de agua en cada celda unitaria). La estructura cristalina está estabilizada por puentes de hidrógeno existentes entre las hélices dobles adyacentes (Imberty y Pérez, 1988, citado por Marín, 2009; Gallant y col., 1992).

El patrón del tipo C es encontrado en almidones de semillas y leguminosas. Este patrón presenta características de difracción comunes, tanto al patrón del tipo A como al

patrón del tipo B. Por esta razón, existen discrepancias en cuanto a la naturaleza cristalina del patrón del tipo C, ya que no se conoce con exactitud si este patrón corresponde a una estructura cristalina diferente de las que producen los patrones del tipo A o B, o si se debe a la presencia conjunta de estos patrones en el gránulo de almidón (Gallant y col., 1992). No obstante, en estudios más recientes se ha reforzado la teoría de que el patrón de difracción de rayos X del tipo C es producido por la presencia de arreglos cristalinos, correspondientes a los patrones A y B, en el gránulo de almidón (Buleón y col., 1997, citado por Marín, 2009).

Jane y col. (1997) (citado por Marín, 2009) exponen que los patrones de cristalinidad en los almidones dependen, además de la organización de la molécula de almidón en el gránulo, de la longitud de las cadenas ramificadas de amilopectina. Los almidones que presentan el patrón del tipo A provenientes de maíz y trigo, muestran cadenas ramificadas de corta longitud (23-29 residuos de glucosa). Los almidones que presentan el patrón del tipo B (como los de papa y amilo-maíz) presentan cadenas ramificadas de mayor longitud (30-44 residuos de glucosa). Finalmente, los almidones que presentan cadenas ramificadas con grado de polimerización entre 26 y 30, muestran un patrón de difracción de rayos X de tipo C. De esta manera, los almidones con patrón de difracción A contienen amilopectina con más cadenas cortas, que los almidones con patrón de difracción B. No obstante, existen excepciones como es el caso del almidón de batata o papa dulce, que presenta un patrón de difracción del tipo A y contiene pocas cadenas cortas en las moléculas de amilopectina.

Desde el punto de vista nutricional, los almidones con patrones del tipo B tienden a presentar una mayor resistencia a la hidrólisis enzimática que aquellos que presentan un patrón de difracción del tipo A, mientras que los almidones con patrones del tipo C,

presentan un grado de hidrólisis intermedio, entre éstos (British National Foundation, 1990, citado por Laurentin, 1999; Gallant y col., 1992; Marín, 2009).

## **Biodisponibilidad del almidón**

La biodisponibilidad de un nutriente, como el almidón, se refiere a la proporción de ese nutriente para ser digerido, absorbido, utilizado y/o almacenado en el organismo (Whitney y Rolfes, 1993, citado por Laurentin, 1999).

Las amilasas son las principales enzimas involucradas en la digestión del almidón. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  encontrados en las moléculas de amilosa y amilopectina; sin embargo no son capaces de hidrolizar los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  terminales, los enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  ni los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  adyacentes a los puntos de ramificación de la molécula de amilopectina. En consecuencia, los principales productos de digestión del almidón por las amilasas son oligosacáridos, tales como, maltosa, maltotriosa y dextrinas límites, aunque también se producen pequeñas cantidades de glucosa libre (Colonna y col., 1992; Ganong, 2003). La digestión posterior de estos oligosacáridos es llevada a cabo por las oligosacaridasas localizadas en la membrana de borde de cepillo de los enterocitos, y los monosacáridos producidos (glucosa) son activamente transportados a través de esta membrana y la membrana basal hacia el lado seroso de los enterocitos, desde donde viajan al hígado en la sangre portal (Ganong, 2003).

Los almidones poseen diferentes propiedades fisicoquímicas que son de interés al evaluar su biodisponibilidad. Entre ellas se encuentran la gelatinización y la retrogradación del gránulo de almidón. Estas propiedades alteran, principalmente, la capacidad que van a

tener las enzimas digestivas para poder ejercer su acción sobre el gránulo, modificando su biodisponibilidad.

La gelatinización es un proceso que involucra el calentamiento (a más de 50 °C) del gránulo de almidón, en un exceso de agua. En este proceso ocurre una desorganización de la estructura cristalina del almidón, el gránulo absorbe agua, se hincha y se da la solubilización parcial de la amilosa. A nivel molecular, en este proceso ocurre la ruptura de puentes de hidrógeno entre distintos componentes del gránulo y se obtiene como resultado esqueletos hinchados de amilopectina que se encuentran en suspensión en una solución de amilosa (Colonna y col., 1992). Dadas las características descritas, la gelatinización aumenta la biodisponibilidad del almidón, ya que favorece el ataque de las enzimas digestivas sobre el gránulo.

La retrogradación es un proceso que ocurre en gránulos de almidón gelatinizados cuando se disminuye la temperatura. Dada la inestabilidad del gránulo de almidón gelatinizado, las moléculas de amilosa y amilopectina se vuelven a asociar lentamente conllevando a un aumento en la cristalinidad del gránulo. La retrogradación de la amilosa se produce en términos de horas, mientras que en el caso de la amilopectina ocurre en varios días. Dado el hecho de que la retrogradación aumenta la cristalinidad del gránulo de almidón, debido a la generación de un mayor número de puentes de hidrógeno entre las moléculas de amilosa y amilopectina, la biodisponibilidad disminuye (Colonna y col., 1992). En este caso la accesibilidad de las enzimas digestivas al gránulo de almidón se ve limitada, y el mismo hecho de que exista una mayor interacción entre las moléculas, produce una disminución en la capacidad de estas enzimas para ejercer su función.

Existen otros factores que intervienen en la biodisponibilidad del almidón, los cuales pueden generar fracciones resistentes a la digestión enzimática y/o variaciones en la velocidad de su digestión. Estos factores están relacionados con las interacciones del almidón con ciertas moléculas (complejos con lípidos o proteínas) y componentes celulares (gránulos encerrados en la pared celular), así como también de características propias del gránulo (relación amilosa/amilopectina, forma física, grado de gelatinización, entre otros) (Englyst y col., 1992; Goñi y col., 1996; Laurentin, 1999).

### **Almidón resistente**

En 1992, la acción concertada de un grupo de investigadores europeos, definió al almidón resistente como la suma del almidón y los productos de su digestión que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992). Este concepto cambió completamente la idea, que se tenía a principios de la década de los 80, de que los almidones se digerían y absorbían completamente en el intestino delgado humano. Tres consideraciones importantes están ligadas a esta definición fisiológica. Primero, el almidón resistente no está compuesto únicamente por polímeros de alto peso molecular sino que también incluye a dextrinas, pequeños oligosacáridos e incluso glucosa, todos derivados de almidón digerido que escapa a la absorción. En segundo lugar, el almidón resistente llega hasta el intestino grueso donde es metabolizado por la microflora del colon. Finalmente, la cantidad actual de almidón resistente en una comida (la cantidad que alcanza el colon) depende de la fisiología del individuo y puede ser afectada por la edad (Englyst y Cummings, 1986; Bird y col., 2000; Laurentin, 2004).

El almidón ha sido clasificado nutricionalmente por Englyst y col. (1992) en tres tipos: almidón rápidamente digerible, almidón lentamente digerible y almidón resistente. A su vez, el almidón resistente fue diferenciado en tres grupos: almidón físicamente inaccesible (AR<sub>1</sub>), gránulos resistentes (AR<sub>2</sub>) y almidón retrogradado (AR<sub>3</sub>) (Tabla I). Actualmente se habla que además de AR<sub>1</sub>, AR<sub>2</sub> y AR<sub>3</sub>, existe un cuarto tipo de almidón resistente (AR<sub>4</sub>) en el cual se incluyen almidones modificados químicamente (Laurentin y Edwards, 2005; Sajilata y col., 2006). También es conocido que las interacciones amilosa-lípidos y las modificaciones físicas del almidón pueden producir fracciones resistentes a la digestión (Holm y col., 1983; Laurentin, 1999; Tovar y col., 1999; Laurentin y col., 2003).

**Tabla I. Clasificación nutricional del almidón.**

| <b>Tipo de almidón</b>                             | <b>Ejemplos de alimentos que lo contienen</b>                                                                           |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Almidón rápidamente digerible</b>               | Alimentos amiláceos recién cocinados.                                                                                   |
| <b>Almidón lentamente digerible</b>                | La mayoría de los cereales crudos.                                                                                      |
| <b>Almidón resistente (AR):</b>                    |                                                                                                                         |
| <b>1. Físicamente inaccesible (AR<sub>1</sub>)</b> | Gránulos parcialmente molidos, semillas, leguminosas y pasta.                                                           |
| <b>2. Gránulos resistentes (AR<sub>2</sub>)</b>    | Plátanos y cambures verdes, papas crudas, almidón de maíz rico en amilosa.                                              |
| <b>3. Almidón retrogradado (AR<sub>3</sub>)</b>    | Papas cocinadas y enfriadas, pan, algunos cereales comerciales.                                                         |
| <b>4. Otras fuentes de AR</b>                      | Alimentos que contienen almidones modificados químicamente (AR <sub>4</sub> ) o físicamente, complejos amilosa-lípidos. |

Modificado de Englyst y col. (1992) y Sajilata y col. (2006).

***Almidón físicamente inaccesible (AR<sub>1</sub>)***

El AR<sub>1</sub> es físicamente inaccesible y está protegido de la acción de las enzimas digestivas. Esta inaccesibilidad es debida a la presencia de la pared celular de las plantas en las cuales queda encapsulado el almidón, por ejemplo, en semillas de leguminosas y granos parcialmente molidos. AR<sub>1</sub> también es encontrado en alimentos procesados altamente compactados, como la pasta. El contenido de AR<sub>1</sub> es afectado por la disrupción de la estructura del alimento (por ejemplo, molienda) y, hasta cierto punto, por el proceso de masticación (Englyst y col., 1992; Laurentin y Edwards, 2005).

***Gránulos resistentes (AR<sub>2</sub>)***

Cada especie vegetal posee gránulos de almidón característicos con tamaño, forma, proporción amilosa/amilopectina, estructura macromolecular del gránulo, entre otros; que les son únicos. Se cree que ciertas combinaciones de estos factores hacen que unos gránulos sean más resistentes al ataque de enzimas digestivas que otros (Englyst y col., 1992; Laurentin y Edwards, 2005). El AR<sub>2</sub> está constituido por gránulos que presentan un patrón de difracción de rayos X tipo B, como los presentes en papas crudas y almidones con alto contenido de amilosa (Englyst y col., 1992). Del mismo modo, existen evidencias que almidones con un patrón de difracción del tipo C presentan fracciones intrínsecamente resistentes a la digestión enzimática (Marín, 2009).

***Almidón retrogradado (AR<sub>3</sub>)***

El AR<sub>3</sub> es el almidón resistente más abundante en los alimentos. Es producido por el procesamiento ordinario de los alimentos al cocinarlos y dejarlos enfriar. La producción de

AR<sub>3</sub> está afectada por la proporción amilosa/amilopectina del gránulo, cantidad de agua y temperatura durante la cocción y el número de ciclos de cocción-enfriamiento (Englyst y col., 1992; Tovar y Melito, 1996; Laurentin y Edwards, 2005). El AR<sub>3</sub> presenta un patrón de difracción de rayos X tipo B, al igual que el AR<sub>2</sub> (Englyst y col., 1992).

#### ***Almidón modificado químicamente (AR<sub>4</sub>)***

La industria de alimentos puede generar fracciones de almidón resistente al modificar almidones mediante métodos químicos. El AR<sub>4</sub> está constituido, principalmente, por almidón entrecruzado y almidón derivatizado. En el primer caso, las moléculas de almidón son entrecruzadas mediante grupos químicos (polifosfatos, epiclorohidrina, entre otros) y en el segundo caso, las cadenas laterales de la molécula de almidón son esterificadas a grupos químicos (acetil, hidroxipropil, metil, fosfatos, dietil-aminoetil, entre otros). Además, pueden generarse almidones con ambas modificaciones (derivatizados y entrecruzados), denominados doble-derivatizados. Los grupos químicos introducidos pudieran inhibir la acción de las enzimas digestivas debido a impedimentos estéricos; aumentándose, la cantidad de almidón resistente a la digestión enzimática (Tovar y col., 1992; Tovar, 1994; Laurentin, 1999; Tovar y col., 1999; Bello-Pérez y col., 2002; Laurentin y Edwards, 2005; Sajilata y col., 2006).

#### ***Otras fuentes de almidón resistente***

Otro tipo de almidón resistente es aquel generado mediante modificaciones físicas drásticas. Algunas de estas modificaciones son la pirodextrinización y la extrusión, las cuales se llevan a cabo en condiciones de baja humedad y presencia de calor; generándose

enlaces glucosídicos atípicos en la molécula de almidón, diferentes a los  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$  encontrados normalmente (Laurentin y col., 2003; Laurentin, 2004). Estos enlaces atípicos no podrán ser reconocidos por las enzimas digestivas, por lo que éstas pierden especificidad por el sustrato y aumenta la cantidad de almidón resistente (Tovar 1992; Tovar y col. 1999; Laurentin y Edwards, 2005).

El almidón resistente posee algunas propiedades fisiológicas como son: la disminución en el aporte calórico, con respecto a carbohidratos digeribles; disminución de la respuesta glucémica e insulinémica a algunos alimentos; la prevención de diversas enfermedades, como cáncer de colon; entre otras (Asp y col., 1996; Cummings y col., 1996; Topping y Clifton, 2001; Woo y col., 2003; Sajilata y col., 2006). Muchos de estos efectos están mediados por los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son producidos, a partir de la fermentación del almidón resistente que alcanza el intestino grueso, por la microflora del colon. Los principales AGCC producidos por la microflora del colon están conformados por: acetato, propionato y butirato (Bird y col., 2000; Topping y Clifton, 2001; Laurentin, 2004). Algunas de las propiedades fisiológicas de los AGCC se encuentran resumidas en la Tabla II.

**Tabla II. Propiedades fisiológicas de los ácidos grasos de cadena corta.**

| <b>Ácido graso de cadena corta</b> | <b>Propiedad fisiológica</b>                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Acetato</b>                     | Provee energía a músculos y otros tejidos periféricos.<br>Puede ser sustrato para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga en el hígado.                                                                                                         |
| <b>Propionato</b>                  | Puede ser sustrato para la producción de glucosa, vía gluconeogénesis, en el hígado.<br>Se ha asociado a la disminución del colesterol.                                                                                                              |
| <b>Butirato</b>                    | Sirve como combustible de los colonocitos.<br>Induce la proliferación de colonocitos sanos.<br>Induce apoptosis en colonocitos diferenciados hacia ciertas líneas cancerígenas.<br>Ha mostrado propiedades anti-inflamatorias en cultivos celulares. |

Adaptado de Laurentin (2004).

### **Caracterización *in vitro* e *in vivo* del almidón**

En los estudios que buscan analizar la biodisponibilidad del almidón, se deben realizar determinaciones de digestibilidad *in vitro*; correlacionándolas con estimaciones de digestibilidad *in vivo*. De esta manera, las diferentes relaciones que puedan encontrarse entre los resultados de ambos enfoques permitirán reforzar y afirmar los resultados que se obtengan sobre la biodisponibilidad del almidón en la fuente.

La caracterización de la digestibilidad *in vitro* se realiza mediante análisis químicos, que simulan las condiciones *in vivo*, y está basada en determinaciones del contenido de almidón disponible y almidón resistente en una determinada cantidad de la muestra. Además, se realizan determinaciones de la tasa a la cual las enzimas digestivas ejercen su función sobre el gránulo de almidón (Englyst y col, 1992; Tovar y col., 2003; Tovar y col., 2005).

En los análisis de digestibilidad *in vivo* se utiliza alguna especie animal modelo para llevar a cabo el estudio. En estos análisis se evalúan determinados parámetros (biomarcadores) que son reflejo de las interacciones metabólicas que ocurren en el organismo, según sea la biodisponibilidad del almidón en el alimento.

En estudios realizados por Tovar y col. (1992), García (2003) y Galeno (2006), se ha analizado la biodisponibilidad del almidón de diferentes fuentes mediante la relación entre la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*. En el primer caso, el modelo animal utilizado fueron ratas, mientras que en los dos últimos estudios se utilizó el gorgojo de arroz.

## **Características de las fuentes de almidón**

El plátano y especies relacionadas son plantas monocotiledóneas pertenecientes al género *Musa*. Esta planta produce frutos grandes y es parte importante en la dieta de la población en Venezuela (Silva, 2000). Los cultivares comestibles de plátano se originaron mediante la hibridación interespecífica de dos plantas parentales originales con características bien definidas: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (González, 2004; citado por Marín, 2009). Además, los cultivares actuales han sido clasificados, según su constitución genómica, por Haddad y Borges (1973) (citado por Marín, 2009) de la siguiente manera:

➤ Clones con genomas *acuminata* (A):

o Diploides (AA).

o Triploides (AAA)

o Tetraploides (AAAA)

➤ Clones con genomas *acuminata* (A) y *balbisiana* (B):

o Diploides (AB).

o Triploides con dominancia *acuminata* (AAB)

o Triploides con dominancia *balbisiana* (ABB)

o Tetraploides (ABBB).

También es conocido que cada sub-grupo genómico posee características particulares en cuanto a las características químicas, físicas, fisicoquímicas y nutricionales de sus almidones (Marín, 2009).

Los gránulos de almidón de plátano son de forma irregular, con formas ovales y elongadas predominantemente. Algunos investigadores han reportado que los gránulos de este almidón exhiben un patrón de difracción de rayos X del tipo B, a lo que se le atribuye su alta resistencia a la hidrólisis enzimática; sin embargo, en otros estudios realizados se han encontrado patrones de difracción de tipo A y C, por lo que las características de cristalinidad de estos almidones aún no están plenamente establecidas y se cree que varían entre las diferentes variedades de plátano (Bello-Pérez y col., 2000; Jane y col., 1997, citado por Galeno, 2006; Marín, 2009).

En estudios recientes se ha analizado la digestibilidad del almidón de plátano (Galeno, 2006; Marín, 2009); encontrándose que, para las variedades analizadas, su digestibilidad era baja con respecto a almidones que generalmente se consideran de alta digestibilidad, como el almidón de maíz y el almidón de trigo (Englyst y col., 1992; Goñi y col., 1996; García, 2003).

## **Bioensayo del gorgojo de arroz**

Aunque entre los grupos de la escala zoológica pueden existir diferencias cualitativas y cuantitativas en sus requerimientos nutricionales, los nutrientes básicos son los mismos y las reacciones metabólicas esenciales que permiten su utilización se han conservado (Carmona y col., 1998). La similitud de los procesos biológicos entre las especies ha hecho posible la implementación de sistemas modelo. No obstante, los resultados deben ser analizados dentro de los límites que imponen las diferencias existentes entre cada especie (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997).

El uso de insectos como modelo en bioensayos nutricionales tiene como ventajas la corta duración y el menor costo de los experimentos. La pequeña cantidad de alimento requerida para cada ensayo permite evaluar, por ejemplo, el efecto de factores antinutricionales purificados, de limitada disponibilidad. Por otra parte, para cada réplica, se utilizan 30 o más individuos; lo cual facilita la validación de los análisis estadísticos (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997).

En estudios realizados por Carmona y Gómez-Sotillo (1997), Carmona y col. (1998), Carmona y col. (2001), García (2003), Galeno (2006), entre otros, se ha utilizado el gorgojo de arroz con éxito como modelo animal, para la realización de bioensayos nutricionales. En diferentes experiencias en que se ha utilizado este bioensayo, se ha logrado estudiar la eficacia de diversos biomarcadores como: supervivencia, variación de peso, cambios en la composición corporal, excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa; en la evaluación tanto del valor nutritivo de diversos componentes de la dieta, como de la toxicidad de alimentos.

## Estudios de digestibilidad de almidones de plátano

Silva (2000) realizó un estudio de digestibilidad *in vitro* de almidones nativos y modificados de plátano de la variedad hartón común y amaranto, utilizando almidón de maíz como referencia. Entre algunos de los resultados, encontró un alto porcentaje de almidón resistente (36%, sobre base seca) en la muestra de almidón nativo de plátano, posiblemente relacionado al patrón de difracción de rayos X del tipo B que, se consideraba en aquel momento, poseen todos los almidones de plátano. De igual manera, encontró que la tasa de hidrólisis enzimática ( $\alpha$ -amilólisis) fue mucho menor en el almidón nativo y crudo de plátano que en el almidón nativo y gelatinizado de maíz, lo cual podría estar relacionado con la alta cantidad de almidón resistente presente en la muestra cruda de plátano y a que el proceso de gelatinización pudo haber desorganizado e hinchado el gránulo de almidón de maíz; volviéndolo más accesible a las enzimas digestivas.

En estudios realizados por García (2003), donde se estudió la digestibilidad de almidones nativos y modificados de *Canavalia ensiformis* (L.), utilizándose almidones nativos de papa y de maíz como referencias; fueron evaluados diferentes biomarcadores del bioensayo del gorgojo de arroz y se correlacionaron con estudios de digestibilidad *in vitro*. Entre los parámetros determinados para evaluar la digestibilidad *in vitro* de los almidones, se encontraron: almidón potencialmente disponible, almidón resistente total, almidón resistente retrogradado (AR<sub>3</sub>) y tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*.

Los resultados de los biomarcadores composición corporal, excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, fueron expresados como índices que permitían compensar diferencias en los niveles de ingesta de cada tipo de almidón. Para las correlaciones, se utilizaron análisis de regresión múltiple, los cuales permiten correlacionar más de una

variable independiente con una variable dependiente. En este caso, las variables independientes fueron los parámetros de digestibilidad evaluados *in vitro*, mientras que las variables dependientes fueron cada biomarcador estimado en el bioensayo del gorgojo de arroz (posibles estimadores de la digestibilidad *in vivo*). La finalidad de estos análisis fue determinar los posibles biomarcadores del bioensayo del gorgojo de arroz que pudieran ser utilizados como estimadores de la digestibilidad *in vivo* de los almidones evaluados.

El biomarcador excreción de ácido úrico se correlacionó con el almidón resistente total y el almidón resistente retrogradado de los almidones, mientras que la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa no sólo se correlacionó con estos dos parámetros, sino que también se correlacionó con el almidón potencialmente disponible de los almidones. En general, los biomarcadores excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa resultaron ser los mejores estimadores de la digestibilidad *in vivo* de los almidones, mientras que el parámetro almidón resistente total fue el que mejor predijo las respuestas observadas en los biomarcadores, relacionadas con la digestibilidad del almidón. Además, se demostró la utilidad del bioensayo del gorgojo de arroz en el análisis de la digestibilidad *in vivo* de los almidones de *Canavalia ensiformis* (L.) estudiados.

En estudios realizados por Galeno (2006) se utilizó el mismo enfoque que en el estudio llevado a cabo por García (2003). Se analizaron diferentes biomarcadores del bioensayo del gorgojo de arroz y se correlacionaron con los parámetros de digestibilidad *in vitro* determinados (almidón potencialmente disponible, almidón resistente total y tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*). En este estudio se utilizaron almidones nativos y modificados de apio y plátano variedad hartón común; utilizándose almidón nativo de maíz como referencia.

Entre los resultados más relevantes de digestibilidad *in vitro*, se corroboró la baja digestibilidad atribuida, generalmente, al almidón de plátano (Englyst y Cummings, 1986;

Englyst y col., 1992); encontrándose un alto contenido de almidón resistente total (36%) y una tasa de hidrólisis enzimática, para el almidón nativo y gelatinizado de plátano, que fue menor a la encontrada para el almidón nativo y gelatinizado de maíz.

Los resultados de los biomarcadores composición corporal, excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, también fueron expresados como índices que permitían compensar diferencias en los niveles de ingesta de cada tipo de almidón, y los análisis de correlación utilizados fueron análisis de regresión múltiple, tal cual se realizó en el estudio de García (2003).

Entre los resultados más relevantes, se reiteró la importancia de los biomarcadores excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa como estimadores de la digestibilidad *in vivo* de almidones, ya que se correlacionaron con los parámetros almidón resistente total y tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* (específicamente, la magnitud final de hidrólisis) de los almidones. Además, se corroboró la utilidad del bioensayo del gorgojo de arroz en el análisis de la digestibilidad *in vivo* de los almidones de apio y plátano estudiados.

En un estudio correspondiente a su tesis doctoral, Marín (2009) evaluó, entre otras características, algunos aspectos nutricionales de almidones nativos y modificados de plátano, variedades: balbisiana, titiaro, grande naine, hartón gigante (o hartón común), manzano, lep chang kut, topocho verde y FHIA21. Entre las características evaluadas, en común con las analizadas en el presente trabajo, se encuentran el contenido de almidón potencialmente disponible, el contenido de almidón resistente total y la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*. Entre los resultados obtenidos, se corroboró la existencia de fracciones de almidón resistente (47-61%) en los almidones nativos y crudos de plátano y su baja tasa de

$\alpha$ -amilólisis *in vitro* (menos de 6,5% de hidrólisis a los 60 min de incubación); observándose ligeras variaciones entre cada una de las diferentes variedades.

Entre otros resultados relevantes, también encontró que todos los almidones de las variedades de plátano estudiadas presentaron patrones de difracción de rayos X del tipo C, a excepción de la variedad balbisiana que presentó el patrón del tipo B. Esta información podría explicar la baja digestibilidad *in vitro* encontrada para estos almidones.

En otros estudios, se ha analizado la digestibilidad *in vitro* de diferentes almidones nativos y modificados de plátano, y de alimentos preparados con estos almidones. Bello-Pérez y col. (2004) estudiaron la digestibilidad de galletas preparadas con almidón nativo de plátano. Aparicio-Saguilán y col. (2005) realizaron preparaciones de almidón de plátano modificado y enriquecido en almidón resistente y, posteriormente, evaluaron la digestibilidad de galletas preparadas con este almidón (Aparicio-Saguilán y col., 2007). Osorio-Díaz y col. (2008) y Rendon-Villalobos y col. (2008) estudiaron la digestibilidad de fideos cocidos preparados a partir de mezclas de almidón de trigo de diferentes fuentes y almidón de plátano, en diferentes proporciones. Hernández y col. (2008) evaluaron la digestibilidad de películas comestibles preparadas con diferentes almidones, entre ellos almidón de plátano. Aparicio-Saguilán y col. (2008) analizaron la digestibilidad de almidón de plátano modificado obtenido por entrecruzamiento (con polifosfato) y cocción a presión del almidón nativo. En todos estos estudios se encontró que los almidones o preparaciones de almidón de plátano presentaron digestibilidades menores a las referencias utilizadas (almidones o preparaciones de maíz o trigo). Esta disminución en la digestibilidad *in vitro* fue atribuida a contenidos de almidón resistente mayores, o contenidos de almidón potencialmente disponible o tasas de hidrólisis enzimática menores, que los encontrados en las respectivas referencias.

En base a estos antecedentes, en el presente estudio se analizó la digestibilidad *in vitro* de los almidones de diferentes variedades de plátano y se estudiaron los biomarcadores supervivencia, variación de peso, composición corporal, actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y excreción de ácido úrico, del bioensayo del gorgojo de arroz, como posibles estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de plátano de las variedades: hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012.

## Objetivos

### Objetivo general

Comparar los parámetros que caracterizan la digestibilidad *in vitro* con la biodisponibilidad *in vivo* de almidones aislados de las siguientes variedades de plátano: hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012; utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.).

### Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el contenido de almidón disponible y almidón resistente de los almidones aislados de las cinco variedades de plátano.
2. Evaluar la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* de los almidones estudiados.
3. Estimar el porcentaje de grasa corporal, la excreción de ácido úrico y la actividad enzimática similar a  $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz, como principales biomarcadores de la digestibilidad *in vivo* de los almidones estudiados.
4. Correlacionar las respuestas biológicas observadas *in vivo* con los indicadores de biodisponibilidad evaluados *in vitro*.

## **Materiales y Métodos**

### **Muestras**

Los almidones aislados de cinco variedades de plátano que se estudiaron fueron: hartón común (AAB), cambur negro (AAA), topocho cenizo (ABB), HH-12 (AA) y cambur 012 (AAAA); los cuales fueron cedidos gentilmente por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Los frutos empleados en la obtención del almidón se recolectaron en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas – Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP) en Maracay, estado Aragua. Los frutos fueron seleccionados y cosechados con un grado de madurez de 1 (verde), según la escala de Von Loesecke (1950), y los almidones fueron aislados según el método descrito por Pérez y col. (1993). Además, se incluyó en los análisis el almidón de maíz de origen comercial, donado por Alfonso Rivas & Cia., C.A. (Caracas), como muestra de referencia. Las arvejas (La Lucha<sup>®</sup>, La Lucha C.A., Los Teques) utilizadas en el bioensayo del gorgojo de arroz, fueron adquiridas en el mercado local y no fue necesario lavarlas para la realización del estudio.

### **Digestibilidad *in vitro* de almidones**

La digestibilidad *in vitro* de los almidones fue evaluada mediante la determinación de los parámetros: almidón potencialmente disponible, almidón resistente total y tasa de

$\alpha$ -amilólisis *in vitro*. Esta última variable fue evaluada tanto con los almidones crudos como con los almidones gelatinizados.

### **Almidón potencialmente disponible**

La determinación del almidón potencialmente disponible se realizó mediante el método descrito por Holm y col. (1986). La muestra de almidón (300 mg en base seca) se suspendió en 20 mL de agua y se incubó con 100  $\mu$ L de Termamyl<sup>®</sup> 120 (NOVO Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) en un baño a 98 °C por 20 min. Luego de enfriarse, se ajustó la solución a un volumen final de 100 mL, con agua. Posteriormente, se incubó una alícuota de 0,5 mL, en un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de buffer acetato 0,1 mol/L, pH 4,75 con 500  $\mu$ g de amiloglucosidasa (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) a 40 °C durante 60 min, con agitación constante. Por último, se ajustó la solución a un volumen final de 10 mL, con agua. A partir de esta solución final se realizó la cuantificación de la glucosa liberada.

La glucosa liberada se cuantificó mediante la utilización de un estuche comercial (Industrias Qualitest C.A., Caracas), cuyo funcionamiento está basado en el método de Trinder (1969). La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último oxida al cromógeno (4-aminofenazona/fenol) bajo la catálisis de la peroxidasa produciendo un compuesto de color rosado, cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada. Para la determinación, se incubó una alícuota de 50  $\mu$ L de la solución final con 1 mL del reactivo de trabajo a 37 °C durante 10 min. Por último, se midió la absorbancia de la solución a 510 nm y se obtuvo la cantidad de glucosa a partir de una curva de

calibración; utilizando glucosa como patrón. La línea de regresión utilizada fue  $Y = 0,0294X$ ;  $R^2 = 0,9729$ .

El contenido de almidón potencialmente disponible fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

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

APD: almidón potencialmente disponible

<sup>a</sup>Volumen final luego de la digestión con Termamyl® 120

<sup>b</sup>Alícuota tomada para la digestión con amiloglucosidasa

<sup>c</sup>Volumen final luego de la digestión con amiloglucosidasa

<sup>d</sup>Alícuota tomada para la cuantificación de la glucosa liberada

<sup>e</sup>Conversión de  $\mu g$  a mg.

<sup>f</sup>Corrección de glucosa a glucano

En todas las determinaciones se incluyó el almidón de papa (Potatis mjöl, Lyckeby Stärkelsen, Kristianstad, Suecia) como referencia del método. El almidón potencialmente disponible para esta referencia fue  $94,36 \pm 1,73\%$  ( $n = 6$ ).

### **Almidón resistente total**

La determinación del almidón resistente total se realizó mediante el método descrito por Goñi y col. (1996). La muestra de almidón (100 mg en base seca) se suspendió en 10 mL de buffer KCl-HCl 0,2 mol/L, pH 1,5 y se incubó con 0,2 mL de una solución de pepsina (P-7000, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (0,1 g pepsina por mL en buffer KCl-HCl) a 40 °C por 1 h, con agitación constante. La finalidad de este paso es digerir la proteína en la muestra y simular las condiciones de tránsito del almidón a través del estómago.

Luego de enfriarse la muestra, se agregaron 9 mL de buffer Tris-maleato 0,1 mol/L, pH 6,9 y se incubó con 1 mL de una solución de  $\alpha$ -amilasa (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (40 mg  $\alpha$ -amilasa por mL en buffer Tris-maleato) a 37 °C por 16 h, con agitación constante. Este paso simula la digestión del almidón, que ocurre en el intestino delgado, por parte de la  $\alpha$ -amilasa pancreática.

Posteriormente, se centrifugó la muestra a 8.000 *g* por 25 min entre 0 y 5 °C, descartándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 mL de agua y se realizó una segunda centrifugación con las mismas condiciones. Este paso permite separar el almidón resistente y la fibra (contenidos en el sedimento) del almidón que fue digerido en el paso anterior (contenido en el sobrenadante).

Al último sedimento se le agregaron 3 mL de agua y luego 3 mL de KOH 3 mol/L, manteniéndose en agitación constante por 30 min. Posteriormente se agregaron 5,5 mL de HCl 2 mol/L, 3 mL de buffer acetato 0,4 mol/L, pH 4,75, y 4,5 mg de amiloglucosidasa (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.), en ese orden; y luego fue incubado a 40 °C por 1 h con agitación constante. Luego se realizaron dos centrifugaciones a 8.000 *g* por 30 min, entre 0 y 5 °C; resuspendiéndose el primer sedimento con 10 mL de agua y recogiendo ambos sobrenadantes. En este paso se separa el almidón resistente, que fue digerido luego de la utilización del agente caotrópico (KOH) y la incubación con amiloglucosidasa, de la fibra (contenida en el sedimento). El volumen de los sobrenadantes se ajustó a 50 mL con agua destilada y se cuantificó la glucosa liberada como se describió en la sección anterior.

El contenido de almidón resistente total fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ART (\%)} = \frac{\mu\text{g de glucosa} \times 50^{\text{a}} \times 0,9^{\text{d}}}{0,05^{\text{b}} \times 1000^{\text{c}} \times \text{peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

ART: almidón resistente total

<sup>a</sup>Volumen final de la solución que contiene el almidón resistente

<sup>b</sup>Alícuota tomada de la solución que contiene el almidón resistente para la cuantificación de la glucosa liberada.

<sup>c</sup>Conversión de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg}$ .

<sup>d</sup>Corrección de glucosa a glucano

En todas las determinaciones se incluyó un cereal de desayuno (Corn Flakes<sup>®</sup>, Alimentos Kellogg S.A., Maracay) molido como referencia del método. El almidón resistente total de esta referencia fue  $4,43 \pm 0,39\%$  ( $n = 6$ ).

### Tasa de $\alpha$ -amilólisis *in vitro*

La cinética de hidrólisis *in vitro* se determinó mediante el método descrito por Holm y col. (1985), en el cual se estima el poder reductor liberado por la acción de la  $\alpha$ -amilasa porcina. La muestra (500 mg sobre la base de almidón disponible) se suspendió en 50 mL de buffer fosfato de sodio y potasio 0,1 mol/L, pH 6,9; manteniéndose en agitación constante por 25 min. Para la tasa de hidrólisis de los almidones crudos, se colocó la muestra en un baño a 37 °C, con agitación constante, y se inició la reacción enzimática. Para los almidones gelatinizados, se incubaron en un baño en ebullición durante 20 min, previo a la estabilización a 37 °C.

La reacción enzimática se inició añadiendo 1 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa porcina (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (4 mg/mL en buffer fosfato de sodio y potasio) a la suspensión y se detuvo —a los 0, 5, 15, 30 y 60 min de incubación— al

trasvasar alícuotas de 0,2 mL hacia 1,8 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico, el cual es utilizado para la estimación de los azúcares reductores liberados (Hostettler y col., 1951). Este reactivo contiene 5 g/L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) disuelto en tartrato de Na,K a 150 g/L en NaOH (8 g/L).

La medición de los azúcares liberados se realizó mediante el método de Hostettler y col. (1951), en el cual la mezcla muestra/reactivo se incubaba en un baño en ebullición por 10 min, se deja enfriar y se agregan 15 mL de agua destilada, para luego medir la absorbancia a 530 nm. La cantidad de maltosa se obtuvo a partir de una curva de calibración; utilizando maltosa como patrón. La línea de regresión empleada fue  $Y = 0,4471X$ ;  $R^2 = 0,9995$ .

La tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* para cada tiempo (expresada en equivalentes de maltosa) fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha\text{-amilólisis (\%)} = \frac{\text{cantidad de maltosa (mg)} \times 250^a \times 0,95^b}{\text{almidón disponible (mg)}} \times 100$$

<sup>a</sup>Factor de dilución

<sup>b</sup>Corrección de maltosa a glucano

Los resultados fueron corregidos por el poder reductor inicial presente en las muestras ( $t = 0$  min). En todos los análisis se incluyó el almidón de maíz (Maizina Americana<sup>®</sup>, Alfonso Rivas & Cia., C.A., Caracas) gelatinizado como referencia del método. El poder reductor inicial (porcentaje de hidrólisis a 0 min), velocidad inicial de hidrólisis (porcentaje de hidrólisis a los 15 min) y magnitud final de hidrólisis (porcentaje de hidrólisis a los 60 min) registrados para esta referencia, fueron:  $0,50 \pm 0,15\%$  ( $n = 10$ );  $53,29 \pm 0,84\%$  ( $n = 10$ ) y  $70,60 \pm 0,96\%$  ( $n = 10$ ), respectivamente.

## Digestibilidad *in vivo* de almidones

La estimación de la digestibilidad *in vivo* de las muestras de almidón se llevó a cabo mediante la utilización del bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.); evaluándose diferentes biomarcadores como: supervivencia, variación de peso, cambios en la composición corporal, excreción de ácido úrico y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa. La Figura 3 muestra el esquema metodológico utilizado para el análisis de la digestibilidad *in vivo* de los almidones.

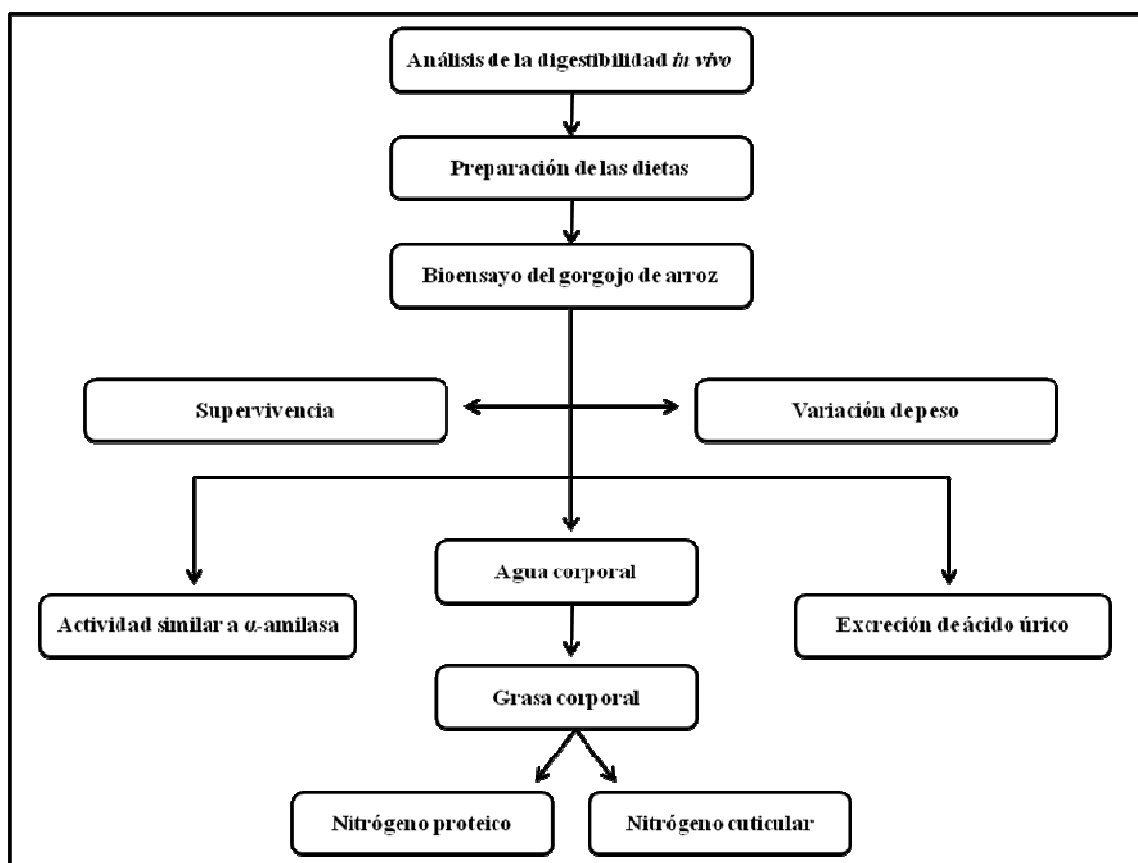


Figura 3. Esquema metodológico utilizado en el análisis de la digestibilidad *in vivo* de los almidones.

### **Preparación de las dietas de almidones**

Los almidones se suministraron a los insectos bajo la forma de semillas artificiales. Para ello, se pesaron aproximadamente 12 g de almidón y se añadieron 30 mL agua, inicialmente; mezclándose la suspensión con una espátula. Luego, se añadió una cantidad de agua variable hasta que se obtuvo una suspensión con una consistencia semisólida. Esto es, lo suficientemente diluida como para no encontrar almidón seco adherido al fondo del recipiente, pero lo suficientemente densa como para formar un flujo continuo de suspensión, al tomar un poco con la espátula y verterla en el recipiente desde 1-2 cm de altura. Posteriormente, se colocaron gotas de la suspensión sobre un papel encerado (2 gotas por semilla artificial), utilizando una jeringa de 10 mL, sin aguja. Por último, se secaron las semillas artificiales en estufa a 37 °C por 24 h.

A partir de los 12 g de almidón, se prepararon aproximadamente 12 g de semillas artificiales, los cuales fueron suficientes para realizar el bioensayo por sextuplicado (2 g por réplica).

### **Bioensayo del gorgojo de arroz**

El bioensayo se realizó mediante el método descrito por Carmona y Gómez-Sotillo (1997) y Carmona y col. (2001), en la cual se utilizan ayuno y arvejas (peladas y partidas) como dietas controles del bioensayo. Además, se utilizó almidón de maíz como referencia (García, 2003; Galeno, 2006). Para el cultivo de los insectos, se colocaron 50 individuos en frascos, con un tercio de su volumen ocupado por arvejas (aproximadamente 300 g), y se mantuvieron en oscuridad. A las dos semanas se retiraron los padres y luego de tres o cuatro semanas adicionales, emergió la F1. Se tomaron 30 individuos de la F1, con un peso

promedio de  $1,6 \pm 0,1$  mg y se colocaron en viales con 2 g de la dieta correspondiente (semillas artificiales); a excepción del ayuno donde sólo se colocaron los insectos. Cada dieta se realizó por sextuplicado (6 viales).

Los insectos se mantuvieron en los viales durante 8 días, en los cuales se midió el peso neto y la supervivencia de manera interdiaria; luego de haber retirado los individuos muertos. Al octavo día se congelaron los supervivientes y los grupos de insectos de tres viales se destinaron a la extracción de proteínas para la evaluación de la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa; mientras que los grupos de insectos de los tres viales restantes fueron destinados a la evaluación de la composición corporal. Tres viales, conteniendo las excretas y restos del alimento, fueron utilizados para cuantificar la excreción del ácido úrico.

### **Determinación de la supervivencia**

A partir de los datos interdiarios de supervivencia, se calculó la supervivencia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{\# individuos vivos en cada día}}{\text{\# individuos vivos al inicio}} \times 100$$

### **Determinación de la variación de peso**

Se determinó el peso promedio por individuo de los insectos que fueron pesados interdiariamente y se calculó la variación de peso mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Variación de peso (\%)} = \frac{\text{peso promedio en cada día (mg)}}{\text{peso promedio inicial (mg)}} \times 100$$

### **Determinación de la actividad similar a $\alpha$ -amilasa**

Para realizar esta medición se tomaron los grupos de individuos provenientes de tres viales. Para ello se realizó la extracción de sus proteínas; homogeneizándose los insectos, de cada vial, en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 2 mL de buffer acetato 50 mmol/L, pH 5; con 25 golpes (usualmente 2 min) a 1.000 rpm, en frío. Luego, se centrifugó la suspensión a 16.000 *g* durante 5 min y se recolectaron los sobrenadantes, a partir de los cuales se realizó la cuantificación de proteínas y la medición de actividad similar a  $\alpha$ -amilasa.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry y col. (1951). Se tomaron 50  $\mu$ L del sobrenadante y se completó el volumen a 0,5 mL con agua. Luego se agregaron 2,5 mL de solución de cobre alcalino y se dejó en reposo por 10 min. Posteriormente, se le agregaron 0,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteau (diluído 1:1 con agua), mezclándose inmediatamente en vórtex, y se dejó en reposo por 30 min. Por último, se midió la absorbancia de las muestras a 580 nm y se calculó la cantidad de proteínas mediante una curva de calibración; utilizando albúmina sérica bovina como patrón. La línea de regresión empleada fue  $Y = 0,0038X$ ;  $R^2 = 0,9978$ .

La medición de la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa se realizó tomando un volumen del sobrenadante que contuviera 50  $\mu$ g de proteínas y se completó a 500  $\mu$ L con buffer acetato 50 mmol/L, pH 5. Luego se añadieron 500  $\mu$ L de una solución al 1% de almidón soluble comercial (Fisher Scientific Inc., New Jersey, EE.UU.) gelatinizado, en el mismo buffer. Esta solución fue preparada calentando la preparación en una plancha con agitación, hasta que la muestra se observara traslúcida. Posteriormente, se incubó la mezcla a 37 °C por 5 min; deteniéndose la reacción con 1 mL del reactivo del ácido dinitrosalicílico. La medición de los azúcares liberados se realizó mediante el método de Hostettler y col.

(1951). Para ello, se incubó la mezcla muestra/reactivo en un baño en ebullición por 10 min, se dejó enfriar y se agregaron 15 mL de agua destilada, para luego medir la absorbancia a 545 nm. La cantidad de maltosa se obtuvo a partir de una curva de calibración; utilizando maltosa como patrón. La línea de regresión empleada fue  $Y = 0,3285X$ ;  $R^2 = 0,9991$ .

La actividad similar a  $\alpha$ -amilasa (actividad específica) se expresó como milimoles de maltosa liberados por segundo por kilogramo de proteína (mmol/s·kg) y fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$ASA \text{ (mmol/s} \cdot \text{kg)} = \frac{\text{maltosa liberada (mg)} \times 1000^c \times (10^6)^g}{1000^a \times 342^b \times 300^d \times 0,001^e \times 50^f}$$

ASA: actividad similar a  $\alpha$ -amilasa

<sup>a</sup>Factor de conversión de mg a g

<sup>b</sup>Masa molecular de la maltosa (g/mol)

<sup>c</sup>Factor de conversión de mol a mmol

<sup>d</sup>Tiempo de reacción (s)

<sup>e</sup>Volumen de reacción (L)

<sup>f</sup>Concentración de proteínas ( $\mu$ g/mL)

<sup>g</sup>Factor de conversión de  $\mu$ g/mL a kg/L

## Determinación de la composición corporal

### *Contenido de agua corporal*

La determinación del contenido de agua se realizó según el método establecido por la AOAC International (1984). Los insectos congelados, se secaron en estufa a 100 °C por 45 min y se pesaron. El proceso se repitió tantas veces como fue necesario, pero por tiempos de secado de 15 min, hasta que el peso fue constante.

El agua corporal se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Agua corporal (\%)} = \frac{\text{Pi día 8 (mg)} - \text{Pid (mg)}}{\text{Pi día 8 (mg)}} \times 100$$

Pi día 8: peso de los insectos al día 8

Pid: peso de los insectos deshidratados

### ***Contenido de grasa corporal***

La determinación del contenido de grasa se realizó mediante el método descrito por la AOAC International (1984). Los insectos deshidratados, se colocaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 2 mL de éter de petróleo (Riedel-deHaën®, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania) y se homogeneizaron, en frío, con 10 golpes a 1.000 rpm; trasvasándose la suspensión a un tubo de ensayo de dimensiones 75 x 10 mm. Luego se lavó el émbolo y el recipiente del homogeneizador con 1 mL de éter de petróleo, cada uno, y se añadieron a la suspensión anterior. Luego de que sedimentaron todas las partículas sólidas (usualmente 1 min), se trasvasó la solución con la grasa disuelta hacia vidrios de reloj previamente tarados, mediante la utilización de una pipeta Pasteur. Para este paso, se tomó todo el sobrenadante que se encontraba entre 1-2 mm por encima del sedimento. Este proceso de lavado se realizó varias veces sucesivas (entre 3 y 4 veces), agregando 2 mL de éter de petróleo al tubo de ensayo y trasvasando cada sobrenadante al vidrio de reloj, hasta que el éter en los tubos se observó traslúcido. Por último, se dejó evaporar el solvente de los vidrios de reloj y se pesaron.

La grasa corporal se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{\text{Peso grasa (mg)}^a}{\text{Pi día 8 (mg)}} \times 100$$

<sup>a</sup>Determinado a través de la diferencia de peso del vidrio de reloj.

Pi día 8: peso de los insectos al día 8

### ***Contenido de nitrógeno proteico y de nitrógeno cuticular***

El nitrógeno proteico es aquel que se encuentra en las proteínas corporales del insecto, mientras que el nitrógeno cuticular está asociado a la molécula de quitina que conforma el exoesqueleto. Ambos componentes deben ser separados para poder llevar a cabo el análisis, por lo que se realizó una extracción en solución alcalina de las proteínas corporales. Para ello, se incubó el material deshidratado y desgrasado (obtenido en la sección anterior) con 2 mL de NaOH 0,5 mol/L por 24 h, con agitación constante. Luego se centrifugó la suspensión a 16.000 g por 15 min para separar la proteína (material soluble) de la cutícula (material insoluble). Se agregó 1 mL de NaOH 0,5 mol/L al sedimento y se repitió el proceso de extracción por 24 h adicionales; combinándose ambos sobrenadantes al final de las extracciones.

Ambas fracciones (soluble e insoluble) fueron digeridas químicamente para la posterior cuantificación de nitrógeno. Para ello, las fracciones fueron colocadas en tubos de digestión (1 mL de la fracción soluble y la fracción insoluble completa envuelta en papel de filtro Whatman<sup>®</sup> N° 1 de 25 mm de diámetro) y se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (Fluka<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania) junto con una pequeña cantidad (58-61 mg) de catalizador de cobre (sulfato de cobre:sulfato de potasio, 1:9) (Riedel-deHaën<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania), en cada uno de ellos. La mineralización de la materia orgánica se realizó en un digestor Kjeldhal a 350 °C hasta que se logró la transparencia total de la muestra (usualmente 4 horas). Luego de la digestión y de que se enfriaron los tubos, se agregaron 5 mL de agua a cada uno y se midió el volumen final.

La cuantificación del nitrógeno en cada muestra se realizó mediante el método descrito por Cherry (1973) y modificado por Gómez-Sotillo (1997). Se tomaron 50 µL del

extracto proteico o del extracto cuticular, luego de la digestión, y se llevaron a un volumen final de 3 mL con agua destilada. Luego se agregaron 400  $\mu$ L de KOH 4 mol/L y se incubaron las muestras con 0,1 mL del reactivo de Nessler (Ricca Chemical Company, Arlington, TX, EE.UU.), por 10 min. Por último, se midió la absorbancia a 490 nm y se obtuvo la cantidad de nitrógeno a partir de una curva de calibración; utilizando sulfato de amonio como patrón. La línea de regresión utilizada fue  $Y = 0,0574X$ ;  $R^2 = 0,9974$ .

Los contenidos de nitrógeno proteico y de nitrógeno cuticular se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$NP (\%) = \frac{Abs_{490nm} \times V_{dig} \times V_{NaOH}}{m \times V_{mabs} \times 1000^a \times V_{mdig} \times Pi \text{ día } 8} \times 100$$

$$NC (\%) = \frac{Abs_{490nm} \times V_{dig}}{m \times V_{mabs} \times 1000^a \times Pi \text{ día } 8} \times 100$$

NP: nitrógeno proteico

NC: nitrógeno cuticular

Abs<sub>490nm</sub>: valor de absorbancia leído a 490 nm

m: valor de la pendiente de la curva de calibración ( $\mu$ g<sup>-1</sup>)

<sup>a</sup>Factor de conversión de  $\mu$ g a mg

Abs<sub>490nm</sub>: valor de absorbancia leído a 490 nm

V<sub>mabs</sub>: volumen de muestra tomado para el ensayo colorimétrico ( $\mu$ L)

V<sub>dig</sub>: volumen medido de la muestra digerida, luego de agregar 5 mL de agua ( $\mu$ L)

V<sub>mdig</sub>: volumen de muestra utilizado en la digestión (mL)

V<sub>NaOH</sub>: volumen de NaOH agregado a la muestra durante la extracción de proteínas corporales (mL)

Pi día 8: peso de los insectos al día 8 (mg)

### Excreción de ácido úrico

La extracción del ácido úrico excretado por los insectos se realizó según la metodología descrita por López (1999). Se tomaron los viales donde fueron mantenidos los gorgojos y se colocaron en la estufa a 100 °C por 1 h para deshidratar su contenido (restos de alimento y excretas). Luego se homogeneizó el contenido de los viales en un mortero,

hasta que el material tuvo el aspecto de polvo fino. El material homogeneizado se devolvió a los viales, arrastrando con un pincel el material remanente en el mortero. Se agregó un volumen suficiente de agua en ebullición a los viales (2 mL para los viales de ayuno, 4 mL para los viales con arvejas y almidón de maíz, 5 mL para los viales con los almidones de plátano) para disolver el ácido úrico presente; añadiéndose por las paredes del vial y directamente sobre la muestra. El criterio utilizado para la determinación del volumen de agua fue agregar la mínima cantidad que permitiera obtener un sobrenadante en el vial, luego de que la muestra se hubiera hidratado. Luego de agregar el agua al vial, se agitó en vórtex por 5 segundos y se trasvasó la mayor cantidad del sobrenadante directamente a tubos Eppendorf®; procesándose un vial a la vez. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 8.000 *g* durante 5 min.; y se combinaron los sobrenadantes provenientes del material de un mismo vial.

La cuantificación del ácido úrico contenido en el sobrenadante se realizó mediante la utilización de un estuche comercial (Industrias Qualitest C.A., Caracas). El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa produciendo, entre otros compuestos, peróxido de hidrógeno. Éste oxida al cromógeno (4-aminofenazona) en presencia de la peroxidasa produciendo un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ácido úrico en la muestra analizada. Para la determinación, se incubaron 25 µL del sobrenadante con 1 mL del reactivo de trabajo a 37 °C durante 10 min. Por último, se midió la absorbancia de la solución a 520 nm y se obtuvo la cantidad de ácido úrico a partir de una curva de calibración; utilizando ácido úrico como patrón. La línea de regresión utilizada fue  $Y = 0,1195X$ ;  $R^2 = 0,9972$ .

La excreción de ácido úrico se expresó como gramos de ácido úrico excretados por kilogramo de peso de los insectos al día 8 (g/kg) y fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{EAU (g/kg)} = \frac{\text{cantidad de ácido úrico (g)} \times \text{volumen de extracción (mL)} \times 1000^b}{25^a \times \text{Pi día 8 (kg)}}$$

EAU: excreción de ácido úrico

<sup>a</sup>Alícuota tomada para la determinación de ácido úrico

<sup>b</sup>Factor de conversión de  $\mu\text{L}$  a mL

Pi día 8: peso de los insectos al día 8

## Contenido de proteína en los almidones estudiados

Con la finalidad de complementar ciertos aspectos del estudio de la biodisponibilidad de los almidones, se estimó la cantidad de proteína cruda presente en las muestras de almidón. Este análisis se realizó con el método utilizado previamente en este trabajo para la cuantificación de las proteínas corporales y cuticulares del gorgojo de arroz, y no con el método establecido por la AOAC International (1990), por razones de tiempo.

Para ello, se colocaron 100 mg, en base seca, de la muestra de almidón en tubos de digestión, por triplicado, y se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (Fluka®, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania) junto con una pequeña cantidad (58-61 mg) de catalizador de cobre (sulfato de cobre:sulfato de potasio, 1:9) (Riedel-deHaën®, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania), en cada uno de ellos. La mineralización de la materia orgánica y la cuantificación de nitrógeno en cada muestra, se realizó tal y como se describe en la página 38.

El contenido de proteínas en los almidones se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína cruda (\%)} = \frac{\text{cantidad de nitrógeno (\mu g)} \times \text{Vdig}^b \times 6,25^d}{50^a \times 1000^c \times \text{Peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

<sup>a</sup>Alícuota tomada para la determinación de nitrógeno

<sup>b</sup>Volumen medido de la muestra digerida, luego de agregar 5 mL de agua (μL)

<sup>c</sup>Factor de conversión de μg a mg

<sup>d</sup>Factor de conversión de nitrógeno a proteína

## Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas de análisis de varianza de una vía para analizar los datos obtenidos. La normalidad de los datos se evaluó a través de la prueba Shapiro-Wilk, la homogeneidad de varianzas se analizó mediante la prueba Levene (desviaciones absolutas) y la prueba *a posteriori* utilizada fue Fisher LSD. Todos los análisis anteriores se realizaron mediante el programa estadístico OriginPro<sup>®</sup> versión 8.1 (2009) de OriginLab Inc. (Northampton, MA, EE.UU.). En todos estos análisis se utilizó  $p < 0,05$  como nivel de significancia.

Los análisis de correlación simple se realizaron mediante el programa estadístico Statistica<sup>®</sup> versión 9.1 (2010) de StatSoft Inc. (Tulsa, OK, EE.UU.).

Las regresiones lineales de las curvas de calibración se realizaron en el programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> versión 2007 (2008) de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE.UU.)

## Resultados y discusión

En el presente estudio se analizó la digestibilidad de almidones de cinco variedades de plátano mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de los almidones, se analizó el contenido de almidón potencialmente disponible y almidón resistente total. Además, se evaluó la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*, con la finalidad de conocer la velocidad a la que ocurre la digestión. En los ensayos *in vivo* se utilizó el bioensayo del gorgojo de arroz (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997) para la estimación de la biodisponibilidad de los almidones estudiados. En este bioensayo se realizó la determinación de los biomarcadores: supervivencia, variación de peso, actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, composición corporal y excreción de ácido úrico; como estimadores de la biodisponibilidad de los almidones.

### Digestibilidad *in vitro* de almidones

#### Almidón potencialmente disponible

En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón potencialmente disponible en los almidones de las variedades de plátano estudiadas. En todas las variedades el contenido de almidón potencialmente disponible fue mayor que 93%, a excepción de la variedad HH-12, cuyo tenor fue menor que 83%. Las variedades se pueden distribuir en tres grupos: el primero, conformado por las variedades hartón común y cambur 012 con un contenido de almidón potencialmente disponible muy alto (98 – 99%); un segundo grupo conformado por las variedades cambur negro y topocho cenizo

(93 – 94% de almidón potencialmente disponible) y el tercer grupo, formado por la variedad HH-12 (82 – 83% de almidón potencialmente disponible).

Debido a que las muestras analizadas son almidones aislados de cada variedad de plátano, el contenido de almidón potencialmente disponible que se observe reflejará la pureza que poseen estos almidones y por tanto, la eficacia del proceso de purificación. En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que todos los almidones poseen un alto grado de pureza, a excepción del almidón de la variedad HH-12.

La determinación del almidón potencialmente disponible también es un requisito para el análisis de la tasa de  $\alpha$ -amilólisis.

**Tabla III. Contenido de almidón potencialmente disponible y almidón resistente total de los almidones de las diferentes variedades de plátano.**

| <b>Almidón</b>        | <b>Almidón potencialmente disponible (%)</b> | <b>Almidón resistente total (%)</b> |
|-----------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Hartón común</b>   | 98,19 $\pm$ 3,03 <sup>a</sup>                | 63,10 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>       |
| <b>Cambur 012</b>     | 98,63 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>                | 55,52 $\pm$ 2,18 <sup>c</sup>       |
| <b>Cambur negro</b>   | 93,63 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>                | 56,49 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup>       |
| <b>HH-12</b>          | 82,44 $\pm$ 3,38 <sup>c</sup>                | 59,60 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>       |
| <b>Topocho cenizo</b> | 93,89 $\pm$ 2,23 <sup>b</sup>                | 60,85 $\pm$ 2,28 <sup>a,b</sup>     |

Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3) expresados sobre base seca. El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ; Prueba LSD de Fisher). El contenido de almidón potencialmente disponible y almidón resistente total del almidón de maíz (referencia del análisis de digestibilidad *in vivo*) fue 90,89  $\pm$  2,45% (n = 3) y 1,83  $\pm$  0,87% (n = 3), respectivamente. El estándar para la determinación del almidón potencialmente disponible fue almidón de papa (94,36  $\pm$  1,73%; n = 6). El estándar para la determinación del almidón resistente total fue Corn Flakes® (4,43  $\pm$  0,39%; n = 6).

Silva (2000) encontró un 88,79% de almidón potencialmente disponible, en muestras de almidón de hartón común. Para esta misma variedad de plátano, Galeno (2006) y Marín (2009) encontraron valores de almidón potencialmente disponible de 93,11 y 89,04%, respectivamente, los cuales son menores a los obtenidos en este trabajo para esta variedad. Debido a que en estos trabajos, el almidón potencialmente disponible fue determinado a través del mismo método (Holm y col., 1986), las diferencias encontradas pudieran estar dadas por variaciones intrínsecas del método de extracción del almidón, porque los frutos utilizados en cada caso procedan de diferentes lotes o que los frutos hayan sido recolectados con diferente grado de maduración (García y Lajolo, 1988).

La mayoría de las impurezas presentes en los almidones purificados corresponden a elementos como proteínas, grasas y cenizas, que podrían ser cuantificados a través de un análisis de composición proximal (Silva, 2000; Marín, 2009). Además, se podrían encontrar otros elementos como restos de la pared celular y otros polisacáridos no amiláceos que no son separados en el proceso de extracción (Marín, 2009).

### **Almidón resistente total**

El almidón resistente está presente en alimentos, tanto crudos como procesados, y su estudio es de gran importancia en el área nutricional, debido a que posee ciertas características que generan respuestas fisiológicas en los organismos que lo consumen. Estas respuestas fisiológicas han sido asociadas con aparentes beneficios a la salud, y están mediadas por los ácidos grasos de cadena corta (Tabla II) que se generan a partir de la fermentación del almidón resistente por la microflora colónica (Bird y col., 2000; Laurentin, 2004).

El método utilizado en el presente trabajo (Goñi y col., 1996) permite cuantificar la cantidad de almidón resistente perteneciente a gránulos nativos intrínsecamente resistentes ( $AR_2$ ) y almidón retrogradado ( $AR_3$ ), en las respectivas muestras de almidón. El método requiere que la muestra sea previamente molida, por lo que no permite cuantificar la cantidad de almidón inaccesible físicamente ( $AR_1$ ). Por esta razón, el almidón resistente total se refiere a la suma de  $AR_2$  y  $AR_3$ .

En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón resistente total en los almidones de las variedades de plátano estudiadas; encontrándose en un rango entre 55 y 64%. Los contenidos de almidón resistente total más altos fueron encontrados en las variedades hartón común y topocho cenizo (60 – 64%), seguidos por la variedad HH-12 (59 – 60%), mientras que los contenidos más bajos los presentaron las variedades cambur negro y cambur 012 (55 – 57%)

Dado que los almidones analizados son crudos, en el sentido de que no han sido sometidos a un proceso de gelatinización, la cantidad de almidón retrogradado ( $AR_3$ ) que podría encontrarse en ellos sería muy baja o incluso nula. Por esta razón, la mayoría del almidón resistente total encontrado en estos almidones se debe, principalmente, a fracciones de almidón intrínsecamente resistentes ( $AR_2$ ). Este hecho es consistente con el patrón de difracción de rayos X de tipo B o C que generalmente se atribuye a almidones nativos de cambures y plátanos (Jane y col., 1997, citado por Marín 2009; Marín, 2009), ya que almidones con este patrón de cristalinidad son altamente resistentes a la digestión enzimática (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992; Gallant y col., 1992; Bello-Pérez y col., 2000).

Silva (2000) encontró un 35,47% de almidón resistente total, en muestras de almidón de hartón común. Para esta misma variedad de plátano, Galeno (2006) y Marín

(2009) encontraron valores de almidón resistente total de 35,71 y 49,24%, respectivamente, los cuales son menores a los obtenidos en este trabajo para esta variedad. En todos estos estudios, el almidón resistente total fue determinado a través del mismo método utilizado en el presente trabajo: Goñi y col. (1996). En otro estudio realizado por Englyst y Cummings (1986), se encontró que el contenido de almidón resistente total en cambur y plátano era de 53,6 y 67,7%, respectivamente, lo cual se asemeja a los datos obtenidos en el presente trabajo; sin embargo, no especifican que variedades fueron analizadas y el método para la determinación del almidón resistente total fue diferente (Englyst y col., 1992).

Todos los estudios concuerdan con la idea de que los almidones de plátano poseen una alta cantidad de almidón resistente a la digestión por parte de las enzimas hidrolíticas del intestino delgado. Además, todos los almidones de plátano estudiados se encontrarían en el grupo de alimentos con una cantidad de almidón resistente total “muy alta” (más del 15%), según la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996). Este hecho se corresponde con la baja digestibilidad generalmente atribuida a esta fuente, cuando se consumen crudos (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992).

### **Tasa de $\alpha$ -amilólisis *in vitro***

La tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* aporta información sobre la cinética de la digestión de los almidones, es decir, la cantidad de almidón que es hidrolizado en el tiempo. Este parámetro puede depender de la morfología, estructura cristalina, relación amilosa/amilpectina, grado de gelatinización, entre otros, del gránulo del almidón (Holm y col., 1985; Gallant y col., 1992; Björck y col., 1994).

Se ha observado que la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* se correlaciona con algunas respuestas fisiológicas, como los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, por lo que su estudio ha sido de importancia en el análisis de la biodisponibilidad de almidones (Holm y col., 1985).

Este parámetro de digestibilidad *in vitro* fue evaluado a través del método descrito por Holm y col. (1985), que se basa en la incubación de la muestra con  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina y la posterior cuantificación de los azúcares reductores liberados, en el tiempo. El almidón de maíz gelatinizado se incluyó como referencia, y el estudio de la cinética de hidrólisis se basó en el análisis de la velocidad inicial y magnitud final de la hidrólisis. La velocidad inicial fue definida como la proporción de almidón hidrolizada en los primeros 15 minutos del ensayo; mientras que, la magnitud final fue establecida como la fracción del almidón que se hidrolizó al cabo de los 60 minutos de duración del ensayo (Tovar y col., 1990, citado por Laurentin, 1999).

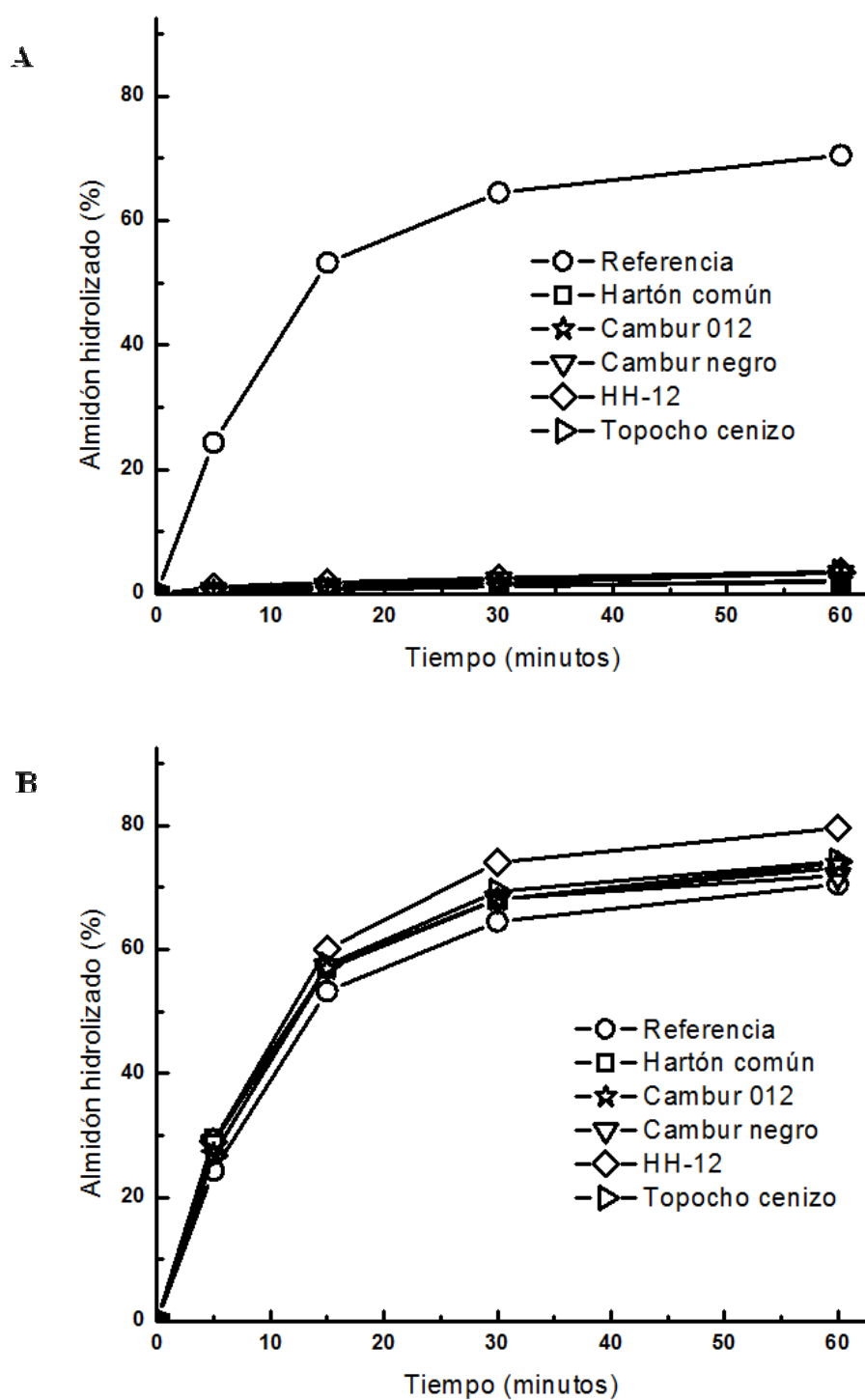
En la Figura 4A se muestran las tasas de  $\alpha$ -amilólisis de los almidones crudos de plátano y en la Tabla IV la velocidad inicial y magnitud final. Todos los almidones evaluados presentaron una velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis muy baja (en promedio: 0,6 – 1,9% y 2,0 – 3,6%, respectivamente), que además fueron mucho menores que las presentadas por el almidón de maíz gelatinizado utilizado como referencia (Tabla IV).

Las tasas de  $\alpha$ -amilólisis de los almidones de plátano gelatinizados se muestran en la Figura 4B y en la Tabla IV la velocidad inicial y magnitud final; pudiéndose apreciar una velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis mucho mayor, con respecto a los almidones crudos. En este caso, todos los almidones presentaron un comportamiento bastante similar, con velocidades iniciales entre 57 y 61%, y magnitudes finales de hidrólisis comprendidas

entre 72 y 80%, en promedio. De todos los almidones gelatinizados evaluados, el correspondiente a la variedad HH-12 fue el que presentó los mayores valores de velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis. No obstante, no se encontraron grandes diferencias entre los comportamientos de los almidones de plátano o entre éstos y el almidón de maíz.

La baja tasa de hidrólisis enzimática de los almidones crudos podría estar dada por el alto contenido de AR<sub>2</sub>, debido al patrón de difracción de rayos X de tipo B o C que generalmente presentan este tipo de fuentes botánicas (Jane y col., 1997, citado por Marín 2009; Marín, 2009). Este factor podría influir en el grado de acceso que tienen las enzimas al gránulo, limitando el grado de hidrólisis que pueda ocurrir (Gallant y col., 1992). En los almidones gelatinizados la tasa de hidrólisis aumenta de gran manera debido a que el proceso de gelatinización produce un hinchamiento del gránulo y la desorganización de las moléculas de amilosa y amilopectina contenidas en él; perdiéndose la cristalinidad y el AR<sub>2</sub>. Este hecho conlleva a que las enzimas puedan acceder a una mayor cantidad de sustrato y se dé un mayor grado de hidrólisis del almidón (Colonna y col., 1992).

En estudios realizados por Silva (2000) y Marín (2009) se encontró una baja tasa de  $\alpha$ -amilólisis del almidón crudo de hartón común, con magnitudes finales de hidrólisis menores a 6,5%. Galeno (2006) y Marín (2009) evaluaron la tasa de  $\alpha$ -amilólisis del almidón de hartón común gelatinizado; encontrándose magnitudes finales de hidrólisis alrededor de 50%, en ambos casos. En el presente estudio, se encontró una magnitud final de hidrólisis, del almidón de hartón común crudo, similar. No obstante, la magnitud final de hidrólisis del almidón gelatinizado, de esta misma variedad, fue mayor (73%; Tabla IV). En conjunto, todos los estudios demuestran la baja tasa de  $\alpha$ -amilólisis de los almidones crudos de plátano evaluados, lo cual concuerda con la baja digestibilidad generalmente atribuida a esta fuente (Englyst y col., 1986; Englyst y col., 1992).



**Figura 4. Tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* de los almidones de plátano.**

A. Almidones nativos. B. Almidones gelatinizados. Los valores representan el promedio de dos determinaciones (Tabla IV). Se incluyó almidón de maíz gelatinizado como referencia ( $n = 4$ ).

**Tabla IV. Velocidad inicial y magnitud final de la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* de los almidones de plátano.**

| Almidón               | Almidón crudo         |                    | Almidón gelatinizado  |                    |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                       | Velocidad inicial (%) | Magnitud final (%) | Velocidad inicial (%) | Magnitud final (%) |
| <b>Hartón común</b>   | 0,05                  | 1,00               | 57,3                  | 73,1               |
|                       | 1,48                  | 2,90               | 56,7                  | 73,4               |
| <b>Cambur 012</b>     | 0,74                  | 2,12               | 56,2                  | 72,9               |
|                       | 0,53                  | 2,28               | 57,7                  | 75,1               |
| <b>Cambur negro</b>   | 1,22                  | 3,34               | 57,8                  | 72,1               |
|                       | 1,33                  | 3,45               | 56,7                  | 71,9               |
| <b>HH-12</b>          | 1,80                  | 3,61               | 60,1                  | 79,1               |
|                       | 1,91                  | 3,60               | 60,1                  | 80,1               |
| <b>Topocho cenizo</b> | 0,80                  | 3,38               | 58,6                  | 74,8               |
|                       | 0,90                  | 3,66               | 56,5                  | 73,7               |

Los valores corresponden a las dos réplicas de cada muestra. La velocidad inicial se refiere a la proporción de almidón hidrolizada en los primeros 15 min del ensayo, mientras que la magnitud final se refiere a la proporción de almidón que se hidrolizó luego de los 60 min de duración del experimento. El estándar para la determinación de la tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* fue el almidón de maíz: los valores obtenidos para el almidón crudo fueron 3,34 y 2,81% para la velocidad inicial, y 7,96 y 9,60% para la magnitud final. Los valores obtenidos para el almidón gelatinizado fueron  $53,3 \pm 0,9\%$  ( $n = 4$ ) para la velocidad inicial, y  $70,6 \pm 1,0\%$  ( $n = 4$ ) para la magnitud final.

## Digestibilidad *in vivo* de almidones

### Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de plátano

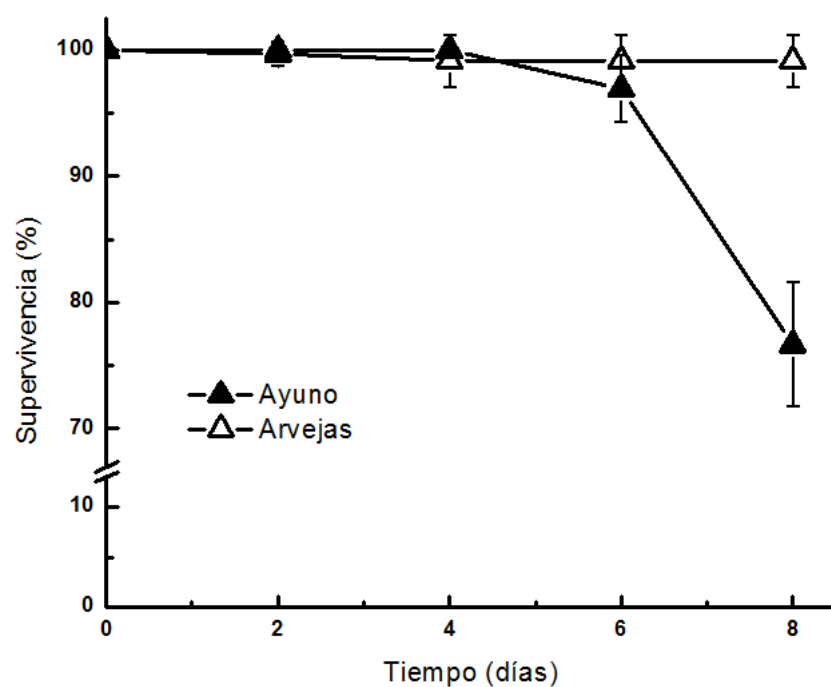
El bioensayo del gorgojo del arroz ha sido utilizado como modelo en diversos estudios nutricionales (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998; López, 1999; Carmona y col., 2001; García, 2003; Galeno, 2006; Gamero y col., 2010). Uno de los biomarcadores evaluados en este bioensayo, como es la supervivencia, ha servido para

evaluar el efecto tóxico de ciertas dietas. En estos ensayos, se colocan grupos de insectos con las diferentes dietas y se evalúa la supervivencia a lo largo de 8 a 30 días. Además, se colocan grupos de insectos en condiciones de ayuno, paralelamente al resto de las dietas. En caso de observarse una supervivencia menor, en cualquiera de las dietas, con respecto a la condición de ayuno, se considera que dicha dieta contiene factores tóxicos para los insectos (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998; López, 1999; Gamero y col., 2010).

En la Figura 5 se muestra la supervivencia de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo, a lo largo de ocho días. La supervivencia de los insectos a los que se les suministró la dieta de arvejas no varió a lo largo del tiempo; manteniéndose en  $99,1 \pm 2,1\%$  ( $n = 9$ ). La supervivencia de los insectos mantenidos en ayuno disminuyó a partir del día 6; encontrándose un porcentaje de supervivencia de  $76,7 \pm 4,9\%$  para el día 8.

La muerte de los insectos mantenidos en ayuno ocurre cuando se han generado cambios irreversibles en el funcionamiento de sistemas enzimáticos esenciales, como la cadena respiratoria, producto del consumo de las reservas corporales de grasa y especialmente de proteínas (Kleiber, 1975; citado por García, 2003).

En algunos estudios recientes, en los cuales se utilizó el bioensayo del gorgojo de arroz, la supervivencia de los insectos mantenidos en ayuno se encontró entre 70 y 81%, para el día 8, mientras que la supervivencia de los insectos a los que se les suministró una dieta con arvejas fue del 100% a lo largo de todo el tiempo de experimentación (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col. 1998; García, 2003; Galeno, 2006). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio para la supervivencia de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo.



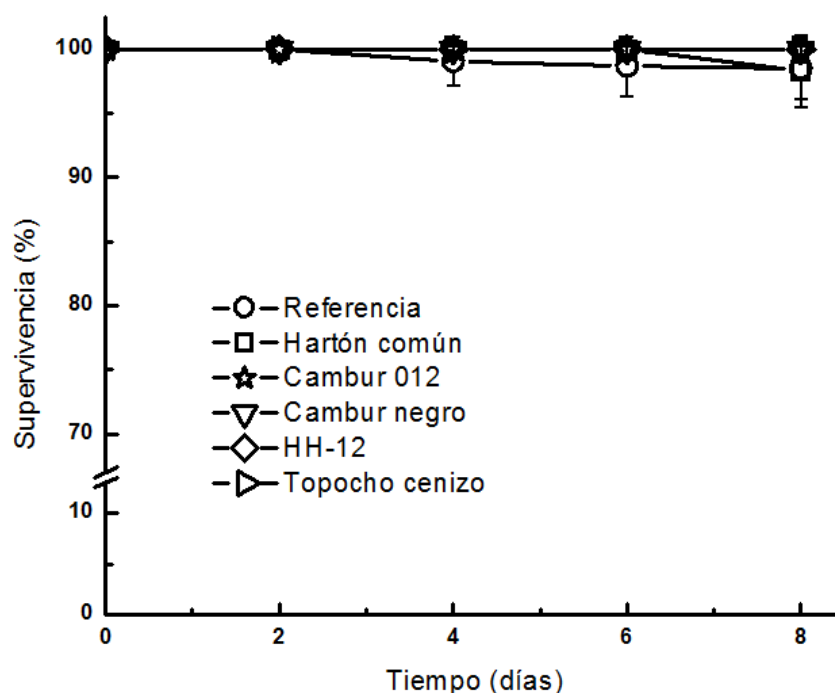
**Figura 5. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo.**

Las barras indican la desviación estándar de la media ( $n = 6$  para ayuno y  $n = 9$  para arvejas).

La dieta de arvejas es un control del experimento debido a que los insectos son mantenidos con este alimento en los cultivos madre. Además, esta dieta de arvejas parece satisfacer los requerimientos nutricionales del insecto. La condición de ayuno se utiliza como control debido a que los insectos mantenidos en esta condición son más susceptibles a sufrir cambios en los diferentes biomarcadores producto de su manipulación durante la duración del bioensayo. De esta manera, se puede evaluar si se produce una mala manipulación de los insectos; observándose una disminución en la supervivencia, de aquellos mantenidos en ayuno, por debajo del 50%.

En la Figura 6 se muestra el porcentaje de supervivencia de los insectos mantenidos en las dietas de almidones de plátano, a lo largo de ocho días. La supervivencia de los

insectos a los que se les suministró la dieta de referencia (almidón de maíz) fue de  $98,5 \pm 2,3\%$  ( $n = 18$ ) al día 8; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la dieta de arvejas (Figura 5). La supervivencia de los insectos a los que se les suministró una dieta con los almidones de plátano, variedades: hartón común, cambur 012, cambur negro, HH-12 o topocho cenizo, se mantuvo entre 98 y 100% a lo largo de los ocho días de duración del experimento, y no se encontraron diferencias significativas con respecto a la referencia.



**Figura 6. Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y las dietas de almidones de plátano.**

La referencia utilizada fue el almidón de maíz. Las barras indican la desviación estándar de la media ( $n = 18$  para la referencia y  $n = 6$  para el resto de los almidones).

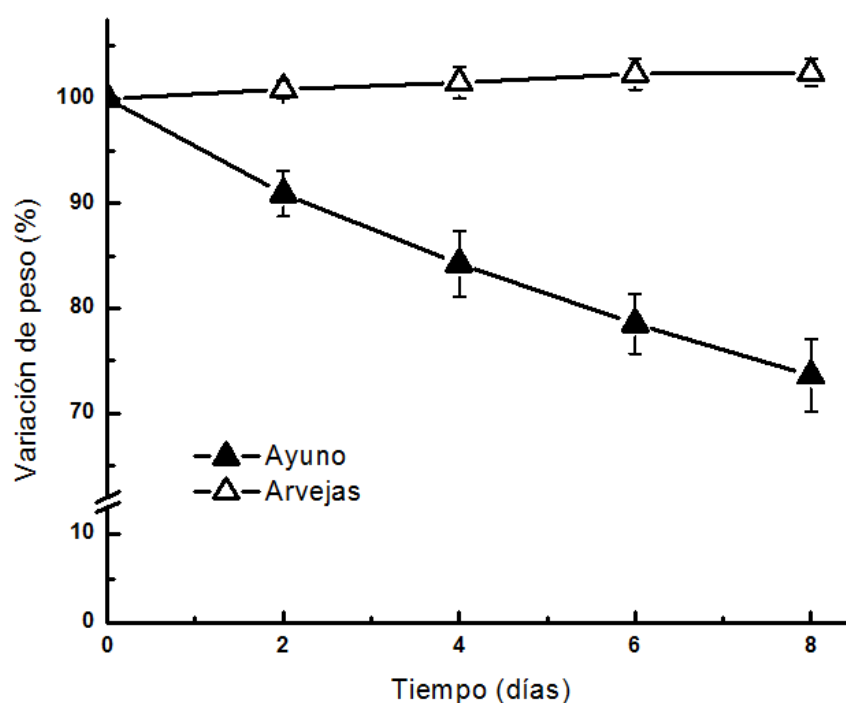
Galeno (2006) encontró una supervivencia de 95% en insectos alimentados con almidón nativo de maíz. Además, encontró una supervivencia de 85%, aproximadamente, para la dieta de almidón de hartón común, y ésta fue ligeramente mayor a la de su respectivo ayuno (81%). También encontró una supervivencia de 85%, aproximadamente, en insectos alimentados con almidón de papa. Esta autora justifica la disminución en la supervivencia de los insectos alimentados con almidón de hartón común, en base a que este almidón presenta una baja digestibilidad *in vitro*, similar a la que se encuentra para el almidón de papa. No obstante, García (2003) encontró una supervivencia, en insectos alimentados con almidón de papa, que no fue significativamente diferente al 100% y que, además, fue la misma que en el caso de insectos alimentados con almidón de maíz.

La supervivencia encontrada en este trabajo para los insectos alimentados con los almidones de plátano de las cinco variedades fue similar a lo encontrado por García (2003), ya que, a pesar de que estos almidones presentaron una baja digestibilidad *in vitro*, la supervivencia no fue significativamente diferente al 100% a lo largo del tiempo de duración del bioensayo. Además, este biomarcador no resultó ser un buen estimador de la biodisponibilidad de los almidones de plátano, ya que no se observaron diferencias significativas entre estas dietas o entre ellas y la dieta de referencia.

### **Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con los almidones de plátano**

La Figura 7 muestra la variación de peso de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo, a lo largo de ocho días. La dieta de arvejas generó un ligero incremento de peso en los insectos, ya que al día 8 se registró un peso que representó el  $102 \pm 1\%$  ( $n = 9$ ) del peso inicial. La condición de ayuno generó una disminución

progresiva en el peso de los insectos a lo largo de la duración del experimento; registrándose un peso al día 8 que correspondió al  $74 \pm 3\%$  ( $n = 6$ ) del peso inicial. La disminución progresiva del peso de los insectos mantenidos en ayuno se ha observado en estudios previos y ha sido explicada por la utilización de las reservas corporales; disminuyéndose así, la cantidad de agua, grasa y proteínas, registradas en los insectos (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998), como se discutirá más adelante.



**Figura 7. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo.**

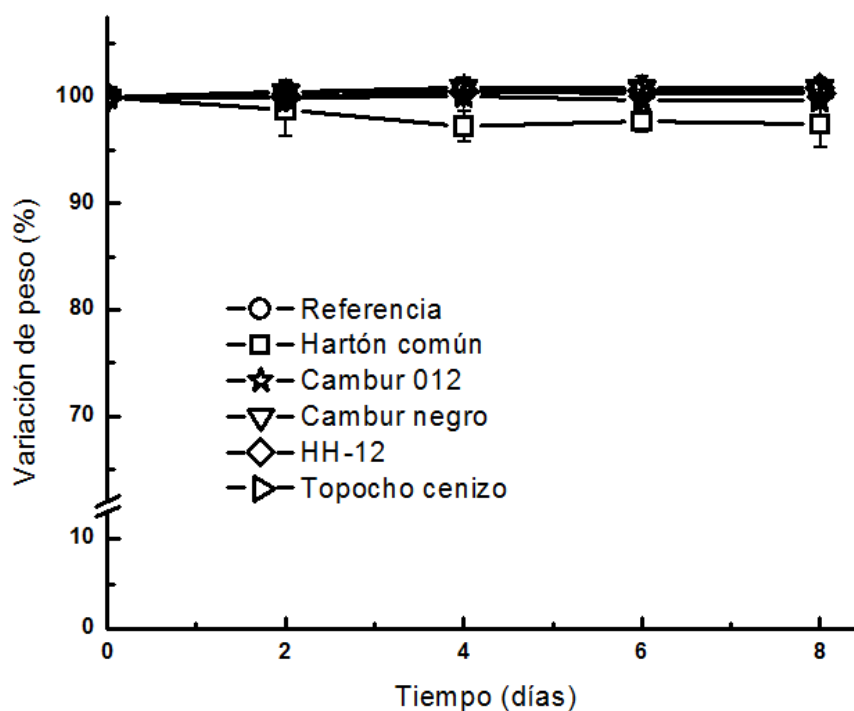
Las barras indican la desviación estándar de la media ( $n = 6$  para ayuno y  $n = 9$  para arvejas).

En otros estudios en los que se ha utilizado el gorgojo de arroz, se han observado comportamientos similares en cuanto a la variación de peso de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo; encontrándose variaciones de peso al día 8 de 70-80% y

100-120% en la condición de ayuno y la dieta de arvejas, respectivamente (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col. 1998; García, 2003; Galeno, 2006).

En la Figura 8 se muestra la variación de peso de los insectos mantenidos en las dietas de almidones, a lo largo de ocho días. La dieta de referencia generó un aumento de peso similar al encontrado en la dieta de arvejas (Figura 7); encontrándose un peso al día 8 correspondiente al  $101 \pm 1\%$  ( $n = 18$ ) del peso inicial. Las variaciones de peso de los insectos a los que se les suministró una dieta con los almidones de plátano, variedades: hartón común, cambur 012, cambur negro, HH-12 o topocho cenizo, no presentaron diferencias significativas con respecto a la de la dieta de referencia; encontrándose variaciones de peso al día 8 en un rango entre 98 y 101%.

En estudios previos se han encontrado variaciones de peso en gorgojos alimentados con almidón de maíz nativo similares a las observadas al suministrarles una dieta de arvejas (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col. 1998; Galeno, 2006), tal como en este trabajo. Además, Galeno (2006) encontró variaciones de peso al día 8 cercanas al 85% en insectos alimentados con almidón nativo de plátano variedad hartón común, probablemente generadas por la baja digestibilidad *in vitro* presentada por este almidón. No obstante, en el presente trabajo no se encontraron diferencias entre las variaciones de peso de insectos alimentados con la dieta de arvejas, el almidón de referencia o los diferentes almidones de plátano, por lo es probable que todas estas dietas proporcionen un aporte de nutrientes adecuado para cubrir los requerimientos nutricionales del insecto.



**Figura 8. Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y los almidones de plátano.**

La referencia utilizada fue el almidón de maíz. Las barras indican la desviación estándar de la media ( $n = 18$  para la referencia y  $n = 6$  para el resto de los almidones).

El biomarcador variación de peso podría estar afectado por los niveles de ingesta de cada uno de estos almidones, por parte del insecto (García, 2003; Galeno, 2006); desafortunadamente, la medición de la ingesta no fue incluida en los objetivos del presente trabajo. En base a los resultados obtenidos, podría decirse que este biomarcador no parece ser un buen estimador de la biodisponibilidad de los almidones de plátano, ya que no se observaron diferencias significativas entre estas dietas o entre ellas y la dieta de referencia.

### **Cambios en la composición corporal**

La composición corporal es un indicador que refleja la cantidad de los nutrientes que se ingieren, además de ser una herramienta importante para el análisis de transacciones metabólicas, identificación de cambios adaptativos y la evaluación del estado nutricional (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). A través de reacciones complejas, los alimentos son transformados para obtener energía; dicho proceso es sometido a una eficiente regulación homeostática que puede desequilibrarse cuando la dieta ingerida no se ajusta a las necesidades o es de mala calidad (García, 2003).

En la Tabla V se muestra el peso promedio y la composición corporal de los insectos alimentados con las dietas controles del bioensayo. El peso promedio al día 8 fue significativamente menor (cambio porcentual: -24%;  $p < 0,05$ ) en la condición de ayuno con respecto a la dieta de arveja. Tanto el agua como la grasa corporal encontrada en insectos mantenidos en ayuno fueron menores a las encontradas en insectos alimentados con arvejas, mientras que el nitrógeno proteico y el nitrógeno cuticular de los insectos mantenidos en ayuno fueron mayores a aquellos a los que se les suministró una dieta de arvejas (Tabla V).

Una manera alternativa de mostrar las relaciones entre la composición corporal de los insectos mantenidos en las dietas controles del bioensayo es calculando el cociente ayuno/alimentado. Este cociente representa la relación entre las condiciones de ayuno y alimentada para cada componente de la composición corporal y se calculó dividiendo las cantidades absolutas (en miligramos) de cada biomarcador en el ayuno entre la condición alimentada (con la dieta de arvejas) al día 8. En estos resultados se destaca la marcada disminución en el agua corporal, la grasa corporal y el nitrógeno proteico de los insectos mantenidos en la condición extrema de ayuno (Tabla VI).

**Tabla V. Peso promedio y composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles del bioensayo, de referencia y de almidones de plátano.**

| <b>Dieta</b>          | <b>Peso promedio al día 8 (mg)</b> | <b>Agua corporal (%)</b> | <b>Grasa corporal (%)</b> | <b>Nitrógeno proteico (%)</b> | <b>Nitrógeno cuticular (%)</b> | <b>Otros (%)</b> |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------|
| <b>Ayuno</b>          | $1,27 \pm 0,04^b$                  | $47,7 \pm 0,4^{b,c}$     | $6,8 \pm 0,2^e$           | $2,65 \pm 0,04^a$             | $3,21 \pm 0,21^a$              | $39,7 \pm 0,4$   |
| <b>Arvejas</b>        | $1,68 \pm 0,05^a$                  | $50,0 \pm 0,1^a$         | $11,1 \pm 1,5^d$          | $2,19 \pm 0,04^c$             | $2,20 \pm 0,03^c$              | $34,5 \pm 1,4$   |
| <b>Referencia</b>     | $1,62 \pm 0,07^a$                  | $46,8 \pm 0,4^{c,d,e}$   | $16,1 \pm 0,4^{a,b}$      | $2,03 \pm 0,08^d$             | $2,25 \pm 0,05^{b,c}$          | $32,8 \pm 0,7$   |
| <b>Hartón común</b>   | $1,58 \pm 0,06^a$                  | $46,2 \pm 1,6^{b,c,d}$   | $13,5 \pm 0,8^c$          | $1,87 \pm 0,04^e$             | $2,45 \pm 0,10^b$              | $36,0 \pm 0,8$   |
| <b>Cambur 012</b>     | $1,59 \pm 0,05^a$                  | $46,1 \pm 0,5^{d,e}$     | $16,4 \pm 0,5^a$          | $1,91 \pm 0,14^{d,e}$         | $2,16 \pm 0,14^c$              | $33,4 \pm 0,4$   |
| <b>Cambur negro</b>   | $1,66 \pm 0,05^a$                  | $45,7 \pm 1,0^e$         | $15,2 \pm 1,2^{a,b}$      | $2,34 \pm 0,06^b$             | $2,43 \pm 0,12^b$              | $34,3 \pm 0,8$   |
| <b>HH-12</b>          | $1,58 \pm 0,04^a$                  | $48,1 \pm 0,2^b$         | $14,9 \pm 0,8^{b,c}$      | $1,91 \pm 0,07^{d,e}$         | $2,17 \pm 0,12^c$              | $32,9 \pm 0,6$   |
| <b>Topocho cenizo</b> | $1,65 \pm 0,09^a$                  | $46,7 \pm 0,7^{c,d,e}$   | $16,0 \pm 0,7^{a,b}$      | $2,01 \pm 0,11^{d,e}$         | $2,26 \pm 0,15^{b,c}$          | $33,0 \pm 0,5$   |

Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). La referencia utilizada fue el almidón de maíz. El peso promedio al día 0 no fue significativamente diferente entre las dietas ( $1,63 \pm 0,03$ ,  $n = 8$ ). El análisis de varianza de una vía, realizado para cada variable, mostró que las medias dentro de cada columna, con letras distintas como superíndice, son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ; Prueba LSD de Fisher).

**Tabla VI. Cociente ayuno/alimentado para el bioensayo del gorgojo de arroz.**

| <b>Biomarcador</b>         | <b>Cociente ayuno/alimentado*</b> |
|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Agua corporal</b>       | 0,64                              |
| <b>Grasa corporal</b>      | 0,42                              |
| <b>Nitrógeno proteico</b>  | 0,76                              |
| <b>Nitrógeno cuticular</b> | 0,91                              |

\* El cociente ayuno/alimentado fue calculado a partir de los promedios de los contenidos absolutos (en miligramos) de cada biomarcador al día 8. Para la condición alimentada se utilizó la dieta de arvejas.

La disminución, tanto del agua corporal como de la grasa corporal y el nitrógeno proteico, de los insectos mantenidos en ayuno, con respecto a aquellos a los que se les suministró arvejas, se debe principalmente a que se no se suministró agua ni alimento en la primera condición; produciéndose la utilización de las reservas corporales de la grasa, el agua y las proteínas corporales para suplir los requerimientos calóricos y demás requerimientos fisiológicos y metabólicos del organismo (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col. 1998; Carmona y col., 2001; García, 2003; Galeno, 2006).

El cociente ayuno/alimentado para el nitrógeno cuticular sólo disminuyó ligeramente (Tabla IV) porque, probablemente, los insectos alimentados con arvejas pudieron continuar su proceso de crecimiento y síntesis del exoesqueleto, mientras que los insectos en ayuno no tuvieron los nutrientes necesarios para llevar a cabo este proceso.

### ***Agua corporal***

La composición corporal de insectos alimentados con la dieta de referencia y los almidones de plátano se muestra en la Tabla V y el contenido de humedad de los almidones estudiados se muestra en la Tabla VII. Entre los biomarcadores que conforman la composición corporal, el agua corporal encontrada en insectos alimentados con la referencia y los almidones de plátano varió de 45 a 49%. Entre las dietas de almidones de referencia, hartón común, cambur 012, cambur negro o topocho cenizo, no se encontraron diferencias significativas. El agua corporal encontrada en insectos alimentados con el almidón de plátano de la variedad HH-12 fue ligera, pero significativamente, mayor a la encontrada en insectos a los que se les suministraron las demás dietas de almidones. Este hecho podría deberse a que el almidón de HH-12 presenta los mayores contenidos de humedad (Tabla VII); sin embargo, los demás almidones también presentaron diferencias en cuanto a su contenido de humedad, y el agua corporal de los insectos alimentados con estas dietas no parece tener la misma tendencia de variación (Tabla V), por lo que es probable que la humedad de los almidones no afecte a este biomarcador. No obstante, las diferencias encontradas en el agua corporal de los insectos alimentados con el almidón de HH-12, con respecto a aquellos alimentados con los demás almidones, podrían estar influenciadas por diferentes niveles de ingesta de cada una de las dietas por parte de los insectos. Sobre la base de estos resultados, este biomarcador no parece ser un estimador de la biodisponibilidad de los almidones de plátano.

**Tabla VII. Contenido de humedad del almidón de referencia y de los almidones de plátano.**

| <b>Almidón</b>        | <b>Contenido de humedad (%)</b> |
|-----------------------|---------------------------------|
| <b>Referencia</b>     | 10,20                           |
| <b>Hartón común</b>   | 11,14                           |
| <b>Cambur 012</b>     | 12,85                           |
| <b>Cambur negro</b>   | 9,72                            |
| <b>HH-12</b>          | 14,71                           |
| <b>Topocho cenizo</b> | 9,02                            |

La referencia corresponde al almidón de maíz. El contenido de agua de los almidones fue determinado por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos “Mercedes Baragaño de Mosqueda” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

### ***Grasa corporal***

La grasa corporal de los insectos alimentados con la dieta de referencia y los almidones de plátano, se muestra en la Tabla V. Entre los insectos alimentados con los diferentes almidones, aquellos que se mantuvieron bajo la dieta de referencia, almidón de cambur 012 o almidón de topocho cenizo, presentaron mayor contenido de grasa (16 – 17 %) que los insectos mantenidos bajo la dietas de almidones de cambur negro, HH-12 y hartón común (13 – 16%). Los contenidos de grasa observados se encontraron en un rango comprendido entre 13 y 17%; consiguiéndose la mayor acreción grasa en los insectos alimentados con el almidón de cambur 012 y la menor acreción grasa, en los alimentados con el almidón de hartón común.

Las diferencias encontradas en la grasa corporal de los insectos a los que se les suministraron las dietas de almidones, podrían estar dadas por las diferencias encontradas en la digestibilidad *in vitro* de cada uno de estos almidones. En este sentido, mientras mayor sea la digestibilidad de un almidón, mayor será el número de unidades de glucosa que potencialmente podrían ser absorbidas y, en caso de que exista un exceso calórico, ser almacenadas en forma de grasa. No obstante, el contenido proteico de los almidones podría influir en la acreción grasa por parte del insecto, ya que, como lo demostró López (1999), un mayor contenido de proteínas en el alimento podría estar relacionado con una acreción grasa menor por parte del insecto.

El contenido de proteína cruda de los almidones fue determinado con la finalidad de evaluar si existía alguna relación con los niveles de grasa corporal o nitrógeno proteico (ver página 67) observados en los insectos alimentados con estos almidones. En la Tabla VIII se aprecia que el contenido proteico de los almidones osciló entre 0,8 y 1,8%, a excepción del almidón de HH-12 que tuvo un contenido proteico de 4,1%. En este sentido, era de esperarse valores bajos de proteínas, ya que se trata de almidones purificados. No obstante, el mayor contenido de proteínas del almidón de HH-12 concuerda con que haya presentado la menor pureza (estimada por el tenor de almidón potencialmente disponible; Tabla III).

Con la finalidad de relacionar cuantitativamente las respuestas biológicas observadas *in vivo* con los indicadores de la biodisponibilidad evaluados *in vitro*, se realizaron análisis de correlación simple entre estos resultados. Los indicadores de digestibilidad *in vitro* utilizados fueron el contenido de almidón potencialmente disponible, de almidón resistente total, la velocidad inicial y la magnitud final de  $\alpha$ -amilólisis de los almidones crudos (ya que los insectos consumieron almidones crudos). Los biomarcadores considerados como principales estimadores de la digestibilidad *in vivo* fueron la grasa

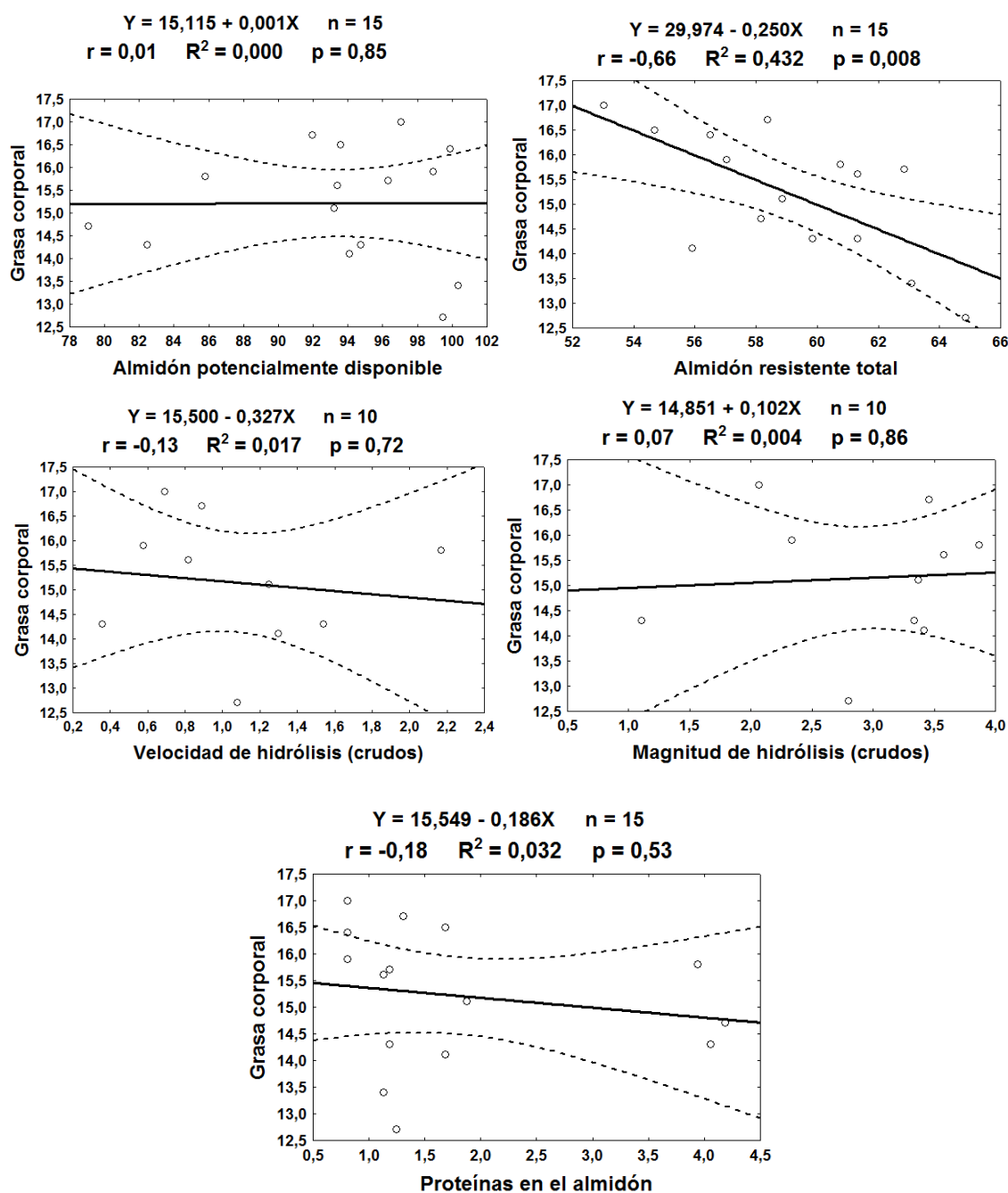
corporal, la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y la excreción de ácido úrico. Se eligió la correlación simple a pesar de que la regresión múltiple es un análisis más apropiado, debido a que es necesario hacer la corrección de los biomarcadores por la ingesta de cada dieta para poder realizarlo (como Galeno, 2003 y García, 2006). Esta corrección no se pudo realizar en el presente trabajo debido a que la ingesta no fue evaluada. En los análisis de correlación simple, también se incluyó la variable contenido de proteína cruda del almidón, ya que puede influir sobre la acreción grasa y la excreción de ácido úrico, de los insectos, según fue demostrado por López (1999).

El análisis de correlación simple (Figura 9), sólo mostró correlación negativa ( $R^2 = 0,43$ ;  $p = 0,008$ ) para los valores del biomarcador grasa corporal con el tenor de almidón resistente total presente en los almidones.

**Tabla VIII. Contenido de proteínas del almidón de referencia y de los almidones de plátano.**

| <b>Almidón</b>        | <b>Proteína Cruda (%)</b> |
|-----------------------|---------------------------|
| <b>Referencia</b>     | $0,29 \pm 0,03^e$         |
| <b>Hartón común</b>   | $1,19 \pm 0,06^c$         |
| <b>Cambur 012</b>     | $0,81 \pm 0,00^d$         |
| <b>Cambur negro</b>   | $1,75 \pm 0,11^b$         |
| <b>HH-12</b>          | $4,06 \pm 0,13^a$         |
| <b>Topocho cenizo</b> | $1,21 \pm 0,09^c$         |

La referencia corresponde al almidón de maíz. Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ) expresados sobre base seca. El análisis de varianza de una vía mostró que las medias con letras distintas como superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ; Prueba LSD de Fisher).



**Figura 9.** Gráficos de dispersión entre el biomarcador grasa corporal y los parámetros de digestibilidad *in vitro* del almidón y su contenido de proteína cruda.

En todos los gráficos se muestra la línea de regresión y su intervalo de confianza, la ecuación de la regresión lineal, el coeficiente de Pearson ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor de significancia ( $p$ ) para cada correlación simple efectuada.

Galeno (2006) encontró una disminución en la acreción grasa de un 40%, en insectos alimentados con almidón de hartón común comparados con insectos alimentados con almidón de maíz, en concordancia a lo observado en el presente estudio a pesar de que, en éste caso, la diferencia no fue tan alta (cambio porcentual:  $-16\%$ ;  $p < 0,05$ ). Además, encontró que la acreción grasa estaba correlacionada, principalmente con la cantidad de almidón resistente total presente en los almidones, mientras que el contenido de proteína en el almidón no influyó sobre este parámetro, como en el presente trabajo. Este hecho demuestra las capacidades que tienen el biomarcador grasa corporal como estimador de la digestibilidad *in vivo* de estos almidones, y el análisis de correlación simple como método estadístico de correlación, ya que en este estudio no se corrigió el biomarcador por la ingesta ni se utilizó un análisis de regresión múltiple y se encontraron los mismos resultados que en el estudio llevado a cabo por Galeno (2006).

### ***Nitrógeno proteico***

El nitrógeno proteico de insectos alimentados con la dieta de referencia y los almidones de plátano, se muestra en la Tabla V. Los insectos alimentados con los diferentes almidones, presentaron un contenido de nitrógeno proteico en el rango de  $1,8 - 2,1\%$ , a excepción de los alimentados con el almidón de cambur negro ( $2,3 - 2,4\%$ ).

El contenido de nitrógeno proteico en el insecto depende, principalmente, de la biodisponibilidad del almidón y del contenido de proteínas que éstos presenten. Si la dieta no cumple los requerimientos proteicos del insecto ( $0,5 - 0,7\%$ ; según López, 1999), como se esperaría en dietas amiláceas, es probable que el nitrógeno proteico disminuya, ya que la utilización de las proteínas en los diferentes procesos fisiológicos producirá un balance de

nitrógeno negativo. Este hecho se observa en los insectos que fueron alimentados con el almidón de referencia (almidón de maíz), el cual tuvo un tenor proteico menor al requerimiento (Tabla VIII) del gorgojo y el biomarcador nitrógeno proteico fue ligeramente menor ( $p < 0,05$ ) que en los insectos alimentados con arvejas (Tabla V).

Además, Carmona y col. (1998) y López (1999) encontraron que una dieta compuesta por almidón de alta biodisponibilidad como el almidón de maíz, ocasionaba un balance de nitrógeno negativo que era de menor magnitud al observado en la condición de ayuno. Este hecho ocurre porque se utilizan los carbohidratos de la dieta en lugar de las proteínas corporales como combustible (efecto protector de los carbohidratos de la dieta).

Ambas evidencias sugieren que, en caso de que los almidones posean un tenor de proteínas menor a la del requerimiento del insecto y que este tenor sea equivalente entre ellos, el contenido de nitrógeno proteico encontrado estará determinado, principalmente, por la digestibilidad del almidón de la dieta. En este sentido, se podría esperar que almidones más biodisponibles generaran una mayor protección de las proteínas corporales.

En el presente estudio, los almidones no poseen cantidades equivalentes de proteínas (Tabla VIII), lo que podría ser una variable extra en el análisis del biomarcador nitrógeno proteico. Además, el nivel de ingesta de cada almidón por parte del insecto podría ser otra variable, que no fue considerada en este estudio, y que podría corregir los resultados obtenidos para este biomarcador; encontrándose entonces algún tipo de relación con los parámetros de digestibilidad *in vitro* o las proteínas del almidón.

Galeno (2006) encontró un contenido de nitrógeno proteico menor en insectos alimentados con almidón de hartón común, con respecto a insectos alimentados con almidón de maíz; similar a los resultados encontrados en el presente estudio. Además, esta autora encontró, usando análisis de correlación múltiple y corrigiendo el biomarcador por la

ingesta, que la variación en el nitrógeno proteico estaba relacionada, principalmente con la digestibilidad *in vitro* del almidón, específicamente el contenido de almidón resistente total, mientras que el contenido de proteína en el almidón no influyó sobre este parámetro.

### ***Nitrógeno cuticular***

El nitrógeno cuticular encontrado en insectos alimentados con la referencia y los almidones de plátano se encontró en el rango de 2,1 – 2,5% (Tabla V). Los insectos alimentados con los almidones de las variedades hartón común y cambur negro presentaron los mayores contenidos de nitrógeno cuticular (2,4 – 2,5%), mientras que aquellos que fueron alimentados con los almidones de las variedades cambur 012, HH-12 y topocho cenizo presentaron los menores contenidos de este biomarcador (2,1 – 2,3%).

Las diferencias encontradas no parecen estar relacionadas con los indicadores de digestibilidad *in vitro* o el contenido de proteína cruda, de los almidones. No obstante, el contenido de los nutrientes necesarios para la síntesis de la cutícula en cada almidón y los niveles de ingesta, de cada uno de ellos, podrían afectar los resultados observados de este biomarcador.

El biomarcador “otros” resulta difícil de analizar debido a que está constituido por varios componentes, a saber: cenizas, carbohidratos, esqueletos carbonados de los aminoácidos y de la quitina, entre otros. Por esta razón, no se realizaron pruebas estadísticas para evaluar si existían diferencias significativas de este parámetro entre las diferentes dietas (Tabla V), ni se realizaron mayores análisis de este biomarcador.

### Actividad similar a $\alpha$ -amilasa

Las enzimas con actividad amilolítica poseen un rol fundamental en la primera etapa de la digestión del almidón de la dieta. En estudios recientes se ha analizado la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz como biomarcador importante en la estimación de la biodisponibilidad de distintos almidones (García 2003; Galeno, 2006).

La Tabla IX muestra el efecto de las diferentes dietas de almidones de plátano sobre la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz. Las dietas de referencia y de almidón de cambur 012 generaron las menores actividades (45 – 48 mmol/s·kg) seguidas por las actividades generadas por las dietas de almidón de topocho cenizo y almidón de cambur negro (58 – 68 mmol/s·kg). Las dietas de almidón de hartón común y almidón de HH-12 generaron las mayores actividades similares a  $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz (115 – 125 mmol/s·kg).

Datos similares fueron encontrados en el estudio realizado por Galeno (2006), en el cual la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa de insectos a los que se les suministró almidón de hartón común fue mucho mayor a la de insectos alimentados con almidón de maíz (cerca de 5,5 veces).

Para las dietas utilizadas (almidones purificados), el nivel de actividad de las enzimas similares a  $\alpha$ -amilasa está determinado, en parte, por la biodisponibilidad del almidón, ya que a partir de estudios reportados se conoce que la glucosa ejerce un efecto inhibitorio en la transcripción de los genes correspondientes a estas enzimas, al menos en *Drosophila melanogaster* (Benkel y Hickey, 1986). Si en el gorgojo de arroz, la transcripción de estos genes está regulada de la misma manera, se esperaría que mientras más biodisponible sea un almidón, mayor sea su grado de hidrólisis y mayor cantidad de glucosa pueda ser absorbida en el intestino del organismo. Por lo cual, se encontrarían

actividades similares a  $\alpha$ -amilasa más bajas, en la medida en que el almidón fuera más biodisponible.

**Tabla IX. Actividad similar a  $\alpha$ -amilasa en el gorgojo de arroz alimentado con la dieta de referencia y los almidones de plátano.**

| <b>Dieta</b>          | <b>Actividad enzimática<br/>(mmol/s·kg)</b> |
|-----------------------|---------------------------------------------|
| <b>Referencia</b>     | 45,0 $\pm$ 2,9 <sup>d</sup>                 |
| <b>Hartón común</b>   | 123,2 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>                |
| <b>Cambur 012</b>     | 48,0 $\pm$ 8,3 <sup>c,d</sup>               |
| <b>Cambur negro</b>   | 67,6 $\pm$ 9,1 <sup>b</sup>                 |
| <b>HH-12</b>          | 116,2 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>                |
| <b>Topocho cenizo</b> | 58,9 $\pm$ 7,7 <sup>b,c</sup>               |

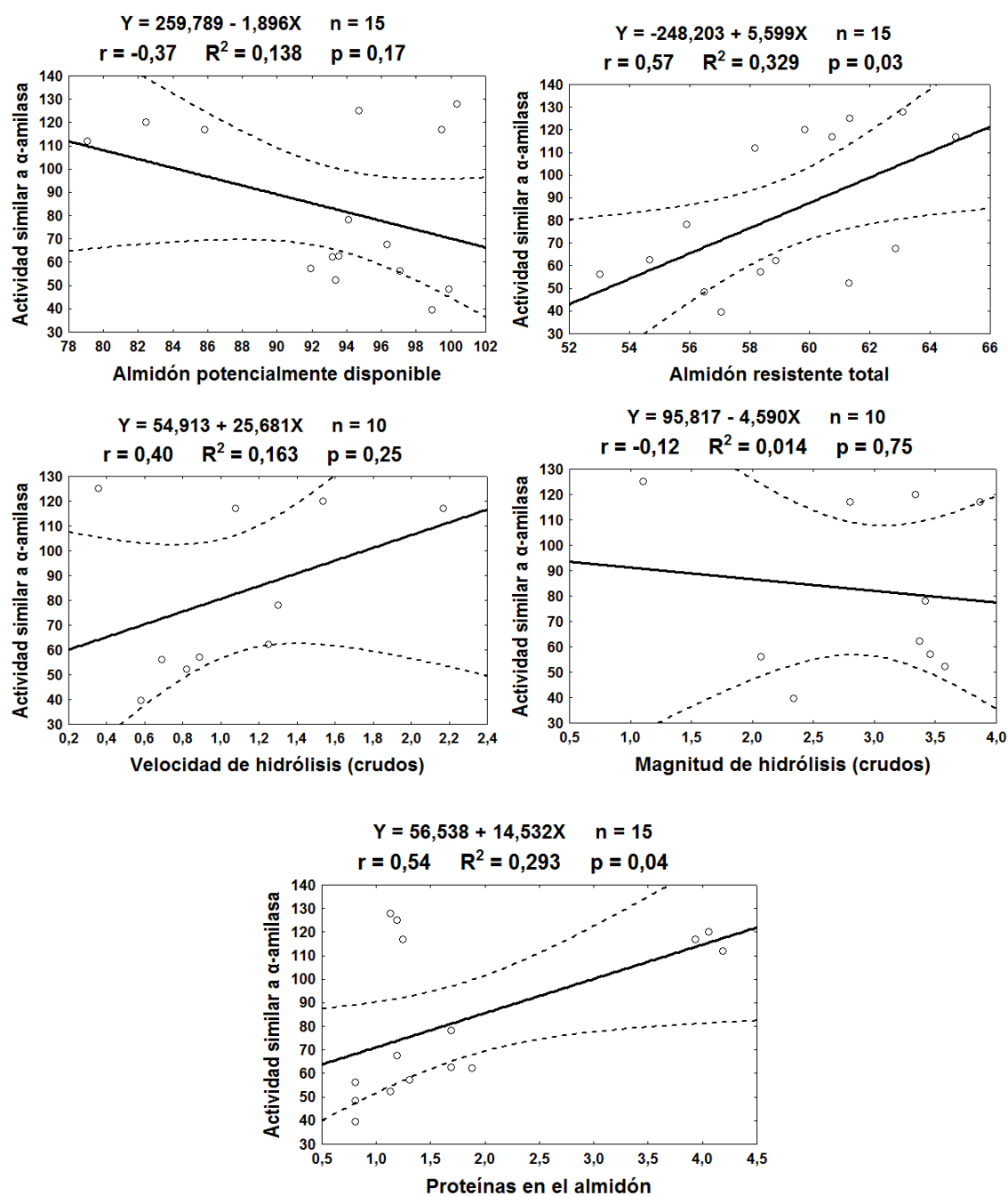
Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía mostró que las medias con letras distintas como superíndice con significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ; Prueba LSD de Fisher).

En el presente estudio, se realizaron análisis de correlación simple entre el biomarcador actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y los parámetros de digestibilidad *in vitro* de los almidones y de su contenido de proteína cruda; encontrándose que este biomarcador sólo correlacionó, positivamente, con la cantidad de almidón resistente total ( $R^2 = 0,33$ ;  $p = 0,03$ ) y la cantidad de proteínas ( $R^2 = 0,29$ ;  $p = 0,04$ ) presentes en los almidones (Figura 10). Una mayor proporción de almidón resistente en la dieta, podría limitar la cantidad de glucosa que puede ser digerida y absorbida; encontrándose una mayor actividad similar a  $\alpha$ -amilasa dado que su transcripción no estaría inhibida. El contenido de proteínas de los

almidones podría afectar la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, en el sentido que pueda producir saciedad en el insecto; dándose un nivel de ingesta menor y por tanto ingiriendo menor cantidad de almidón que potencialmente podría ser digerido y absorbido como glucosa (Sachiko y col., 2001). También podría afectar la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa en el sentido que mientras mayor proporción de proteínas tenga el alimento menor proporción de almidón, potencialmente digerible y absorbible, será ingerida; encontrándose entonces, mayores valores de este biomarcador.

La alta biodisponibilidad del almidón de maíz ha sido demostrada en estudios anteriores (García, 2003; Galeno, 2006). Además, se conoce que, por lo general, los almidones de plátano poseen una baja digestibilidad *in vitro* (Silva, 2000; Galeno, 2006; Marín, 2009). Estos resultados de digestibilidad *in vitro* parecen estar en concordancia con los encontrados en este trabajo, en cuanto a la biodisponibilidad de los almidones estimada por la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, ya que la dieta de referencia indujo la menor actividad, mientras que las actividades inducidas por los almidones de plátano fueron iguales o mayores a la encontrada para la referencia. En los estudios realizados por García (2003) y Galeno (2006) se encontró, usando análisis de regresión múltiple y corrigiendo el biomarcador por la ingesta, que la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa se correlacionó con el contenido de almidón resistente total de los diferentes almidones utilizados como dieta, en forma similar a lo encontrado en el presente trabajo.

Dado que este biomarcador presentó diferencias entre las distintas dietas de almidón, que además, se correlacionaron con uno de los parámetros de digestibilidad *in vitro*, como lo es el almidón resistente total, se puede decir que la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa es un buen estimador de la biodisponibilidad de los almidones de plátano.



**Figura 10. Gráficos de dispersión entre el biomarcador actividad similar a  $\alpha$ -amilasa y los parámetros de digestibilidad *in vitro* del almidón y su contenido de proteína cruda.**

En todos los gráficos se muestra la línea de regresión y su intervalo de confianza, la ecuación de la regresión lineal, el coeficiente de Pearson ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor de significancia ( $p$ ) para cada correlación simple efectuada.

### **Excreción de ácido úrico**

Los organismos poseen diferentes mecanismos que les permiten excretar el nitrógeno no utilizado en el proceso de recambio proteico; manteniéndose de este modo, la homeóstasis celular. Las formas de excreción del nitrógeno varían a lo largo de la escala evolutiva y están principalmente asociadas al mecanismo de balance osmótico del organismo. Los peces excretan el nitrógeno bajo la forma de amonio, lo cual está asociado a una excreción mayor de agua que, por ejemplo, en organismos que excretan el nitrógeno bajo la forma de urea (mamíferos). Los insectos y aves excretan el nitrógeno bajo la forma de ácido úrico, con lo cual la pérdida de agua asociada es mínima (Randall y col., 2002).

La excreción de ácido úrico ha resultado ser un biomarcador importante al evaluar la calidad proteica de la dieta, así como de la calidad nutricional de almidones, mediante el bioensayo del gorgojo de arroz (López, 1999; García, 2003; Galeno, 2006).

En la Tabla X se muestra la excreción de ácido úrico en los insectos alimentados con las dietas de los diferentes almidones. Los mayores niveles de excreción se encontraron en insectos alimentados con los almidones hartón común, topocho cenizo y cambur negro (23,5 – 26,5 mg/kg). La excreción de ácido úrico de los insectos alimentados con los almidones de cambur 012 y HH-12 no fue significativamente diferente de aquellos alimentados con el almidón de referencia, el cual generó los menores niveles del biomarcador (13,5 – 18,5 mg/kg).

Para las dietas utilizadas (almidones purificados), la excreción de ácido úrico en el insecto está determinada, principalmente, por la digestibilidad del almidón en la dieta; sin embargo, la cantidad de proteína que puedan contener estos almidones también influirá sobre este biomarcador. Si el almidón de la dieta posee una biodisponibilidad alta, el efecto protector de los carbohidratos sobre las proteínas corporales se producirá en mayor grado;

obteniéndose como resultado una baja excreción de ácido úrico, tal como se observó en insectos alimentados con el almidón de referencia. La proteína que contiene el almidón podría afectar la excreción de ácido úrico de dos maneras. En caso que esté presente en una proporción menor a la requerida por el insecto, se degradarán las proteínas corporales; encontrándose un mayor nivel del biomarcador y pudiéndose evaluar el efecto protector de los carbohidratos de la dieta. En caso que el almidón de la dieta tenga un tenor de proteína mayor al del requerimiento del insecto, se encontrarán altos niveles de excreción de ácido úrico, producto de la eliminación del exceso de nitrógeno, y el efecto de la digestibilidad del almidón sobre este biomarcador quedaría enmascarado. Por lo tanto, la excreción de ácido úrico posee un comportamiento bifásico (posiblemente mejor explicado por una función cuadrática, más que por una función lineal), con respecto al tenor de proteína de la dieta; encontrándose un mínimo de excreción cuando la dieta proporciona un nivel de proteínas igual al requerimiento del organismo.

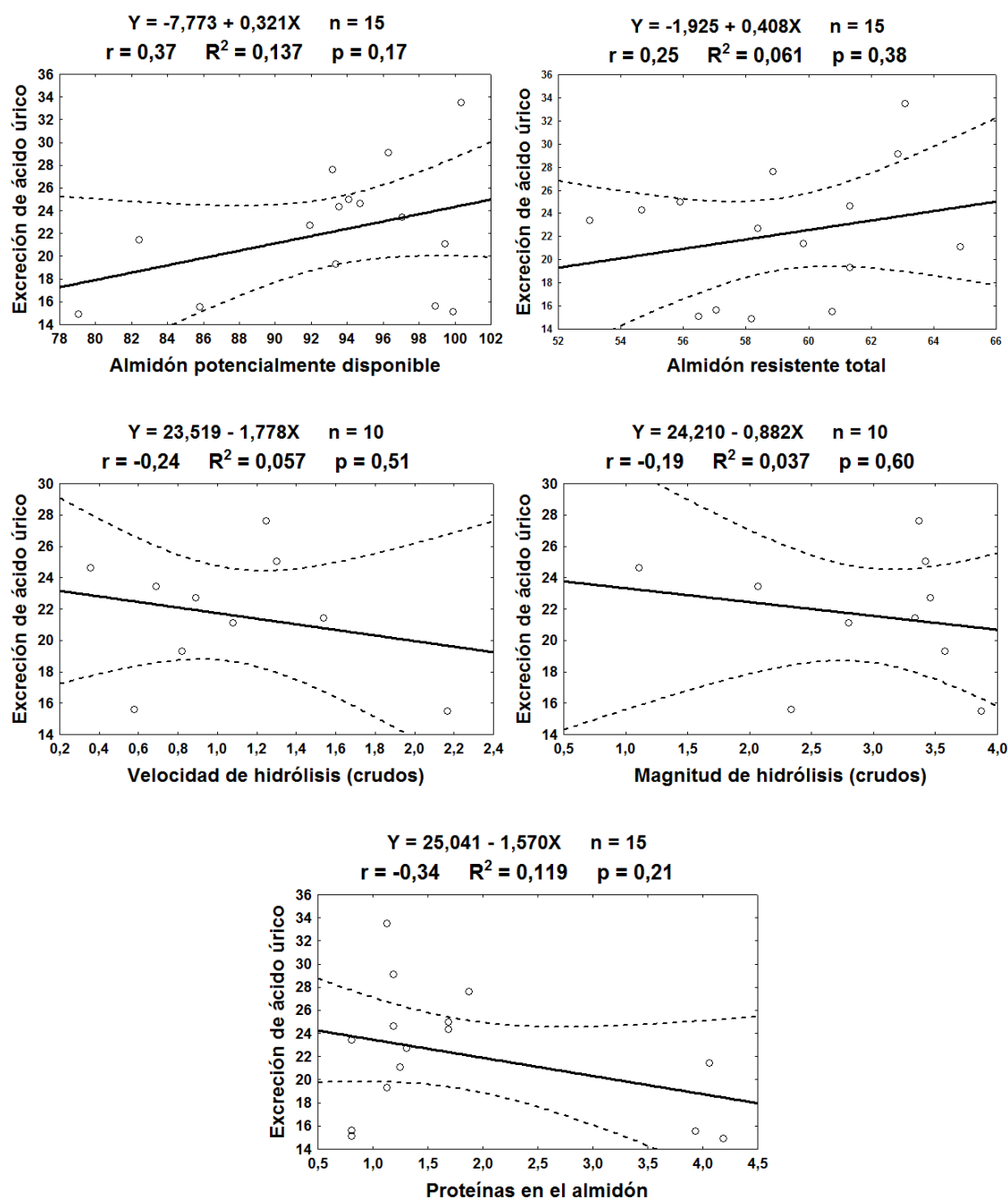
Tal como se esperaba, según estas afirmaciones, la dieta que presentó la mayor digestibilidad *in vitro* generó la menor excreción de ácido úrico, como es el caso de la dieta con el almidón de referencia; sin embargo, los análisis de correlación simple realizados demostraron que este biomarcador no se correlacionó significativamente con ninguno de los parámetros evaluados (Figura 11). Este hecho puede ser consecuencia de diferentes niveles de ingesta de cada almidón, por parte del insecto, y/o que el diferente tenor proteico de los almidones pudiera interferir el análisis de correlación simple al ser una variable que no influye de manera lineal sobre la excreción de ácido úrico. El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatoria cuantitativas (Altman, 1991).

**Tabla X. Excreción de ácido úrico en el gorgojo de arroz alimentado con las dietas controles, de referencia y los almidones de plátano.**

| <b>Dieta</b>          | <b>Ácido úrico excretado<br/>(mg/kg de peso al día 8)</b> |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Referencia</b>     | $13,8 \pm 0,5^c$                                          |
| <b>Hartón común</b>   | $26,4 \pm 6,4^a$                                          |
| <b>Cambur 012</b>     | $18,1 \pm 4,7^{b,c}$                                      |
| <b>Cambur negro</b>   | $25,7 \pm 1,7^a$                                          |
| <b>HH-12</b>          | $17,3 \pm 3,4^{b,c}$                                      |
| <b>Topocho cenizo</b> | $23,7 \pm 5,0^{a,b}$                                      |

Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). La referencia utilizada fue almidón de maíz. El análisis de varianza de una vía mostró que las medias con letras distintas como superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ; Prueba LSD de Fisher). Los insectos mantenidos en ayuno o alimentados con arvejas (controles del bioensayo) presentaron una excreción de  $256,0 \pm 39,0$  y  $349,3 \pm 37,8$  mg/kg de peso al día 8 ( $n = 6$  y  $n = 9$ ), respectivamente.

En estudios realizados por García (2003) y Galeno (2006), la excreción de ácido úrico de insectos alimentados con almidones se correlacionó con el contenido de almidón resistente total presente en éstos, a diferencia de lo ocurrido en el presente estudio. No obstante, García (2003) y Galeno (2006) corrigieron este biomarcador por la ingesta y realizaron análisis de correlación múltiple. Galeno (2006) encontró una excreción de ácido úrico que fue mayor en insectos alimentados con almidón de hartón común, con respecto a aquellos a los que se les suministró almidón de maíz, similar a lo encontrado en el presente trabajo; corroborándose así la baja biodisponibilidad del almidón de esta variedad de plátano.



**Figura 11. Gráficos de dispersión entre el biomarcador excreción de ácido úrico y los parámetros de digestibilidad *in vitro* del almidón y su contenido de proteína cruda.**

En todos los gráficos se muestra la línea de regresión y su intervalo de confianza, la ecuación de la regresión lineal, el coeficiente de Pearson ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor de significancia ( $p$ ) para cada correlación simple efectuada.

Finalmente, es interesante notar que la excreción de ácido úrico para el almidón HH-12 fue la más baja (Tabla X) a pesar que el contenido de proteínas fue el más alto (Tabla VIII). El gráfico de dispersión entre estas dos variables (Figura 11) muestra dos agrupaciones de puntos, donde el almidón HH-12 desvía claramente la línea de regresión entre estas dos variables. Es necesaria más investigación para aclarar este comportamiento.

### **Consideraciones finales y perspectivas futuras**

El objetivo de este trabajo fue estudiar la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de cinco variedades de almidones de plátano, a saber: hartón común, cambur 012, cambur negro, HH-12 y topocho cenizo; e intentar correlacionar los resultados obtenidos a partir de ambas aproximaciones metodológicas.

Todos los parámetros de digestibilidad *in vitro* analizados, como lo fueron: almidón potencialmente disponible, almidón resistente total y tasa de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro*, concordaron con la baja digestibilidad generalmente atribuida a almidones nativos de plátanos, ya que se encontraron fracciones de almidón resistente a la digestión enzimática mayores que 55% en todos ellos y se hallaron porcentajes de hidrólisis menores al 4% al incubarlos por una hora con  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina (almidón crudo).

El análisis de la digestibilidad *in vivo*, llevado a cabo mediante el bioensayo del gorgojo de arroz, mostró que los biomarcadores grasa corporal y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa se relacionaron con uno de los parámetros de digestibilidad *in vitro*, como fue el almidón resistente total, por lo que se piensa que éstos son los mejores estimadores de la biodisponibilidad de los almidones estudiados. En estos dos biomarcadores, se encontró que el almidón de hartón común fue el menos biodisponible, seguido del almidón de

HH-12, mientras que el almidón de cambur 012 presentó la mayor biodisponibilidad. De hecho, el almidón de cambur 012, no presentó diferencias significativas con respecto al almidón de maíz en ninguno de los dos biomarcadores. Los almidones de cambur negro y topocho cenizo resultaron tener una biodisponibilidad intermedia entre los almidones de las tres variedades de plátano mencionadas anteriormente, según se evidenció en las respuestas que generaron en los dos biomarcadores en cuestión, y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Los biomarcadores agua corporal, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y excreción de ácido úrico, no se perfilaron como buenos estimadores de la biodisponibilidad de almidones. No obstante en los antecedentes (García, 2003; Galeno, 2006) el biomarcador nitrógeno proteico y el biomarcador excreción de ácido úrico, fueron buenos estimadores de la biodisponibilidad de almidones al correlacionarse con el contenido de almidón resistente total presente en éstos. Las diferencias encontradas en el presente trabajo con respecto a estos antecedentes, en cuanto a la correlación existente entre los biomarcadores nitrógeno proteico o excreción de ácido úrico y el contenido de almidón resistente total de los almidones, podría estar dada por diferencias en los niveles de ingesta de cada dieta por parte de los insectos o por los diferentes contenidos de proteínas encontrados en los almidones.

En conjunto, se podría decir que el contenido de almidón resistente total resultó ser el parámetro de digestibilidad *in vitro* que mejor predice la biodisponibilidad de los almidones de plátano; mientras, que la grasa corporal y la actividad similar a  $\alpha$ -amilasa resultaron ser los biomarcadores que mejor estiman la biodisponibilidad de los almidones estudiados. Estos biomarcadores fueron los únicos que mostraron diferencias entre los

efectos de cada dieta de almidón, que además se correlacionaron con las digestibilidades *in vitro* determinadas para cada uno de ellos.

La ingesta de cada almidón por parte del gorgojo de arroz, es un parámetro que sería interesante evaluar. En caso de que los niveles de ingesta de cada almidón sean diferentes (García, 2003; Galeno, 2006), los biomarcadores podrían ser expresados en base a un índice que permita corregir las posibles diferencias generadas por la ingesta. Además, se podría realizar un análisis de regresión múltiple para evaluar las relaciones existentes entre los parámetros de digestibilidad *in vitro* con los biomarcadores estimados *in vivo*. Este análisis es más apropiado, que un análisis de correlación simple, para evaluar varias variables independientes que influyen sobre una variable dependiente. En el presente estudio, no se consideró la realización de un análisis de regresión múltiple debido a que la existencia de niveles de ingesta diferentes podría influir en los valores encontrados de cada biomarcador, y como este análisis correlaciona más de dos variables a la vez, podrían existir errores acumulados que no permitan validar los resultados de este tipo de correlación. En cambio, se realizaron análisis de correlación simple, que si bien no pueden relacionar más de dos variables al mismo tiempo, ofrecen información valiosa como primera aproximación.

La información encontrada acerca de la digestibilidad *in vivo* de los almidones de plátano de las variedades evaluadas, podría ser utilizada por la industria de alimentos como complemento de estudios de caracterización de estos almidones. Además, el bioensayo del gorgojo de arroz se perfila como un método útil y efectivo al analizar la biodisponibilidad de almidones de plátano, sobre todo cuando se quieren evaluar un gran número de muestras de almidón, ya que resultaría más fácil, rápido y económico que los ensayos realizados con ratas o ratones. Esto permitiría seleccionar algunas muestras de interés, a partir de un gran

número de ellas, para luego ser evaluadas mediante bioensayos que utilicen animales superiores como modelo (mamíferos en general).

Entre otras posibilidades, se podrían manufacturar alimentos que contengan almidones nativos de plátanos de estas variedades, dirigidos a consumidores con necesidades nutricionales especiales, como podrían ser personas diabéticas, obesas o con enfermedades cardiovasculares. Esta idea está fundamentada en los efectos fisiológicos conocidos del almidón resistente y de almidones con una tasa de hidrólisis baja.

## Conclusiones

- Todos los almidones de plátano presentaron contenidos de almidón potencialmente disponible mayores al 93%, a excepción del almidón de la variedad HH-12 cuyo contenido fue del 82%.
- Los almidones de las cinco variedades de plátano contienen una alta proporción de almidón resistente a la digestión enzimática; encontrándose en el rango de 55-64%.
- Las tasas de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* de los almidones crudos de las cinco variedades de plátano fueron muy bajas; encontrándose magnitudes finales de hidrólisis menores que 4% en todos ellos.
- Las tasas de  $\alpha$ -amilólisis *in vitro* de los almidones gelatinizados de las cinco variedades de plátano, no fueron muy diferentes de la presentada por un almidón de alta digestibilidad, como lo es el almidón de maíz. Este hecho demuestra que el proceso de gelatinización es efectivo en la eliminación de gran parte del almidón resistente presente en los almidones de plátano.
- Los almidones de plátano evaluados contienen diferentes proporciones de proteína; encontrándose en el rango de 0,8 – 1,8%, para todos ellos, a excepción del almidón de la variedad HH-12 (4%).
- Los biomarcadores supervivencia, variación de peso, agua corporal, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y excreción de ácido úrico, no resultaron ser buenos estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de plátano. En estos biomarcadores no se encontraron diferencias que pudieran ser relacionadas con la digestibilidad *in vitro* de estos almidones.

- Los biomarcadores grasa corporal y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa, por otra parte, resultaron ser buenos estimadores de la biodisponibilidad de los almidones de plátano; observándose respuestas que estuvieron correlacionadas con la digestibilidad *in vitro* que presentaron, específicamente con el contenido de almidón resistente total.
- El contenido de almidón resistente total en los almidones de plátano, resultó ser el parámetro de digestibilidad *in vitro* con mayor carácter predictivo sobre las respuestas observadas *in vivo*, según se observó en los análisis de correlación simple.
- El almidón de hartón común resultó ser el de menor biodisponibilidad, mientras que el almidón de cambur 012 presentó la mayor y no fue significativamente diferente de la encontrada para el almidón de referencia (almidón de maíz). Los almidones de cambur negro, HH-12 y topocho cenizo, presentaron una biodisponibilidad intermedia entre las variedades anteriormente mencionadas.
- Se confirmó la utilidad del bioensayo del gorgojo de arroz en la caracterización de la digestibilidad *in vivo* de almidones, a través del análisis de los biomarcadores grasa corporal y actividad similar a  $\alpha$ -amilasa.

## Referencias bibliográficas

- Altman, D.G. (1991) Practical statistics for medical research. Chapman & Hall. Primera Edición. Londres, Reino Unido.
- AOAC International. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Décimocuarta Edición. Washington D.C., EE.UU.
- AOAC International. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Décimoquinta Edición. Washington D.C., EE.UU.
- Aparicio-Saguilán, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., García-Suárez, F., Gutiérrez-Meras, F. y Bello-Pérez, L.A. 2005. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization. *Starch/Stärke*. **57**: 405-412.
- Aparicio-Saguilán, A., Gutiérrez-Meras, F., García-Suárez, F.J., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Physicochemical and functional properties of cross-linked banana resistant starch. Effect of pressure cooking. *Starch/Stärke*. **60** (6): 286-291.
- Aparicio-Saguilán, A., Sáyago-Ayerdi, S.G., Vargas-Torres, A., Tovar, J., Ascencio-Otero, T.E. y Bello-Pérez, L.A. 2007. Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch. *Journal of Food Composition and Analysis*. **20**: 175-181.
- Asp, N.-G. 1992. Resistant starch. Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR Concerted Action No. 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S1.
- Asp, N.-G., Van Amelsvoort, J.M.M. y Hautvast, J.G.A.J. 1996. Nutritional implications of resistant starch. *Nutrition Research Reviews*. **9**: 1-31.
- Bello-Pérez, L.A., Agama-Acevedo, E., Sáyago-Ayerdi, S.G. y Moreno-Damián, E. 2000. Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, México. *Starch/Stärke*. **52**: 68-73.
- Bello-Pérez, L.A., Contreras-Ramos, S.M., Romero-Manilla, R., Solorza-Feria, J. y Jiménez-Aparicio, A. 2002. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. macho). *Agrociencia*. **36**: 169-180.
- Bello-Pérez, L.A., Sáyago-Ayerdi, S.G., Méndez-Montealvo, G. y Tovar, J. 2004. *In vitro* digestibility of banana starch cookies. *Plant Foods for Human Nutrition*. **59**: 79-83.
- Benkel, B.F. y Hickey, D.A. 1986. Glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **114**: 137-144.
- Bird, A.R., Brown, I.L. y Topping, D.L. 2000. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. **1**: 25-37.
- Björck, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J. y Asp, N.-G. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **59** (3): 699S-705S.
- Carmona, A. y Gómez-Sotillo, A. 1997. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales Venezolanos de Nutrición*. **10**: 20-26.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A. y Casotto, M. 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “artropocéntrico”. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **1**: 37-40.

- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A. y Casotto, M. 2001. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **3**:53-56.
- Cherry, J. 1973. Molecular biology of plants. A text manual. Págs 37-42 en: Columbia University Press. Columbia, EE.UU.
- Colonna, P., Leloup, V., y Buleón, A. 1992. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S17-S32.
- 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.
- Englyst, H.N. y Cummings, J.H. 1986. Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **44**: 42-50.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M. y Cummings, J.H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S3-S50.
- French, D. 1973. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science*. **37**: 1048-1061.
- Galeno, F. 2006. Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Gallant, D.J., Bouchet, B., Buleón, A. y Pérez, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S3-S16.
- Gamero, M., Laurentin, A., Bernal, C., Galindo, I. y 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.
- Ganong, W.F. 2003. Review of Medical Physiology. Lange Medical Books/Mc Graw-Hill. Vigésima primera Edición. EE.UU. Págs. 511-515.
- García, O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados, utilizando el bioensayo con el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- García, E. y Lajolo, F.M. 1988. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *Journal of Food Science*. **53** (4): 1181-1186.
- Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E. y Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*. **56**: 445-449.
- Hernández, O., Emaldi, U. y Tovar, J. 2008. *In vitro* digestibility of edible films from various starch sources. *Carbohydrate polymers*. **71** (4): 648-655.
- Holm, J., Björck, I., Asp, N.-G., Sjöberg, L.-B. y Lundquist, I. 1985. Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *Journal of Cereal Science*. **3**: 193-206.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A. y Asp, N.-G. 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch/Stärke*. **38**: 224-226.

- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A.-C., Asp, N.-G., Larsson, K. y Lundquist, I. 1983. Digestibility of amylose-lipid complexes *in vitro* and *in vivo*. *Starch/Stärke*. **35**: 294-297.
- Hostettler, F., Borel, E. y Deuel, H. 1951. Über die reduktion der 3,5 dinitrosalicylsäure durch Zucker. *Helvetica Chimica Acta*. **34**: 2132-2139.
- Krishnaswamy, K.G. y Sreenivasan, A. 1948. Separation and determination of the amylose and amylopectin fractions of starch. *Journal of Biological Chemistry*. **176**: 1253-1261.
- Laurentin, A. 1999. Caracterización fisicoquímica y digestibilidad *in vitro* de almidones de maíz, ocumo y lenteja, irradiados con microondas y pirodextrinizados. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asistente, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Laurentin, A. 2004. Starch pyrodextrins: In vitro fermentation and physiological effects. Tesis doctoral, Universidad de Glasgow. Glasgow, Escocia.
- Laurentin, A., Cárdenas, M., Ruales, J., Pérez, E., y Tovar, J. 2003. Preparation of indigestible pyrodextrins from different starch sources. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **51**(18): 5510-5515.
- Laurentin, A. y Edwards, C.A. 2005. Carbohidratos: Resistant starch and oligosaccharides. Págs. 322-329 en: Caballero, B., Allen, L. y Prentice, A. (eds.), *Encyclopedia of Human Nutrition*. Elsevier Ltd. Segunda Edición. Oxford, Reino Unido.
- López, Y. 1999. Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de las enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1971. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 265-275.
- Marín, J.G. 2009. Estudio del almidón presente en el fruto de variedades de musáceas cultivadas en Venezuela. Tesis doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. y Ahern, K.G. 2002. Bioquímica. Pearson Educación, S.A.. Tercera Edición. Madrid, España. Págs. 311-352.
- Mayes, P.A. y Bender, D.A. 2003. Carbohydrates of physiologic significance. Págs. 102-110 en: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. y Rodwell, V.W. (eds.), *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill Companies. Vigésima sexta Edición. EE.UU.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman. Cuarta Edición. EE.UU. Págs. 238-272.
- Niba, L.L. 2002. Resistant starch: a potential functional food ingredient. *Nutrition and Food Science*. **32** (2): 62-67.
- Osorio-Díaz, P., Aguilar-Sandoval, A., Agama-Acevedo, E., Rendón-Villalobos, R., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Composite durum wheat flour/plantain starch white salted noodles: proximal composition, starch digestibility, and indigestible fraction content. *Cereal Chemistry*. **85** (3): 339-343.
- Pérez, E., Bahnassey, Y.A. y Breene, W.M. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch/Stärke*. **45** (6): 211-214.
- Randall, D., Burggren, W., y French, K. 2002. *Fisiología Animal*. Mc Graw Hill/Interamericana de España S.A.U. Cuarta Edición. Madrid, España. Págs. 675-680.

- Rendón-Villalobos, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. 2008. Composite wheat-plantain starch salted noodles: preparation, proximal composition and *in vitro* starch digestibility. *Interciencia*. **33** (9): 658-662.
- Robertson, M.D., Currie, J.M., Morgan, L.M., Jewell, D.P. y Frayn, K.N. 2003. Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetología*. **46** (5): 659-665.
- Sachiko, T., St. Jeor, R.D., Howard, B.V., Prewitt, T.E., Bovee, V., Bazzarre, T. y Eckel, R.H. 2001. Dietary protein and weight reduction: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism of the American Heart Association. *Circulation*. **104**: 1869-1874.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 2006. Resistant starch – a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **5**: 1-17.
- Silva, S. 2000. Digestibilidad *in vitro* de almidones de plátano y amaranto: efecto de la pregelatinización, extrusión y la irradiación por microondas. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Spoehr, H.A. y Milner, H.W. 1935. Leaf starch: its isolation and some of its properties. *Journal of Biological Chemistry*. **111**: 679-687.
- Topping, D.L. y 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. 1994. Natural and man-made resistant starch. *Agro-Food Industry Hi-Tech*. **5**: 23-25.
- Tovar, J., Björck, I. y Asp, N.-G. 1992. Digestibility of starch in legumes using the rat. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S141-S142.
- Tovar, J., Fernández-Piedra, M. y Blanco-Metzler, A. 2005. Digestibilidad *in vitro* del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*. **30** (12): 780-783.
- Tovar, J. y Melito, C. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44** (9): 2642-2645.
- Tovar, J., Melito, C., Herrera, E., Laurentin, A. y Pérez, E. 1999. Starch modification from a nutritional point of view. *Agro-Food Industry Hi-Tech*. **10** (2): 27-30.
- Tovar, J., Sáyago-Ayerdi, G., Peñalver, C., Paredes-López, O. y Bello-Pérez, L.A. 2003. *In vitro* starch hydrolysis index and predicted glycemic index of corn tortilla, black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), and mexican “taco”. *Cereal Chemistry*. **80** (5): 533-535.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. **6**: 24-32.
- Von Loesecke, H.W. 1950. Bananas. Interscience Publishers Inc. Segunda Edición. Nueva York, EE.UU.
- Woo, K.K., Chung, M.K., Kang, N.E., Kim, N.H. y Park, O.J. 2003. Effect of resistant starch from corn or rice on glucose control, colonic events, and blood lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **14** (3): 166-172.
- World Health Organization. 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical Report Series*. **916**: 54-68.

Zhang, W.Q., Wang, H.W., Zhang, Y.M. y Yang, YX. 2007. Effects of resistant starch on insulin resistance of type 2 diabetes mellitus patients. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. **41** (2): 101-104.