

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Efecto de varios ciclos de enfriamiento/calentamiento en el contenido de almidón resistente tipo III en almidones de achira (*Canna edulis Ker*) y papa (*Solanum tuberosum*)**

**Karla A. Loor Toledo**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera de Alimentos

Quito, mayo 7 de 2008

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Efecto de varios ciclos de enfriamiento/calentamiento en el contenido  
de almidón resistente tipo III en almidones de achira (*Canna edulis***

***Ker*) y papa (*Solanum tuberosum*)**

**Karla A. Loor Toledo**

**Michael Koziol, PhD**

**Decano del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición,**

**Miembro del Comité de tesis**

---

**Stalin Santacruz, PhD**

**Director de tesis y miembro del Comité de tesis**

---

**Javier Garrido, MSc**

**Miembro del Comité de tesis**

---

**Miguel Vásconez Costa, MSc**

**Miembro del Comité de tesis**

---

**Lucía de los Ángeles Ramírez, PhD**

**Miembro del Comité de tesis**

---

**Yamila Álvarez, MSc**

**Miembro del Comité de tesis**

---

**Quito, Mayo 6 del 2008**

© **Derechos de autor:** Según la actual Ley de Propiedad Intelectual, Art. 5: “el derecho de autor nace y se protege por el solo hecho de la creación de la obra, independientemente de su mérito, destino o modo de expresión... El reconocimiento de los derechos de autor y de los derechos conexos no está sometido a registro, depósito, ni al cumplimiento de formalidad alguna.” (Ecuador. Ley de Propiedad Intelectual, Art. 5)

Inscribir el derecho de autor es opcional y si el estudiante lo decide debe inscribir los derechos de autor en el Instituto Ecuatoriano de Propiedad Intelectual (IEPI). Si lo va a hacer internacionalmente debe tomar en cuenta las normas internacionales para microfilmado.

Nombre del autor: Karla A. Loor Toledo  
2008

**Efecto de varios ciclos de enfriamiento/calentamiento en el contenido de almidón resistente tipo III en almidones de achira (*Canna edulis Ker*) y papa (*Solanum tuberosum*)**

**Autora:  
Karla A. Loor Toledo, 2008**

**Palabras clave: Almidón resistente, almidón retrogradado, *Canna edulis*, *Solanum tuberosum*, tratamiento térmico**

## **RESUMEN:**

El almidón resistente ha atraído interés por parte de la industria alimenticia, ya que ha sido propuesto como un elemento para aumentar el contenido de fibra en un alimento. Se ha demostrado en diferentes estudios que el almidón resistente tipo III (ARIII) (almidón retrogradado) además de añadir beneficios similares a la fibra soluble, como son la prevención de enfermedades a nivel gastrointestinal, obesidad, arteriosclerosis, no altera las características organolépticas del producto. En este estudio se analizó el efecto de varios ciclos de enfriamiento/calentamiento sobre el contenido de almidón resistente tipo III en almidones de achira (*Canna edulis Ker*) y papa (*Solanum Tuberosum*). Los almidones extraídos fueron gelatinizados mediante una cocción a ebullición (91°C) seguida de un proceso de autoclavado (121°C). Los geles de almidón se almacenaron bajo ciclos de enfriamiento/calentamiento, resultando en la formación de diferentes cantidades de almidón retrogradado. Cada ciclo consistió de 24 h de almacenamiento a 4°C seguidas de 24 h a 37°C. Las muestras de almidón presentaron un incremento en el contenido de almidón resistente tipo III a lo largo de tres ciclos de enfriamiento/calentamiento. Sin embargo este incremento entre ciclos no fue estadísticamente significativo. El mayor incremento de almidón resistente se presentó entre la muestra nativa (sin cocimiento) y el ciclo cero de enfriamiento/calentamiento. Comparando los dos almidones, el de achira presentó el mayor contenido de ARIII luego de tres ciclos (33.79%), siendo el de papa de 22.86%. Estos valores estuvieron directamente relacionados con los contenidos de amilosa que fueron de 26% y 22.9% para achira y papa respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el almidón de achira podría ser usado como una fuente importante de almidón resistente tipo III pasando por un ciclo de enfriamiento/calentamiento, para ser usado en alimentos funcionales o para aumentar el contenido de fibra de un alimento.

**ABSTRACT:**

Resistant starch has brought a lot of attention lately from the food industry. It has been proposed as an ingredient to enhance the fibre content of a food product. It has been shown in several studies that resistant starch type III (RSIII) (retrograded starch) does not modify the organoleptic characteristics of a product, while providing benefits similar to the ones in soluble fiber, as for example prevention of gastrointestinal diseases, obesity and arteriosclerosis. In this study the effect of several cooling/heating cycles on the content of resistant starch type III of achira (*Canna edulis Ker*) and potato (*Solanum tuberosum*) starches, was analyzed. The retrograded starch was obtained after the gelatinization of the starch followed by a cooling process. The extracted starches were gelatinized by cooking at boiling temperature (91°C), followed by an autoclave (121°). The starch gels were stored under cooling/heating cycles. Each cycle consisting of 24 hours at 4°C followed by 24 hours at 37°C. The starch samples showed an increase in the resistant starch type III content along three cooling/warming up cycles. However, this increase between cycles was not statistically significant. The highest increase of resistant starch was observed between the native samples (without cooking) and the cycle zero. Even though the increase between these cycles was of 16% and 12% for achira and potato respectively, the difference was not statistically significant.

Achira starch showed the highest content of resistant starch type III after three cycles (33.79%), while for potato was 22.86%. These values were directly related to the amylose content which were 26% and 22.9% for achira and potato respectively. The results obtained show that achira starch could be used as an important source of resistant starch type III after a cooling/heating cycle, that could be use in functional foods or to enhance the fibre content in foods.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b><u>Página</u></b>	
• Portada	i
• Hoja de aprobación de la tesis	ii
• Derechos de autor	iii
• Título	iv
• Resumen	v
• Abstract	vi
• Tabla de contenidos	vii – viii
• Lista de figuras	ix
• Introducción	2 - 10
- Almidón resistente (AR)	3 - 4
- Funcionalidad del AR tipo III en la industria alimenticia	5 - 6
- Funcionalidad fisiológica del AR tipo III	6 - 8
- Características de los cultivos en estudio	8 - 10
- Achira	8 - 9
- Papa	10
• Materiales y métodos	11 - 16
- Análisis proximales	11
- Determinación de contenido de amilasa	11
- Extracción del almidón	12
- Gelatinización del almidón	12
- Autoclavado	12
- Ciclos de enfriamiento / calentamiento	13

- Análisis de Almidón resistente tipo III (ARIII)	14 - 15
- Análisis de ARIII en muestras nativas	15
- Determinación de claridad en geles de almidón	15
- Análisis estadístico	16
• Resultados y discusión	17 - 26
- Análisis proximales	17 - 18
- Contenido de amilosa	19
- Contenido de ARIII	19 - 22
- Porcentaje de ARIII en muestras nativas	23 - 25
- Claridad en geles de almidón	25 - 26
• Conclusiones	26 - 27
• Referencias	28 - 30
• Anexo #1	31 - 33
• Anexo #2	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
#1._ Variación del contenido de almidón resistente tipo III de almidón de Achira tras tres ciclos de enfriamiento/calentamiento_____	21
#2._ Variación del contenido de almidón resistente tipo III de almidón de papa tras tres ciclos de enfriamiento/calentamiento_____	21
# 3._ Relación entre el contenido de amilosa con el contenido de almidón resistente tipo III luego de tres ciclos de enfriamiento/calentamiento en muestras de almidón de achira y papa_____	22
#4._ Comparación del contenido de almidón resistente entre muestra nativas y las de ciclo cero de almidón de Achira _____	24
#5._ Comparación del contenido de almidón resistente entre muestra nativas y las de ciclo cero de almidón de Papa _____	24
#6._ Variación del porcentaje de transmitancia de geles de almidón de achira y papa en el tiempo de almacenamiento a 3°C _____	26
#7._ Estimativa del contenido de almidón resistente tipo III en almidón de achira__	33
#8._ Estimativa del contenido de almidón resistente tipo III en almidón de papa __	33



## **1. INTRODUCCIÓN**

El almidón es un polisacárido compuesto por monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -D-1,4 y  $\alpha$ -D-1,6, y consiste de dos componentes estructurales: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa, unidos por enlaces  $\alpha$ -D-1,4 y constituye entre el 15 y 20% del almidón presente en un alimento. Por otro lado, la amilopectina es el componente principal del almidón y consiste de monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -D-1,4 y  $\alpha$ -D-1,6, lo cual le da una forma irregular ramificada.[1]

Dentro de las últimas tendencias en alimentos funcionales está la adición de fibra dietética debido a los beneficios que ésta presenta para los consumidores. Una de las definiciones de la fibra dietética indica que ésta consiste de material de origen vegetal resistente a la acción hidrolítica de las enzimas endógenas del tracto digestivo en los mamíferos [2].

Además de la fibra, existen constituyentes del almidón que no son digeridos en el tracto intestinal. Esta porción no digerible es conocida como almidón resistente, la cual presenta funciones fisiológicas similares a las de la fibra dietética [4], tal es el caso de su acción laxante, efecto hipocolesterolémico y bajando el índice glicémico (IG)[5].

En la actualidad los consumidores prestan especial atención a los beneficios fisiológicos que los alimentos ofrecen y el índice glicémico es uno de los indicadores que recientemente tienen los consumidores para calificar la calidad nutricional de un alimento rico en carbohidratos. Éste señala la habilidad de un alimento para elevar la concentración de glucosa en la sangre [6]. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y

la Alimentación recomiendan un elevado consumo de alimentos de bajo índice glicémico [6].

Previos estudios señalan que tratamientos de enfriamiento/calentamiento (E/C) conducen a la formación de almidón resistente (retrogradado) [7]. Por lo tanto es posible reducir el IG de alimentos almidonosos mediante la presencia de almidón resistente, manipulando diferentes materia primas y/o técnicas de procesamiento. El almidón resistente podría actuar como un sustituto de la fibra o también podría ser combinado con otras formas de fibra dietética para obtener un producto con mayores efectos fisiológicos benéficos, sin inhibir al consumidor de un producto agradable al gusto.

En el presente estudio se investigan dos cultivos nativos de la región andina del Ecuador, achira y papa, como fuentes potenciales de almidón resistente. Se estudia el efecto de ciclos repetidos de enfriamiento/calentamiento sobre la formación de almidón resistente.

### **1.1. Almidón Resistente (AR)**

La European Flair Concerted Action on Resistant Starch (EURESTA) define al almidón resistente como la suma del almidón y los productos de la degradación del almidón no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos [1]. El almidón resistente es ahora tomado en cuenta como parte de la fibra dietética, debido a su resistencia a la actividad enzimática en el intestino delgado. [1, 8]

Existen cuatro tipos de almidón resistente:

Almidón Resistente tipo I.\_

Es el almidón que físicamente se encuentra atrapado en una estructura de la planta y que por lo tanto no puede ser atacado por las enzimas digestivas. Un ejemplo de éste son las semillas y los granos enteros. Al momento de pasar por procesos de masticado y/o molienda, este almidón es liberado y puede ser digerido [9, 10].

#### Almidón Resistente tipo II.\_

El que se encuentra organizado en un arreglo cristalino que limita la accesibilidad de enzimas digestivas, como es el caso de ciertos almidones nativos provenientes de tubérculos y otros como el plátano verde [7, 9, 10].

#### Almidón Resistente tipo III (ARIII). \_

Son los polímeros de almidón retrogradado que se forman cuando el almidón se enfría después de ser gelatinizado [3]. Este proceso de retrogradación se presenta cuando sube la temperatura del almidón en presencia de agua y se gelatiniza. El gránulo es completamente hidratado y su estructura es destruida irreversiblemente. La estructura de la amilosa y la amilopectina cambia y se vuelve inestable. Al bajar la temperatura, las cadenas de polímeros de glucosa empiezan a reasociarse y estabilizarse mediante puentes de hidrógeno [13]. Este proceso se llama retrogradación del almidón [10] y forma una estructura nueva que es completamente diferente a la inicial. Esta nueva estructura no permite la acción de las enzimas gastrointestinales sobre ella, lo cual permite que llegue al intestino grueso sin ser metabolizada.

#### Almidón resistente tipo IV. \_

Este grupo incluye a los almidones que han sido modificados químicamente con el propósito de reducir la digestibilidad como por ejemplo almidones esterificados, eterificados y enlazados con químicos [6].

## **1.2. Ventajas del Almidón Resistente en la industria alimenticia**

El almidón resistente (AR) tiene un tamaño de partícula pequeño, apariencia blanca y es insípido. Presenta además otras propiedades físico-químicas como aumento de viscosidad, alta temperatura de gelatinización, buena calidad de productos extruidos (snacks y cereales con mejor expansión), facilidad de formación de films y una baja capacidad de retención de agua, haciéndolo útil en una variedad de industrias [1].

El almidón resistente no solo incrementa el contenido de fibra sino que también imparte propiedades especiales que no son características de alimentos ricos en fibra. El almidón resistente incrementa el atributo sensorial crujiente [11] en productos fritos y la estabilidad de los cereales cuando son mezclados con leche. Es utilizado en alimentos para celíacos, como laxantes y en ocasiones en productos para terapias de rehidratación oral. [1]

En un estudio realizado con alimentos fritos enriquecidos con almidón resistente (AR), se analizó la funcionalidad y contenido de fibra de éstos. Además de un gran aumento en el contenido de fibra del producto, se obtuvieron otros resultados favorables, como un color agradable y característico de este tipo de productos fritos [12]. Se encontró también que la incorporación de ARIII disminuyó la cantidad de grasa en la corteza y aumentó el contenido de humedad. Esto se debe a que el ARIII contribuye a crear una barrera que impide la absorción de grasa y reduce la pérdida de agua durante el proceso

de fritura. Otra característica importante del ARIII, es su alta estabilidad térmica, con temperaturas de fusión de 150°C [11], lo que le confiere estabilidad durante procesos de cocción [12]. Ciertos tipos comerciales de almidón resistente tipo III (Novelose 330), son estables a temperaturas de fritura (180 - 190°C).

En la actualidad, el tipo de alimentos que han sido enriquecidos con almidón resistente tipo III son en su mayoría productos de baja o media humedad como productos horneados (pan, pasteles, muffins, barras de cereal), cereales y pasta.

### **1.3. Funcionalidad fisiológica del Almidón Resistente**

El hecho que el AR no sea digerido en el tracto gastrointestinal, confiere muchos efectos positivos para la salud. Cuando el almidón resistente llega al intestino grueso, sin ser digerido, la microbiota del colon actúa sobre éste fermentándolo y produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) [13]. Los AGCC son una fuente de energía para las células del colon (butirato) y para el cuerpo entero (acetato y propionato) [12].

La producción de AGCC conjuntamente con la disminución del pH previenen el crecimiento de microorganismos indeseables como enterobacterias, incluyendo muchos tipos de *Escherichia coli*, y otros de posible carácter carcinogénico. [6, 14]

En un estudio realizado con ratas de laboratorio inoculadas con microbiota humana, se analizaron los efectos de una dieta rica en almidón resistente tipo III. El número de bacterias lácticas y bifidobacteria se incrementó en el intestino, conjuntamente con la producción de ácido láctico. Por otro lado hubo una disminución del número de enterobacterias en relación al grupo de ratas alimentadas con sacarosa [14].

En el grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en almidón resistente tipo III, la concentración de amoníaco se redujo en un 30-40% en la primera porción del colon (ciego). Al cambiar la microbiota fecal con la nueva dieta, no hay suficientes bacterias que produzcan el amoníaco. El amoníaco es un producto de la hidrólisis de los péptidos por la microbiota fecal, el cual tiene un papel importante en la carcinogénesis y otras enfermedades [14].

La actividad metabólica también fue alterada en el intestino de las ratas que consumieron una dieta rica en almidón resistente tipo III. Hubo una disminución de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa en el intestino de las ratas. La  $\beta$ -glucoronidasa es una de las enzimas de la microbiota intestinal, que desempeña un papel importante en la producción de tóxicos para la mucosa del colon [14].

Alimentos ricos en almidón resistente son también recomendados para controlar los niveles de azúcar en la sangre, debido a su índice glicémico bajo [12]. Alimentos con un índice glicémico bajo son considerados como una ayuda para los diabéticos y para perder peso [6].

El almidón resistente puede ser utilizado en alimentos dietéticos, donde se busca disminuir el aporte calórico del alimento. El valor energético del almidón resistente es de 8 kJ/g (2 kcal/g), valor considerablemente menor al del almidón que es digerido que es de 15 kJ/g (4.2 kcal/g) [6].

Actualmente, la causa de muchas enfermedades es la mala alimentación y algunas de ellas pueden estar relacionadas con un insuficiente consumo de fibra. La solución

inmediata a este problema sería aumentar el consumo de fibra en la dieta, sin embargo la situación no es tan fácil. En su mayoría, los consumidores se rehúsan a incluir alimentos ricos en fibra por muchas razones organolépticas (color, olor) y de textura, como son la dureza y palatabilidad. El poder tener un alimento que además de tener buenas características organolépticas y de textura, tenga los mismos y/o mejores beneficios que la fibra dietética, es un reto para la industria alimenticia. El almidón resistente es inodoro, de color blanco y con mejor palatabilidad que la fibra, lo cual significa que no altera las propiedades organolépticas del producto original. Es por esto que es tan importante la inclusión del almidón resistente en los alimentos, ya que sus propiedades además de ser funcionales, dan un producto de mayor calidad.

Por las razones antes expuestas, la tendencia actual es encontrar fuentes alternativas para obtener almidón con mejores características funcionales y fisico-químicas, tal es el caso de la utilización de almidón de plátano para la producción de almidón resistente [7].

## **1.4 Características de los cultivos en estudio**

### **1.4.1 Achira**

La achira (*Canna edulis Ker*) es una planta típica de la sierra ecuatoriana, caracterizada por el tamaño grande de sus hojas verdes o moradas. Es una de las primeras plantas domesticadas en la zona andina. Desarrolla un rizoma comestible de gran tamaño, que puede llegar a medir más de 60 cm de longitud y pesar hasta 27 kg. Estos rizomas ricos en almidón son producidos en una región vasta que va desde México hasta Argentina [15].

La mayoría de las plantas son usadas para obtener almidón, por medio de una extracción

acuosa. El almidón obtenido es usado a nivel familiar para consumo propio, para alimentar al ganado, como pegamento, como almidón para planchar y en Colombia para la confección de bizcochuelos [16]. La característica principal del almidón de achira es que contiene uno de los gránulos más grandes reportados con tamaños entre 35 - 101  $\mu\text{m}$  [17], en comparación con los de papa que presentan tamaños entre 15 y 110  $\mu\text{m}$  [18]. Este almidón al ser cocido desarrolla geles de alta viscosidad, brillosos y transparentes. Los de almidón de papa o maíz son por otro lado de poca transparencia. Según previos reportes [15], este almidón es de fácil digestibilidad, lo cual lo hace apto para la alimentación de niños, personas de la tercera edad y con problemas digestivos.

El rizoma de achira contiene entre 75 y 80% de almidón y 6-14% de azúcares. El contenido de amilosa del almidón de achira es de alrededor del 30% [16]. En la tabla #1 se presenta la composición química del rizoma de Achira. Se puede apreciar que el componente mayoritario son los carbohidratos totales, con contenidos bajos de grasa, fibra y proteína.

**Tabla # 1**

**Composición química del rizoma de Achira en base húmeda [16]**

<b>Composición</b>	<b>Rizoma</b>
Valor energético	130 kcal/100g
Humedad	66.3 %
Proteína	0.9 %
Grasa	0.1 %
Carbohidratos	
totales	31.3 %
Fibra	0.5 %
Cenizas	0.9 %

Hierro	1.4 mg/100mg
ácido ascórbico	7.0 mg/100mg

### 1.4.2 Papa

La papa (*Solanum tuberosum*) tienen su origen geográfico en la cordillera andina y es uno de los alimentos más consumidos en el Ecuador. La papa es una dicotiledónea herbácea con hábitos de crecimiento rastrero, generalmente de tallos gruesos y leñosos. La papa provee de una gran cantidad de nutrientes y de energía, por su contenido de almidón, que en promedio puede alcanzar un 14 % [19].

El almidón de papa ha sido muy industrializado y ofrece muchas utilidades en la industria alimenticia (como espesante y estabilizante de helados, gelatinas, sopas y salsas; aumenta la esponjosidad de productos horneados, para la preparación de edulcorantes, etc.), en la industria farmacéutica como relleno en píldoras y en la industria química para la fabricación de pegamentos [20].

El contenido de amilosa en el almidón de papa es de 17% [20]. El contenido de carbohidratos totales de la papa es menor al encontrado en el rizoma de achira, sin embargo la proteína y la fibra se encuentran en cantidades más apreciables (Tabla #2).

**Tabla #2**

**Composición química de la papa (tubérculo) en base húmeda [20]**

Composición	Tubérculo de papa
Valor energético	83kcal/100g
Humedad	75,50%
Proteína	2,50%
Grasa	0,10%
Carbohidratos	18,70%

totales	
Fibra	2,20%
Cenizas	1,00%
Hierro	1 mg/100mg
ácido ascórbico	15 mg/100mg

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales y reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Muestras de papa (*Solanum tuberosum* variedad chola) y achira (*Canna edulis Ker*) fueron adquiridas en el mercado local y en Patate, respectivamente.

#### **2.1. Análisis proximales**

El contenido de proteína de los almidones en estudio fue determinado según el método Kjeldahl (métodos 979.09 y 920.87, AOAC) [21]. El contenido de grasa fue determinado mediante el método de Soxhlet (método 922.06, AOAC) [21]. Los contenidos de ceniza, fibra cruda y azúcares totales fueron determinados mediante los métodos 923.03, 962.09 y 939.03 de la AOAC respectivamente. Finalmente el contenido de humedad se determinó utilizando una lámpara halógena (Mettler Toledo HB43, Suiza) usando el principio del método 925.10 del AOAC.

#### **2.2. Contenido de amilosa**

El contenido de amilosa de los almidones se determinó empleando el método colorimétrico descrito por Morrison y Laignelet. Este método se basa en la cuantificación colorimétrica con un espectrofotómetro (Genesys 10uv, EEUU) de complejos amilosa-yodo a 635nm [22]. Se midió el contenido de amilosa aparente, es

decir sin hacer una hidrólisis lipídica con etanol, debido a que el porcentaje de grasa en las muestras no era representativo.

## **Preparación de las muestras**

### **2.3. Extracción del almidón**

La achira y la papa fueron molidos en un cutter (Tecmaq CM-21, España) por 3 minutos a velocidad media para liberar los gránulos de almidón.

La pasta obtenida luego del proceso de desintegración fue filtrada en piezas de tela y lavada con agua repetidamente para obtener la mayor cantidad de almidón. La fibra obtenida después del proceso de lavado fue eliminada mientras que el almidón fue secado por un día a temperatura ambiente y posteriormente guardado en fundas de plástico selladas.

### **2.4. Gelatinización del almidón**

Con los dos tipos de almidón, se prepararon soluciones de almidón al 5% (p/v) en base húmeda (1g almidón en 20ml de agua) que fueron luego transferidas a tubos de cristal de tapa rosca. De acuerdo a Sajilata y col. [1] la gelatinización en presencia de altos contenidos de agua (95%) permite obtener una máxima retrogradación. Los geles preparados se expusieron a baños de agua a temperatura de ebullición (91°C) entre 3 - 5 minutos, con agitación constante, evitando de esta manera la sedimentación de los gránulos y obteniendo geles de aspecto uniforme.

### **2.5. Autoclavado**

Las muestras gelatinizadas previamente fueron divididas en cuatro grupos correspondientes a los ciclos de enfriamiento/calentamiento a ser empleados. Las muestras fueron autoclavadas en un autoclave (Proingal ACLA, Ecuador) a una temperatura de 121°C por 30 minutos, como se hizo en estudios previos [23].

## 2.6. Ciclos de enfriamiento/ calentamiento

Una vez autoclavadas, las muestras fueron sometidas a ciclos de enfriamiento/calentamiento seguidas de una liofilización para ser analizadas posteriormente. El proceso de liofilización permitió “detener” el incremento del contenido de almidón resistente tipo III hasta su cuantificación. Cada ciclo de enfriamiento/calentamiento consistió en un almacenamiento a una temperatura de 3°C por 24 horas seguido de 24 horas a 37°C [25] (Tabla #3). La muestra correspondiente al tiempo cero, luego del autoclavado, fue congelada y liofilizada. El resto de muestras fueron sometidas a uno, dos y tres ciclos sucesivos de enfriamiento/calentamiento.

**Tabla #3**

**Ciclos de enfriamiento / calentamiento usados sobre geles de almidón de achira y papa**

	<b>Ciclo 1</b>		<b>Ciclo 2</b>		<b>Ciclo 3</b>	
<b>Tiempo</b>	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
<b>Temperatura</b>	3°C	37°C	3°C	37°C	3°C	37°C

## 2.7. Análisis de Almidón Resistente tipo III:

### Método

El almidón resistente (almidón tipo III) fue determinado de acuerdo a Saura- Calixto y col. (1993) [26].

Se pesaron 60 mg del almidón liofilizado en tubos de vidrio con tapa rosca, añadiéndose tampón fosfato 0.08M y regulando el pH a 6. Posteriormente se adicionó  $\alpha$ -amilasa termoestable (*Bacillus amyloliquefaciens*, Sigma A7595) y se incubó la muestra a temperatura de ebullición (91°C) por 30 minutos y agitación constante. Tras la ebullición, la muestra fue enfriada a temperatura ambiente. Se añadió NaOH 0.275N para regular el pH a 7.5 previo a la adición de 100  $\mu$ L de solución de proteasa (50mg de proteasa, *Bacillus licheniformis*, Sigma P5450-5G, en 1ml de tampón fosfato) e incubación a 60°C por 30 minutos. Tras enfriar la muestra a temperatura ambiente se añadió HCl 0.325N y el pH fue regulado a 4.5, para luego añadir amiloglucosidasa (Amiloglucosidasa de *Aspergillus Níger* A7095) e incubarla en baño con agitación a 60°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo la muestra fue centrifugada (Centra GP8, EEUU) a 1850 g por 15 minutos, eliminando el sobrenadante. El precipitado de la centrifugación fue lavado con 10ml de agua destilada, 10ml de etanol y 10ml de acetona, centrifugando y eliminando los sobrenadantes entre cada lavado. Al finalizar los lavados, se añadió KOH 4M y se incubó la muestra por 30 minutos en un baño con agitación a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C). Una vez terminada la incubación, se añadió HCl 2N, tampón acetato sódico y se reguló el pH a 4.75 previo a la adición de amiloglucosidasa. Las muestras fueron entonces incubadas a 60°C por 30

minutos y centrifugadas a 1850 g por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron recogidos conjuntamente con el agua empleada para el lavado de los precipitados de la centrifugación. Los sobrenadantes fueron coloreados empleando el reactivo GOD-PAP (Peridochrom Oxidasa/Peroxidasa, GOD-PAP, Sigma G3293). El contenido de almidón resistente tipo III en las muestras, se cuantificó mediante las absorbancias de los sobrenadantes a 500nm (espectrofotómetro Genesys 10uv, EEUU) conjuntamente con los datos de una curva estándar (Ecuación 1).

La curva estándar fue obtenida con soluciones de glucosa a diferentes concentraciones. Las mismas que fueron coloreadas con el reactivo GOD-PAP como se indicó anteriormente. Las mediciones de absorbancia fueron realizadas utilizando agua como blanco.

(Ecuación 1)

$$\% \text{ Almidón resistente en fibra soluble} = \frac{\text{glucosa } (\mu\text{g} / \text{ml}) \times \text{volumen} \times \text{dilución} \times 100 \times 0.9}{1000 \times \text{peso de muestra seca (mg)}}$$

### **2.7.1. Contenido de almidón resistente tipo III para muestras nativas**

Se siguió el mismo procedimiento antes detallado, pero partiendo de muestras de almidón que no pasaron por ningún tipo de ciclo de enfriamiento/calentamiento.

## **2.8. Determinación de claridad de los geles de almidón**

Se utilizó el método empleado por Bello-Pérez [27] que consiste en medir la transmitancia (espectrofotómetro Genesys 10uv, EEUU) de suspensiones de almidón

(1% b.s.) previamente gelatinizadas a temperatura de ebullición durante 30 minutos a una longitud de onda de 650 nm.

## **2.9. Análisis Estadístico**

Para analizar el contenido de almidón resistente tipo III en las muestras se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA). Se hicieron tres repeticiones y las muestras fueron analizadas aleatoriamente.

Para determinar si la diferencia entre el contenido de almidón resistente tipo III entre los diferentes ciclos de enfriamiento/calentamiento fue estadísticamente significativa, los resultados fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA). (Ver Tablas #8 y #9, Anexo#1).

Para obtener más información de los resultados y determinar si hay una diferencia significativa entre el contenido de almidón resistente tipo III entre los dos cultivos utilizados, se usó un DCA con arreglo factorial 2x4 (Ver tabla #10, anexo #1). Finalmente, el contenido de almidón resistente entre las muestras de almidón nativo y el ciclo cero fue analizado utilizando una prueba t. (Ver tabla# 11, anexo #1).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis Proximales

La composición de los almidones de achira y papa se presentan en la Tabla #4.

**Tabla #4**

**Composición química de los almidones de papa y achira (base húmeda)**

	<b>Achira</b>	<b>Papa</b>
<b>% Proteína</b>	0.56	1.08
<b>% Grasas</b>	0.17	0.15
<b>% Humedad</b>	13.67	10.62
<b>% Cenizas</b>	0.36	0.68
<b>% Fibra cruda</b>	0.29	2.18
<b>% Azúcares</b>	0.29	0.33
<b>% Almidón*</b>	84.65	84.96

**n=2 repeticiones**

**\* Determinado por diferencia**

El análisis proximal (Tabla #4) reveló diferencias entre los almidones de achira y papa. El contenido de proteína de los almidones de achira y de papa fue de 0,56 y 1,08% respectivamente. El valor de proteína para papa fue mayor al reportado por Alvis y col., que fue de 0.62% [28]. El mayor contenido de proteína probablemente se deba a que no

fue eliminada completamente durante los lavados de la extracción del almidón. Los valores bajos de proteína sugieren poca interferencia en la retrogradación del almidón, debida a la formación de complejos proteína-almidón. Por lo general, las proteínas forman cuerpos alrededor del gránulo de almidón, lo cual provee de una capa rígida, de modo que la gelatinización y otras reacciones no pueden llevarse a cabo completamente, a menos que esta barrera sea removida [10]. Los valores de grasa obtenidos para achira (0.17%) y papa (0.15%), fueron menores a los reportados para papa y yuca de 0.35 y 0.31 respectivamente [28]. En un estudio desarrollado previamente con almidón y aceite de oliva, la presencia de lípidos disminuyó la obtención de almidón resistente. Los lípidos, en especial los monoglicéridos, crean enlaces con la amilosa en el momento de la gelatinización, disminuyendo de esta manera la cantidad de amilosa disponible a ser retrogradada [10]. El contenido de grasa en las muestras de almidón en esta investigación fue muy bajo por lo cual tampoco hay riesgo de que esta interfiera en el proceso de retrogradación. El contenido de fibra cruda (0.29 y 2.18% para achira y papa respectivamente) reportó valores mucho mayores que los reportados para papa y yuca que fueron de 0.05 y 0.04% respectivamente. Estos valores indican que probablemente el proceso de separación no fue el adecuado, permitiendo una presencia de gran cantidad de fibra en el almidón extraído. El contenido de azúcares en los almidones de achira y papa fue de 0,29 y 0,33% respectivamente. Los azúcares debieron ser eliminados en la extracción húmeda del almidón. La presencia de azúcares reveló su importancia en un estudio previo realizado [10] en donde se pudo ver como su presencia disminuye la formación de almidón resistente. La razón de esta disminución, es la interacción entre las moléculas de azúcar y las cadenas moleculares de almidón, lo cual crea una alteración en la matriz de almidón gelatinizado.

El almidón presente en las muestras presentó valores similares en las dos muestras, siendo 84.65 y 84.96% para achira y papa respectivamente.

### 3.2. Contenido de amilosa en almidón de achira y de papa

El contenido de amilosa aparente en el almidón de achira fue mayor que el de almidón de papa, con valores de 26 y 22.9% respectivamente (Tabla #5). Estos valores fueron menores a los reportados por Barrera, Tapia y Monteros (27% para achira y 28% para papa) [29]. Las diferencias observadas pueden deberse al método de análisis utilizado y/o a la variedad de papa o achira utilizados.

**Tabla #5**

**Contenido de amilosa aparente y amilopectina en almidones de achira y papa**

<b>Cultivo</b>	<b>% Amilosa aparente</b>	<b>% Amilopectina*</b>
<b>Achira</b>	26.03	58.62
<b>Papa</b>	22.87	62.09

\* Obtenido por diferencia

### 3.3. Contenido de Almidón Resistente tipo III

Los promedios del contenido de almidón resistente tipo III presente en las muestras de achira y papa después de los diferentes ciclos de enfriamiento/calentamiento son

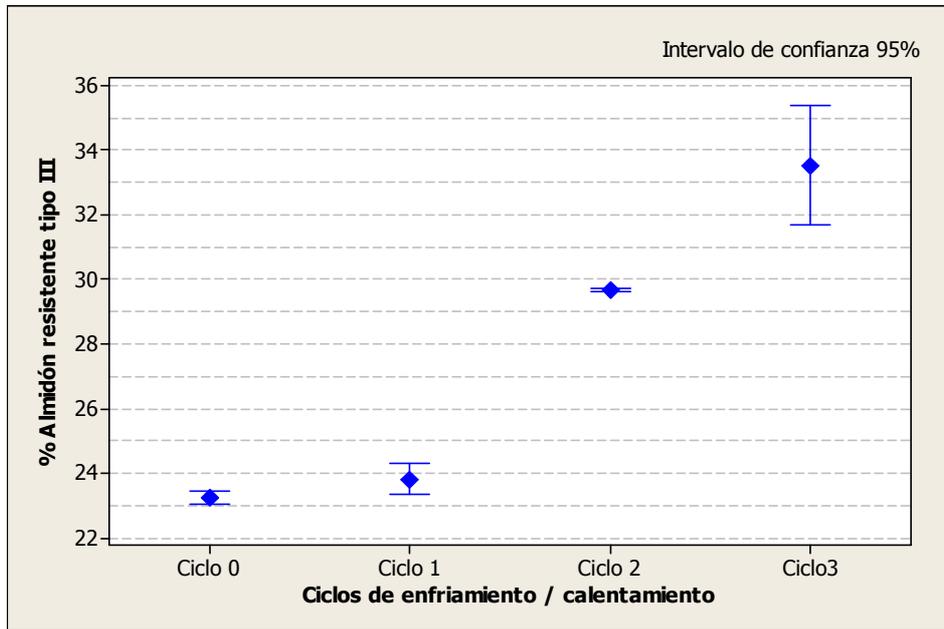
presentados en la Tabla #6. Los datos originales del contenido de almidón resistente tipo III se encuentran en las tablas #12 y #13 del anexo #2. Al comparar la cantidad de ARIII en las muestras se observó un incremento de éste a lo largo de los diferentes ciclos (Figuras #1 y #2). A pesar de este incremento, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas de porcentaje de almidón resistente tipo III entre ciclos dentro del mismo cultivo ( $p > 0.05$ ), pero si se encontraron diferencias entre los cultivos estudiados ( $p < 0.05$ ) (Ver tablas #8, #9 y #10, Anexo #1). Al hacer un análisis de regresión con ambos cultivos, se obtuvo que por cada ciclo, el porcentaje de almidón resistente aumenta en 3.76% y 0.65% para achira y papa respectivamente. Con la fórmula obtenida de la regresión lineal, se hicieron estimaciones de los valores de almidón resistente tipo III donde se puede ver que para ambos cultivos, su comportamiento fue ascendente (Ver Figuras #7 y #8, Anexo #1). El cultivo que presentó una mayor cantidad de almidón resistente tipo III fue el de achira, lo que está directamente relacionado con el mayor contenido de amilosa de este almidón [30]. Esto puede ser observado en la Figura #3, que muestra la relación entre el contenido de ARIII del último ciclo de E/C con el contenido de amilosa.

**Tabla #6**

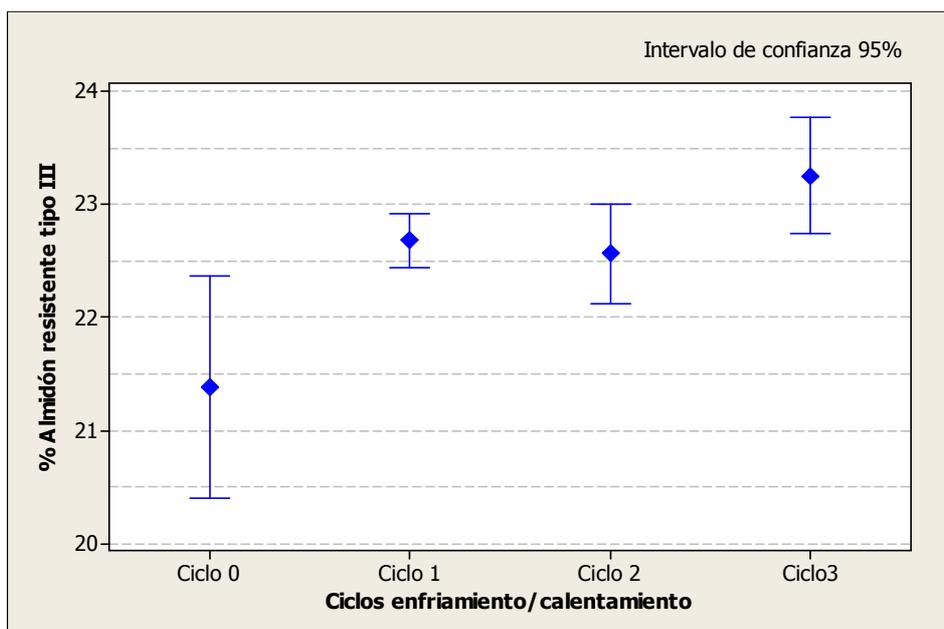
**Contenido de almidón resistente tipo III en almidones de achira y papa bajo varios ciclos de enfriamiento/calentamiento**

<b>Muestra</b>	<b>Ciclo 0</b>	<b>Ciclo 1</b>	<b>Ciclo 2</b>	<b>Ciclo 3</b>
<b>Achira</b>	23,19	23,86	29,64	33,79
<b>Papa</b>	20,48	22,88	22,22	22,86

n = 3 repeticiones

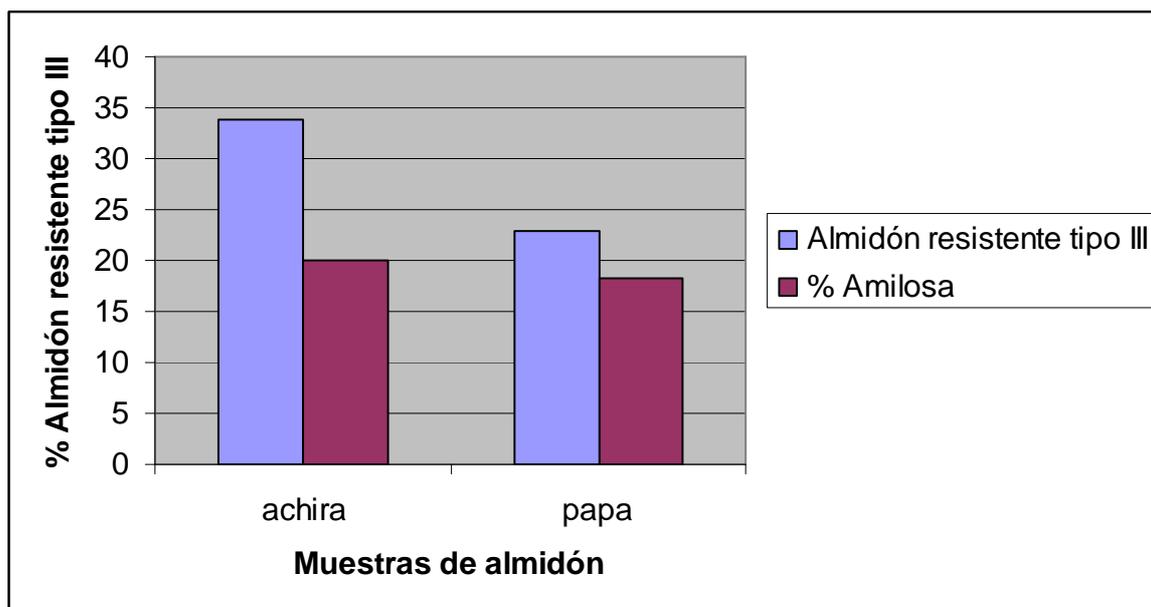


**Figura #1:** Variación del contenido de almidón resistente tipo III de almidón de Achira tras tres ciclos de enfriamiento/calentamiento



**Figura #2: Variación del contenido de almidón resistente tipo III de almidón de papa tras tres ciclos de enfriamiento/calentamiento**

La relación entre el contenido de amilosa y el nivel de retrogradación al final de los ciclos, para ambos cultivos se puede ver en la Figura #3.

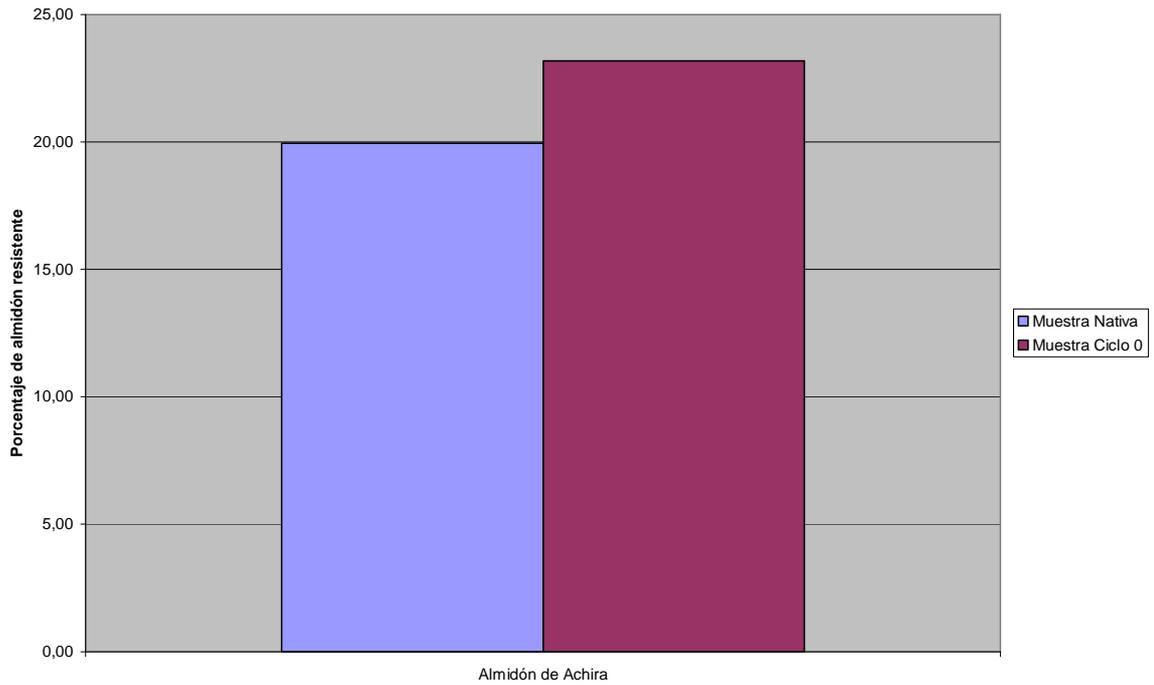


**Figura # 3: Relación entre el contenido de amilosa con el contenido de almidón resistente tipo III luego de tres ciclos de enfriamiento/calentamiento en muestras de almidón de achira y papa**

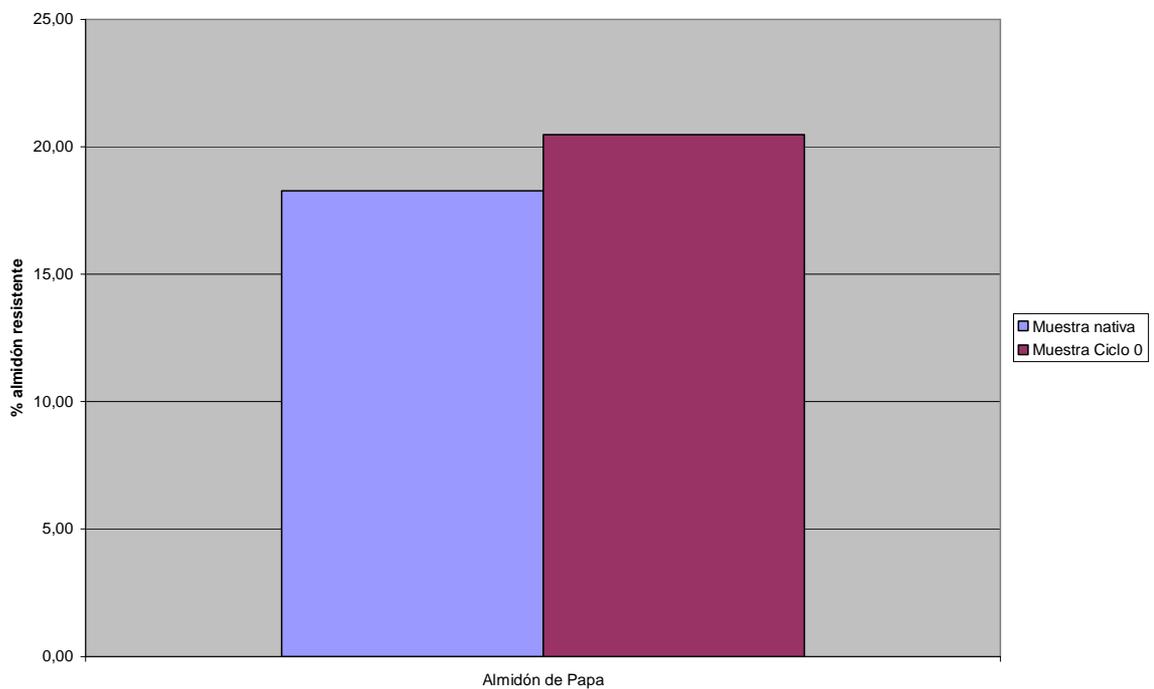
Aparte del contenido de amilosa, es importante el poder liberar la amilosa presente en la estructura granular para que de esta manera este disponible al proceso de re-asociación (retrogradación). Para poder liberar la amilosa es importante elevar la temperatura y en este estudio se usó el autoclavado a  $121 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 minutos, de manera similar a investigaciones anteriores [23]. El proceso de autoclavado al parecer también ocasionó cierta hidrólisis en los geles de almidón, debido al desarrollo de una menor viscosidad y mayor claridad luego del autoclavado.

### **3.3.1. Almidón resistente tipo III en muestras nativas de almidón de achira y papa**

El almidón resistente presente en las muestras nativas, es decir que no han sido sometidas a ningún tratamiento térmico podría corresponder a almidón resistente tipo II, es decir aquel que posee un arreglo cristalino complejo. El contenido de almidón resistente en el almidón nativo de achira fue ligeramente superior al del almidón nativo de papa con valores de 19.95 y 18.28 % respectivamente. Estos valores se compararon con el contenido de almidón resistente tipo III del ciclo cero, observándose incrementos del 12% y 16% entre las muestras nativas y el ciclo cero de papa y achira respectivamente (Figuras #4 y #5). Los incrementos de almidón resistente pueden tener su origen en procesos de retrogradación durante el enfriamiento posterior al autoclavado, específicamente el de la congelación previa a la liofilización. La amilosa es la que retrograda en primera instancia en lapsos de tiempo de minutos u horas, mientras que la amilopectina pasa por este proceso durante un período de tiempo más largo (días) [31]. Es por esto, que posiblemente en el paso del estado nativo al ciclo cero solo haya retrogradado la amilosa, mientras que en los ciclos siguientes la amilopectina fue la responsable del aumento de ARIII.



**Figura #4:** Comparación del contenido de almidón resistente entre muestra nativas y las de ciclo cero de almidón de Achira



**Figura #5:** Comparación del contenido de almidón resistente entre muestra nativas y las de ciclo cero de almidón de Papa

A simple vista se pudo observar una diferencia notoria en el contenido de almidón resistente entre las muestras de achira y de papa nativas y de ciclo cero, pero al hacer una prueba-t se observó que no existía diferencia entre las medias en ninguno de los dos cultivos. (Ver tabla #11, Anexo #1)

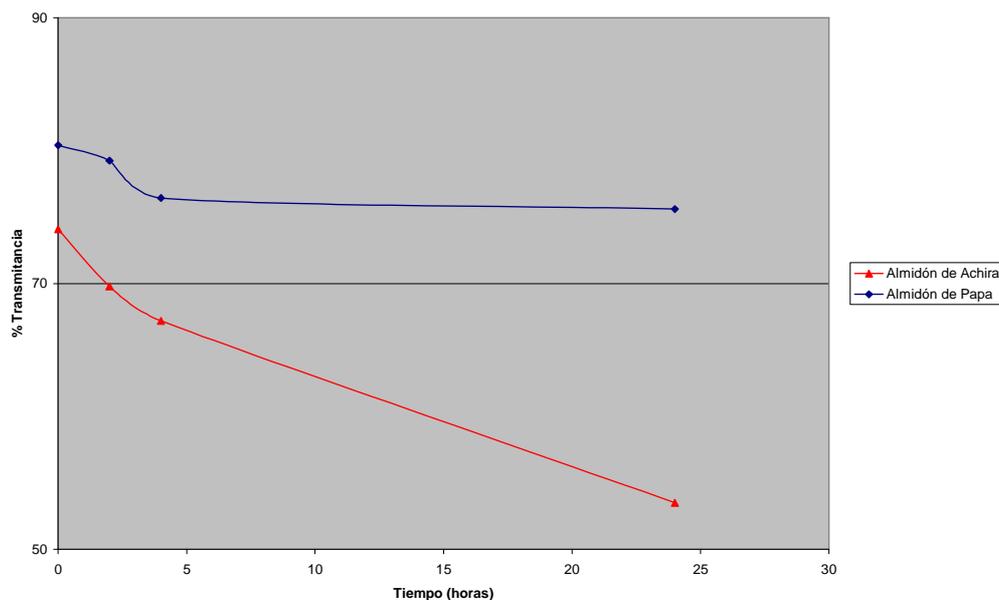
### 3.4. Claridad de los geles de almidón

Las medidas de la transmitancia de los geles de almidón de achira y papa se encuentran en la Tabla #7. La transmitancia, cuyo valor es directamente proporcional a la claridad de un gel, disminuyó con el tiempo de almacenamiento a 3°C. (Figura #6). Según Doublier, los cambios en la transmitancia de luz en geles de almidón que contienen amilosa, pueden deberse al resultado de la transformación de estructura de una matriz de amilosa a un estado agregado denso (retrogradación) [24]. Este estudio secundario ratificó los resultados de almidón resistente obtenidos anteriormente ya que la menor transmitancia del gel de achira revela una mayor retrogradación que la muestra de papa, lo que se traduce en un mayor contenido de ARIII para el primero.

**Tabla #7**

**Variación del porcentaje de transmitancia de geles de almidón de achira y papa con el tiempo de almacenamiento a 3°C**

	<b>t0</b> <b>(0 horas)</b>	<b>t1</b> <b>(2 horas)</b>	<b>t2</b> <b>(4 horas)</b>	<b>t3</b> <b>(24 horas)</b>
<b>Achira</b>	74,1	69,8	67,2	53,5
<b>Papa</b>	80,4	79,25	76,45	75,6



**Figura #6:** Variación del porcentaje de transmitancia de geles de almidón de achira y papa en el tiempo de almacenamiento a 3°C

#### **4. CONCLUSIONES**

Se observó un incremento de almidón resistente tipo III para los almidones de achira y papa a lo largo de los diferentes ciclos de calentamiento/enfriamiento, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas. Comparando los dos cultivos utilizados, el almidón de achira presentó un valor de almidón resistente más alto que la muestra de almidón de papa a lo largo de los ciclos. El efecto de la congelación y liofilización del ciclo cero produjo niveles de incremento del almidón resistente en relación al almidón nativo en el orden del 12% y 16% para papa y achira respectivamente, aunque estadísticamente, no fue una diferencia significativa.

Una de las razones por las cuales se le atribuye a la achira una mayor retrogradación, es su mayor contenido de amilosa. La estructura de la amilosa es alterada y reordenada más fácilmente con los cambios de temperatura (enfriamiento/calentamiento), produciéndose una mayor retrogradación. Este nivel de retrogradación puede también

verse en los resultados de claridad de los geles, donde éste presentó una claridad menor que el almidón de papa, concluyendo que se debió a una retrogradación mayor.

El contenido de almidón resistente tipo III de las muestras de achira (33.79%) y papa (22.86%), sometidas a procesos de enfriamiento/calentamiento son mayores que en otros alimentos como pan integral (1.5%) y cereales de desayuno (1.0 – 6.2%), entre otros [8]. Por ello se puede ver que estos tipos de almidón, en especial el de achira, sometidos a ciclos de enfriamiento/calentamiento, son una fuente potencial de almidón resistente tipo III para ser aislado para la elaboración de aditivos de ARIII con posibles aplicaciones en el desarrollo de alimentos funcionales.

En este estudio se esperaba tener un incremento de ARIII, que sea estadísticamente significativo al aplicar varios ciclos de enfriamiento/calentamiento, por lo que se podría evaluar si un mayor número de ciclos afecta el contenido de ARIII. Paralelamente sería interesante investigar el efecto de una mayor temperatura durante la etapa de autoclavado, conjuntamente con un incremento en el contenido de agua utilizado en la gelatinización.

## **5. REFERENCIAS**

- [1] M.G. Sajilata, S. Rekha & R. Pushpa,: Resistant starch-A review. *Comprehensive Reviews in food science and food safety* **2006**, *5*, 1-17.
- [2] J. Ruales : Fibra dietética- Definición, Química y Efecto fisiológico. Almidón resistente. Simposio en Carbohidratos. **1993**
- [3] P. Harris & L. Ferguson, :Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis toxicology and environmental mutagenesis *Genetic* **1999**, *research 443*, 95-110.
- [4] N. G. Asp,: Digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos. Simposio en carbohidratos. **1993**
- [5] Anon. AACC Board holds midyear meeting. *Cereal Foods World*. **2000**
- [6] A.P. Nugent. : Health properties of resistant starch. *British Nutrition Bulletin* **2005**, *30*, 27-54.
- [7] R.A. González, R. Mora, H. Hernández, M. Sánchez & L.A. Pérez: The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food research international*. **2007**, *40* 304-310.
- [8] J. Holm,:Digestibility of amylose-lipid complexes *in-vitro* and *in-vivo*. *Starch/Starke* **1983**, *35*,294-297
- [9] N. Sozer, A.C. Dalgic & A. Kaya,: Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. *Journal of food engineering* **2007**, *81*, 476-484
- [10] A. Escarpa, M.C. González, M.D. Morales & F. Saura- Calixto,: An approach to the influences of nutrients and other food constituents on resistant starch formation. *Food Chemistry* **1997**, *60*, 527-532.
- [11] Norma Española. Análisis sensorial, Vocabulario. Norma UNE 87-001-94/ISO S492:1992. **1994**.

[12] T. Sanz , et al., : Resistant starch (RS) in battered fried products: Functionality and high fibre benefit. *Food Hydrocolloids* **2007**, *18*, 1-6.

[13] Englyst H. & Hudson G.,:The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry* **1996**, *57*, 15-21.

[14] S. Silvi, C.J. Rumney, A. Cresci & I.R. Rowland: Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, *86*, 521-530.

[15] Lost crops of the Incas: Little- known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation **1989**.

[16] R. Chaparro & H. Cortés. La Achira. *Canna Edulis Ker: Cultivo, industrialización y Utilidad forrajera*. Bogotá, **1978**

[17] S. Santacruz, J. Ruales & A.-C. Eliasson, :Three underutilised sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part II. Rheological Characterisation. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *51*, 85-92

[18] S.N. Moorthy,: Tuber crop starches. Central Tuber Crops Research Institute, St. Joseph's Press. Kerala, India. **1996**.

[19] M. Pumisacho & S. Sherwood. El cultivo de la papa en Ecuador. Ecuador, **2002**.

[20] J.E. Guzman. La Papa. Venezuela, **1988**

[21] Official methods of analysis. Association of official analytical chemists, 15<sup>th</sup> edition, **1990**.

[22] Morrison & Laignelet.: Contenido de amilosa utilizando colorimetría. Manual de caracterización de Carbohidratos **1983**, 26.

[23] You & Lim, : The influence of autoclaving and microwave heating on the Mw determined by using HPSEC. *Cereal chemistry* **2000**, *77*, 303-308.

- [24] J.L. Doublier,: Rheological properties of cereal carbohydrates. Avi book. **1990**, 132 - 137
- [25] A. Kalb & C. Sterling.:Temperature and the retrogradation of Starch. Journal of Food Science **1961**, 26, 587-592.
- [26] Saura- Calixto y col.,: Almidón Resistente Asociado a Fibra Dietética. Manual de caracterización de Carbohidratos **1993**, 78.
- [27] Bello-Pérez. Claridad de los geles de Almidón. Manual de caracterización de Carbohidratos **1995**, 57.
- [28] A. Alvis, C. Vélez, H. Villada y M. Rada-Mendoza, : Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame, Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. Información Tecnológica **2008**, 19, 19-28.
- [29] V. Barrera, C. Tapia & A. Monteros, :Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación **2004**, 4.
- [30] Wu HC, Sarko A. The double helical molecular structure of crystalline A-amylose. Carbohydrates. **1978**, 61:7.
- [31] H. Fredriksson, J. Silverio, R. Andresson, A.-C. Eliasson & P. Aman, : The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. Enviado a Carbohydrates Polymers. **1997**