

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

*Doctoranda*  
**Mgter. Bqca. Marta Aurelia HORIANSKI**

## **Digestibilidad in vitro y propiedades fisicoquímicas del almidón de mandioca modificado por la combinación de tratamientos hidrotérmicos y químicos**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias Aplicadas”**

*Director*  
**Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY**

*Co-Director*  
**Dr. Juan Manuel PERALTA**

**Posadas, 2019**



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y  
Naturales



# **Digestibilidad *in vitro* y propiedades fisicoquímicas del almidón de mandioca modificado por la combinación de tratamientos hidrotérmicos y químicos**

**Por Mgter. Bqca. Marta Aurelia HORIANSKI**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de  
la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de**

**DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS**

**Posadas, República Argentina  
2019**

**Director**

Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY

**Co-director**

Dr. Juan Manuel PERALTA

**TRIBUNAL EXAMINADOR** (Resolución Consejo Directivo Nro. 101/19)

Dra. Liliana Beatriz ZAGO

Universidad Nacional de Buenos Aires

Dra. Beatriz del Valle ARGÜELLO

Universidad Nacional de Misiones

Dr. Pedro Darío ZAPATA

Universidad Nacional de Misiones

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA** (Disposición Nro. 1431/19)

Posadas, 16 de agosto de 2019

**DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* Y PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN DE MANDIOCA  
MODIFICADO POR LA COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS  
HIDROTÉRMICOS Y QUÍMICOS**

**Mgter. Bqca. Marta Aurelia HORIANSKI**

**Lugar de desarrollo del trabajo de tesis**

Laboratorio de la Fundación para el Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT). Laboratorio de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Laboratorio de la Universidad del Litoral (UNL). Trabajo financiado por una beca de doctorado de la UNaM. Resolución Rectorado Nro. 1091/12.

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo Nro. 033/18)**

Dra. Liliana Beatriz ZAGO	Universidad Nacional de Buenos Aires
Dra. María Marcela BROUSSE	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Ana Paula BUTIUK	Universidad Nacional de Misiones

**CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS**

Proyecto de Carrera Nro. 10933/11  
Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación  
Universitaria (CONEAU) Nro. 344/11.

*A mi esposo, Sergio*  
*A mi madre, Ramona*  
*A la memoria de mi padre*

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, Sergio, por ser el pilar en mi vida, por su inmenso apoyo y comprensión y por sus palabras de estímulo que me motivaron a superar los desafíos que se fueron presentando.

A cada uno de los integrantes de mi familia y principalmente a mi madre, Ramona, quien me apoyo siempre en cada uno de mis objetivos en la vida.

A mi Director, por confiar en mí, guiarme constantemente durante el desarrollo de la tesis, aportarme sus conocimientos e incentivar me para alcanzar los objetivos del trabajo.

A mi Codirector, por su gran predisposición y colaboración en la realización de los ensayos de laboratorio, por sus minuciosas observaciones e invaluable sugerencias.

A la fundación para el Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT), por brindarme la posibilidad de utilizar sus instalaciones, equipos e insumos para la realización de los ensayos de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Misiones, por el apoyo económico con la beca que fue de gran ayuda y me permitió comenzar a transitar el camino para la obtención de los objetivos planteados.

A las chicas del laboratorio de la fundación DINCYT: Raquel, Paola, Tamara y Adriana, por su amistad, gran apoyo, predisposición y colaboración incondicional. Por concederme un espacio en el laboratorio y transformarme en amenas las incansables jornadas de trabajo.

A Bárbara de la Universidad del Litoral, por su valiosa contribución en los ensayos de reometría dinámica.

A Loly, por sus palabras de aliento, voluntad ilimitada e interés en que llegara a la meta.

A mis colegas de trabajo, por comprenderme y apuntalarme en el proceso para la obtención del grado académico de Doctor.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AACC	<i>American Association of Cereal Chemistry</i>
ADL	Almidón de Digestión Lenta
ADR	Almidón de Digestión Rápida
AE	Autoclave-Enfriamiento
AN	Almidón de Mandioca Nativo
ANN	<i>Annealing</i> -Templado
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemistry</i>
AR	Almidón Resistente
CAA	Código Alimentario Argentino
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i> -Código de Regulación Federal
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetría diferencial de barrido
DINCyT	Fundación para el Desarrollo de la Investigación Científica y Tecnológica
EC	Enlaces Cruzados
EPI	Epiclorhidrina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FD	Fibra Dietaria
FDT	Fibra Dietaria Total
GEC	Grado de Enlaces Cruzados
GP	Grado de Polimerización
GS	Grado de Sustitución
H	Hidrotérmico
HMT	<i>Heat Moisture Treatment</i> - Tratamiento de calor y humedad
HMWDF	<i>High molecular weight Dietary Fibre</i> - Fibra dietaria de alto peso molecular
H-Q	Hidrotérmico-Químico
IAA	Índice de Absorción de Agua
IG	Índice de Glucemia
IOM	<i>Institute of Medicine of the National Academies</i>
Nro	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPT	<i>Osmotic Pressure Treatment</i> - Tratamiento de presión osmótica
OSA	Octenil Succínico Anhídrido
PH	Poder de Hinchamiento
Q	Químico
Q-H	Químico-Hidrotérmico
SIB	Segmentos Interbloques
SIC	Segmentos Interclúster
SOL	Solubilidad
TMFS	Trimetafosfato de Sodio
TPFS	Tripolifosfato de Sodio
UB	Unidades Brabender
% SOL	Porcentaje de Solubilidad
% T	Porcentaje de Transmitancia

# DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN DE MANDIOCA MODIFICADO POR LA COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS Y QUÍMICOS

## RESUMEN

El almidón de mandioca nativo (AN) es el derivado más explotado de las raíces de mandioca cultivadas en la provincia de Misiones, principal productora en la Argentina. Éste y otros almidones de distintos orígenes botánicos, se emplean en la elaboración de alimentos y de diversos productos. Los almidones nativos presentan una utilidad restringida en la industria, debido a que ciertas condiciones de los procesos tecnológicos les causan efectos negativos, como por ejemplo: descomposición térmica, retrogradación y sinéresis, entre otros. La adaptación de los almidones a funciones específicas se realiza alterando sus características físicas y químicas, lo cual amplía su rango de aplicación industrial y les aporta mayor valor agregado. La digestibilidad de los almidones también puede ser afectada mediante tratamientos físicos o químicos, obteniendo los llamados almidones resistentes (AR). Los AR resultan de importancia por presentar efectos beneficiosos para la salud por formar parte de la fibra dietaria y por tener buenas propiedades funcionales. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto del empleo combinado de tratamientos hidrotérmicos: templado “*annealing*” (ANN), calor y humedad “*heat moisture treatment*” (HMT) o presión osmótica “*osmotic pressure treatment*” (OPT) con tratamientos químicos: enlaces cruzados (EC) con epíclorhidrina (EPI) o con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (TMFS/TPFS o T/T), en la formación de AR de grado alimenticio, a partir del AN producido en la provincia de Misiones (Argentina). El objetivo secundario fue evaluar las propiedades fisicoquímicas del almidón modificado con mayor contenido de AR con la finalidad de predecir su potencial uso como ingrediente en alimentos. Se modificó almidón comercial de mandioca nativo (*Manihot esculenta* Crantz) producido en la provincia de Misiones por los tratamientos hidrotérmicos (ANN, HMT y OPT) y químicos (EC EPI y EC T/T) y por sus combinaciones. El ANN se realizó manteniendo una suspensión de almidón (30 %, p/v) a 45 °C y 50 °C por 24 h y 48 h. El HMT se efectuó con una humedad de 20 % a 90 °C y 105 °C por 60 min, 120 min, 5 h y 10 h. Para la modificación por el OPT se mantuvo, una suspensión de almidón (50 %, p/v en solución saturada de sulfato de sodio), a 90 °C, 105 °C, 110 °C y 115 °C por 60 min y 120 min. El EC EPI se realizó a pH 11,0 y 30 °C con concentraciones de EPI de 0,15 %

y 0,30 % (p/v) durante 4 h, 8 h, 12 h y 24 h. Para la modificación por EC T/T se trató una suspensión de almidón (33,96-41,04 %, p/p) con una mezcla de TMFS/TPFS (99:1, p/p) en el rango de concentración de 7,17-15 % (p/p) durante 3 h a 45 °C y pH 11,0. Se cuantificó el contenido de AR por el método de fibra dietaria total (FDT) (Método 985.29 de la *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC) en los almidones modificados por los tratamientos individuales hidrotérmicos y químicos y en los almidones modificados por la combinación de los tratamientos hidrotérmico-químico y viceversa. En los almidones modificados por EC T/T se determinó el contenido de fósforo por el método colorimétrico de la AOAC 995.11. Esto se realizó con el objeto de comprobar que el contenido de fósforo no excediera el límite máximo permitido por el Código Alimentario Argentino de 0,4 % para un almidón modificado de grado alimenticio. Las propiedades fisicoquímicas evaluadas en el almidón modificado con mayor contenido de FDT fueron: pH, acidez titulable, distribución del tamaño de los gránulos utilizando un microscopio óptico equipado con retícula de ocular, poder de hinchamiento, % de solubilidad, índice de absorción de agua, claridad y estabilidad de las pastas, propiedades de las pastas y grado de enlaces cruzados empleando un viscoamilógrafo Brabender, propiedades térmicas por calorimetría diferencial de barrido y comportamiento reológico dinámico mediante un reómetro de tensión controlada con geometría de cono-plato. Se observó que en las condiciones estudiadas, ni los tratamientos hidrotérmicos (ANN, HMT y OPT) ni el tratamiento químico de EC EPI y sus combinaciones condujeron a una reducción importante de la digestibilidad *in vitro* del almidón de mandioca modificado, mientras que el tratamiento químico de EC T/T permitió la obtención de almidón modificado de grado alimenticio con un elevado contenido de FDT en ciertas combinaciones de concentración de reactivo/almidón. Se detectó un incremento de FDT con el aumento de la concentración de reactivo y de almidón. Las combinaciones de los tratamientos hidrotérmicos ANN u OPT con el tratamiento de EC T/T, independientemente del orden de aplicación, no favorecieron la formación FDT. Los almidones modificados por estas combinaciones presentaron mayor digestibilidad *in vitro* que el almidón modificado por el tratamiento químico. Se observó que determinadas combinaciones del tratamiento hidrotérmico de HMT con el tratamiento químico de EC T/T (secuencia hidrotérmico-químico) causaron un efecto sinérgico en la formación de FDT produciendo cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas. El tratamiento que resultó más efectivo para incrementar el contenido de FDT correspondió a la combinación del tratamiento HMT realizado a 105 °C por 5 h

con el tratamiento de EC T/T empleando una concentración de reactivo de 15 % y una concentración de almidón de 41,04 %. Este tratamiento permitió la obtención de un almidón modificado de grado alimenticio con un contenido de FDT de 39,4 %. El almidón modificado por el tratamiento más efectivo para incrementar el contenido de FDT presenta: pH y acidez titulable aceptables, mayor tamaño medio del gránulo a 25 °C en comparación con el AN, elevada estabilidad térmica, bajo poder de hinchamiento, baja solubilidad y bajo índice de absorción de agua. Además, conduce a la obtención de pastas con menor claridad y mayor estabilidad durante el almacenamiento, mayor temperatura de empastamiento y gelatinización, baja viscosidad, ausencia de retrogradación y presenta un comportamiento reológico más similar a un sólido con estructura de gel más débil que el AN. Dicha combinación dual de los tratamientos HMT-EC T/T se presenta como una innovadora alternativa para reducir la digestibilidad *in vitro* del AN. El almidón modificado por este tratamiento podría ser utilizado con el objeto de incrementar la cantidad de FDT, en alimentos sometidos a tratamientos térmicos en los cuales no se desea un aumento o cambio en la viscosidad por el uso de altas temperaturas. No sería apropiado para el empleo como espesante de un alimento debido a su escaso hinchamiento y viscosidad. La utilización de los almidones obtenidos en alimentos tendería a satisfacer la demanda por los llamados alimentos funcionales. El desarrollo e implementación de esta metodología contribuiría positivamente con el sector industrial dedicado a la producción de almidones de mandioca en la provincia de Misiones, mediante la incorporación de mayor valor agregado y al mejoramiento de la competitividad en el mercado nacional e internacional.

**Palabras Clave:** Almidón de mandioca, almidón resistente, templado, tratamiento de calor y humedad, tratamiento de presión osmótica, enlaces cruzados, epíclorhidrina, trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio.

**IN VITRO DIGESTIBILITY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF  
CASSAVA STARCH MODIFIED BY THE COMBINATION OF  
HYDROTHERMIC AND CHEMICAL TREATMENTS**

**ABSTRACT**

Native cassava starch (NS) is the most exploited derivative from cassava roots cultivated in Misiones province, the main producer in Argentina. This and other starches from different botanical origins are used in food processing and various products. Native starches show a limited industry utility due to the negative effects (i. e. thermal decomposition, retrogradation, syneresis, among others) developed under certain process conditions. The adaptation of starches to specific functions is made by modifying their physical and chemical characteristics, expanding their range of industrial application and gives them greater added value. Digestibility of starches can be modified by physical or chemical treatments obtaining the so-called resistant starches (RS). RS are important for presenting beneficial health effects, for being part of the dietary fiber and for having good functional properties. The main objective of this work was to evaluate the effect on the formation of food-grade RS of the convenient combination of hydrothermal treatments such as annealing (ANN), heat moisture treatment (HMT) or osmotic pressure treatment (OPT) with chemicals treatments: cross-linking (CL) with epichlorohydrin (ECH) or sodium trimetaphosphate/sodium tripolyphosphate (STMP/STPP or T/T) by using native cassava starch from Misiones (Argentina). The secondary objective was to evaluate the physicochemical properties of modified starch with higher RS content in order to verify its potential use as an ingredient in food. Commercial native cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz) from Misiones was modified by hydrothermal (ANN, HMT and OPT) and chemical (CL ECH and CL T/T) treatments and its combinations. ANN was carried out maintaining a starch suspension (30 %, w/v) at 45 °C and 50 °C for 24 h and 48 h. HMT was carried out with 20 % of humidity at 90 °C and 105 °C for 60 min, 120 min, 5 h and 10 h. For the OPT modification, a starch suspension (50 %, w/v in sodium sulfate saturated solution) was maintained at 90 °C, 105 °C, 110 °C and 115 °C for 60 min and 120 min. CL ECH was carried out at pH 11.0 and 30 °C with ECH concentrations of 0.15 % and 0.30 % (w/v) for 4 h, 8 h, 12 h and 24 h. For the modification by CL T/T a starch suspension (33.96-41.04 %, w/w) was treated with a mixture of STMP/STPP (99:1 w/w) in the concentration range of 7.17-15 % (w/w) for 3 h at 45 °C and pH 11.0. The RS content was quantified with the total dietary fiber (TDF) Association of Official

Analytical Chemists (AOAC) method 985.29 on the starches modified by hydrothermal, chemical, combination of hydrothermal-chemical and chemical-hydrothermal treatments. The phosphorus content was determined with the colorimetric AOAC method 995.11 on the starches modified by CL T/T in order to verify that the phosphorus content did not exceed the maximum limit allowed by the Código Alimentario Argentino of 0.4 % for a modified food grade starch. The physicochemical properties evaluated in the modified starch with higher content of TDF were: pH, titrable acidity, distribution of the size of the granules using an optical microscope equipped with eyepiece reticle, swelling power, % of solubility, index of water absorption, clarity and stability of pasta, properties of pasta and degree of cross-linking using a Brabender viscoamylograph, thermal properties by differential scanning calorimetry and rheological dynamic behavior by means of a controlled tension rheometer with cone-plate geometry. It was observed that under the conditions studied, neither the hydrothermal treatments (ANN, HMT and OPT) nor the chemical treatment of CL EPI and its combinations led to a significant reduction in the *in vitro* digestibility of modified cassava starch, whereas the chemical treatment of CL T/T allowed to obtaining food grade modified starch with a high content of TDF in certain concentration combinations of reagent/starch. It was detected an increase in TDF with the concentration increase of reagent and starch. The combinations of the hydrothermal treatments ANN or OPT with the treatment of CL T/T, regardless of the order of application, did not favor TDF formation. The starches modified by these combinations showed greater *in vitro* digestibility than the starch modified by the chemical treatment. It was observed that certain combinations of hydrothermal treatment of HMT with the chemical treatment of CL T/T (hydrothermal-chemical sequence) caused a synergistic effect in the formation of TDF producing significant changes on the physicochemical properties. The most effective treatment to increase the TDF was the combination of the HMT treatment performed at 105 °C for 5 h with the CL T/T treatment using a reagent concentration of 15 % and a starch concentration of 41.04 %. This treatment allowed to obtaining food grade modified starch with 39.4 % of TFD. The modified starch by the most effective treatment to increase the content of FDT have: acceptable pH and titrable acidity, greater granule size average at 25 °C compared with NS, high thermal stability, low swelling power, low solubility and low water absorption rate. In addition, it leads to obtaining pastes with less clarity and greater stability during storage, higher pasting and gelatinization temperature, low viscosity, absence of retrogradation and it presents a

rheological behavior more similar to a solid with weaker gel structure than NS. This dual combination of treatments HMT-CL T/T it exposed as an innovative alternative to reduce the *in vitro* digestibility of native cassava starch. The starch modified by this treatment could be used in order to increase the amount of FDT in heat-treated foods where no increase or change in viscosity is desired by the use of high temperatures. It would not be appropriate to be used as a thickener of a food because of its low swelling and viscosity. The use of starches obtained in foodstuffs would tend to satisfy the demand for so-called functional foods. The development and implementation of this methodology would positively contribute to the industrial sector dedicated to cassava starches production from Misiones by means of the incorporation of greater added value and to the improvement of the competitiveness in the national and international markets.

**Key words:** Cassava starch, resistant starch, annealing, heat moisture treatment, osmotic pressure treatment, cross-linking, epichlorohydrin, sodium trimetaphosphate/sodium tripolyphosphate.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABLAS	XXI
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. OBJETIVOS	5
1.3. HIPÓTESIS	6
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2. REVISIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	7
2.1. <i>MANIHOT ESCULENTA</i> CRANTZ	7
2.2. ALMIDÓN	10
2.2.1. Gránulo de almidón	10
2.2.2. Amilosa	11
2.2.3. Amilopectina	13
2.2.4. Estructura del gránulo	15
2.3. USOS DEL ALMIDÓN	19
2.4. MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN	20
2.5. DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN	27
2.6. ALMIDÓN RESISTENTE	29
2.6.1. Almidón resistente como componente de la fibra dietaria	30
2.6.2. Efectos fisiológicos beneficiosos de los almidones resistentes	31
2.6.3. Obtención de almidón resistente	35
2.6.4. Métodos para la determinación de almidón resistente	44
2.6.4.1. Métodos <i>in vivo</i>	44
2.6.4.2. Métodos <i>in vitro</i>	44
2.6.5. Propiedades funcionales de los almidones resistentes	50
2.6.6. Usos de los almidones resistentes en alimentos	50
2.6.7. Ingesta recomendada de almidón resistente	52
2.6.8. Perspectiva del almidón resistente como alimento funcional	53

### **CAPÍTULO 3**

3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. MATERIALES	55
3.1.1. Materia prima	55
3.2. MÉTODOS	55
3.2.1. Almidón de mandioca modificado por tratamiento hidrotérmico ó químico	55
3.2.1.1. Modificación del almidón por el tratamiento de ANN	55
3.2.1.2. Modificación del almidón por el HMT	56
3.2.1.3. Modificación del almidón por el OPT	57
3.2.1.4. Modificación del almidón por el tratamiento de EC con EPI	57
3.2.1.5. Modificación del almidón por el tratamiento de EC con TMFS/TPFS	58
3.2.2. Determinación de AR como FDT en los almidones modificados por tratamiento hidrotérmico ó químico	59
3.2.3. Contenido de fósforo y grado de sustitución del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS	61
3.2.4. Almidón de mandioca modificado por la combinación dual de tratamientos hidrotérmico-químico o químico-hidrotérmico	62
3.2.4.1. Determinación de AR como FDT en los almidones modificados por la combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-químico o químico-hidrotérmico	65
3.2.5. Contenido de fósforo y GS del almidón de mandioca modificado por la combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-EC T/T o viceversa	65
3.2.6. Nivel de FDT en el almidón modificado por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T	65
3.2.7. Propiedades fisicoquímicas del almidón modificado con mayor contenido de FDT	65
3.2.7.1. Determinación de pH y acidez titulable	66
3.2.7.2. Distribución del tamaño de los gránulos de almidón	66

3.2.7.3. Poder de hinchamiento, solubilidad e índice de absorción de agua del almidón	67
3.2.7.4. Claridad y estabilidad de las pastas del almidón	68
3.2.7.5. Propiedades de las pastas del almidón y grado de enlaces cruzados	68
3.2.7.6. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido	70
3.2.7.7. Comportamiento reológico dinámico	70
3.2.7.8. Análisis estadístico	71

## **CAPÍTULO 4**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1. DETERMINACIÓN DE AR COMO FDT EN LOS ALMIDONES MODIFICADOS POR TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO Ó QUÍMICO	73
4.1.1. Almidón modificado por el tratamiento ANN	73
4.1.2. Almidón modificado por el HMT	74
4.1.3. Almidón modificado por el OPT	77
4.1.4. Almidón modificado por el tratamiento de EC con EPI	78
4.1.5. Almidón modificado por el tratamiento de EC con TMFS/TPFS	80
4.2. CONTENIDO DE FÓSFORO Y GS DEL ALMIDÓN DE MANDIOCA MODIFICADO POR EC CON TMFS/TPFS	85
4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AR COMO FDT EN LOS ALMIDONES MODIFICADOS POR LA COMBINACIÓN DUAL DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICO-QUÍMICO VICEVERSA	87
4.3.1. Almidón modificado por la combinación dual del tratamiento hidrotérmico: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico de EC con EPI y viceversa	87
4.3.2. Almidón modificado por la combinación dual del tratamiento hidrotérmico: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS y viceversa	90
4.4. CONTENIDO DE FÓSFORO Y GS DEL ALMIDÓN MODIFICADO POR LA COMBINACIÓN DUAL DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICO-EC CON TMFS/TPFS Y VICEVERSA	96
4.5. FDT EN EL ALMIDÓN MODIFICADO POR EL TRATAMIENTO	

DUAL 6HMT-13EC T/T	99
4.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN MODIFICADO CON MAYOR CONTENIDO DE FDT	100
4.6.1. Determinación del pH y acidez titulable	100
4.6.2. Distribución del tamaño de los gránulos de almidón	101
4.6.3. Poder de hinchamiento, solubilidad e índice de absorción de agua del almidón	107
4.6.4. Claridad y estabilidad de las pastas del almidón	115
4.6.5. Propiedades de las pastas del almidón y GEC	119
4.6.6. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido	124
4.6.7. Comportamiento reológico dinámico	129
<b>CAPÍTULO 5</b>	
5. CONCLUSIONES	135
5.1. CONCLUSIONES PARCIALES	135
5.2. CONCLUSIÓN GENERAL	137
<b>CAPÍTULO 6</b>	
6. PROPUESTA DE TRABAJOS FUTUROS	139
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
ANEXOS	177

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Planta de mandioca. (a) Partes de la planta, (b) hojas, (c) frutos, (d) flores masculinas y (e) raíces.	8
Figura 2.2	Producción mundial promedio de mandioca entre 1970-2013.	9
Figura 2.3	Principales países productores de mandioca en América Latina y el Caribe en 2013.	9
Figura 2.4	Provincias productoras de mandioca en la Argentina.	10
Figura 2.5	Modelo de red continua para el gel de amilosa.	13
Figura 2.6	Modelo de amilopectina.	14
Figura 2.7	Representación esquemática de las diferencias a nivel estructural de los modelos de “clúster” y de bloques de construcción de la amilopectina.	15
Figura 2.8	Estructura del gránulo de almidón. (a) Gránulo, (b) lamela y (c) cadenas de polímeros.	16
Figura 2.9	Representación en varias escalas de la estructura del gránulo de almidón. (a) Gránulos de almidón de maíz (30 $\mu\text{m}$ ), (b) anillos semicristalinos y amorfos de los anillos de crecimiento del almidón, (c) lamelas cristalinas y amorfas, (d) anillos de crecimiento y estructura interna de los bloques (20–50 nm), (e) doble hélices de la amilopectina (f) nanocristales: otra representación de la lamela cristalina obtenida por hidrólisis ácida, (g) estructura molecular de la amilopectina, (h) estructura molecular de la amilosa.	17
Figura 2.10	(a) Modelo molecular de doble hélice de la estructura cristalina del gránulo de almidón tipo A y B. Proyección en el plano de la estructura cristalina del gránulo de almidón: (b) tipo A y (c) tipo B.	18
Figura 2.11	Modelos de la estructura tipo A y B de la amilopectina.	19
Figura 2.12	Modelo de transición del patrón de cristalinidad del almidón tipo B al tipo A.	19
Figura 2.13	Principales productos de la reacción del almidón en condiciones alcalinas con (a) epiclohidrina, (b) trimetafosfato de sodio y (c) tripolifosfato de sodio.	22
Figura 2.14	Esquema de la transformación de la amilosa y de la amilopectina del almidón de papa tratado con la enzima amilomaltasa.	26

Figura 2.15	Representación esquemática de los hidratos de carbono que componen las fracciones de la fibra dietaria.	32
Figura 4.1	(a) Gráfica de efectos principales, (b) superficie de respuesta estimada, (c) contorno de la superficie de respuesta estimada del % de trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (TMFS/TPFS) y del % de almidón nativo en la formación de fibra dietaria total (FDT).	82
Figura 4.2	Valores de FDT del AN y de los almidones modificados por tratamiento hidrotérmico, por 5EC EPI y por sus combinaciones.	89
Figura 4.3	FDT de la secuencia de combinación de tratamientos H-Q y Q-H del almidón de mandioca modificado con el tratamiento químico de 5EC EPI.	89
Figura 4.4	Comparación de valores de FDT del AN y de los almidones de mandioca modificados por el tratamiento hidrotérmico 6HMT, los tratamientos 6, 8, 12 y 13EC T/T y sus combinaciones.	94
Figura 4.5	Comparación de valores de FDT del AN y de los almidones de mandioca modificados por los tratamientos (a) 4ANN, (b) 4HMT, (c) 4OPT, por los tratamientos 6, 8, 12, 13EC T/T y sus combinaciones.	95
Figura 4.6	Contenido de fósforo de los almidones de mandioca modificados por los tratamientos 8, 12 y 13EC T/T y por las combinaciones 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T.	97
Figura 4.7	Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca nativo a 25 °C.	101
Figura 4.8	Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 25 °C.	101
Figura 4.9	Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca nativo a 65 °C.	101
Figura 4.10	Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 65 °C.	101
Figura 4.11	Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 95 °C.	101
Figura 4.12	Fotomicrografías al microscopio óptico de los gránulos del almidón de mandioca nativo y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T	

	a 25 °C, 65 °C y 95 °C (aumento 500 X).	102
Figura 4.13	Distribución porcentual de los gránulos del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C en las categorías de muy pequeños, pequeños, medianos y grandes.	104
Figura 4.14	Incremento porcentual del tamaño medio de los gránulos del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T a 65 °C y 95 °C con respecto a los tamaños a 25 °C.	107
Figura 4.15	Poder de hinchamiento a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	108
Figura 4.16	Tubos con la pasta de almidón luego del centrifugado a 65 °C: (a) AN y (b) almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	109
Figura 4.17	Solubilidad a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	109
Figura 4.18	Índice de absorción de agua a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	110
Figura 4.19	Tubos con la pasta de almidón modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T luego del centrifugado: (a) 25 °C y (b) 85 °C.	110
Figura 4.20	Transmitancia (650 nm) de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T a 25 °C y a 4 °C medidas entre 0-192 h.	116
Figura 4.21	Tubos con: (a) pasta de almidón de AN y (b) pasta de almidón de mandioca modificado por combinación de 6HMT-13EC T/T luego del tratamiento térmico y enfriado a 25 °C.	117
Figura 4.22	Amilogramas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	120
Figura 4.23	Endotermas de suspensiones de AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T obtenidas por calorimetría diferencial de barrido.	125
Figura 4.24	Barridos de frecuencia de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T.	130

Figura 4.25 Valores de  $\tan(\delta) = G''/G'$  de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T. 131

## LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1	Composición química del almidón de mandioca nativo.	55
Tabla 3.2	Secuencia de tratamientos en la modificación del almidón de mandioca por combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.	63
Tabla 3.3	Experiencias y condiciones de reacción seleccionadas para la modificación del almidón de mandioca por la combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.	64
Tabla 3.4	Combinaciones de las experiencias en los tratamientos de modificación dual del almidón de mandioca por tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.	64
Tabla 4.1	Valores de FDT del almidón modificado por el tratamiento de ANN en las experiencias del diseño factorial completo $2^2$ .	73
Tabla 4.2	Valores de FDT del almidón modificado por el HMT en las experiencias del primer diseño factorial completo $2^2$ .	75
Tabla 4.3	Valores de FDT del almidón modificado por el HMT en las experiencias del segundo diseño factorial completo $2^2$ .	76
Tabla 4.4	Valores de FDT del almidón modificado por el OPT en las experiencias del primer diseño factorial completo $2^2$ .	77
Tabla 4.5	Valores de FDT del almidón modificado por el OPT en las experiencias del segundo diseño factorial completo $2^2$ .	78
Tabla 4.6	Valores de FDT del almidón modificado por EC con EPI en las experiencias del primer diseño factorial completo $2^2$ .	78
Tabla 4.7	Valores de FDT del almidón modificado por EC con EPI en las experiencias del segundo diseño factorial completo $2^2$ .	80
Tabla 4.8	Valores de FDT del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS, en las 11 experiencias correspondientes al diseño central compuesto.	81
Tabla 4.9	Valores de FDT del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS, en las experiencias 12 y 13EC T/T.	84
Tabla 4.10	Contenido de fósforo y grado de sustitución en el AN y en el almidón de mandioca modificado en las experiencias 6, 8, 12 y 13EC T/T.	85
Tabla 4.11	FDT en el AN, en el almidón de mandioca modificado por las	

	experiencias 4ANN, 4HMT, 6HMT, 4OPT y 5EC EPI y por la combinación de la experiencia 5EC EPI con las experiencias de los tratamientos hidrotérmicos y viceversa.	88
Tabla 4.12	FDT en el AN, en el almidón de mandioca modificado por 4ANN, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.	90
Tabla 4.13	FDT en el AN, en el almidón modificado por 4HMT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.	91
Tabla 4.14	FDT en el AN, en el almidón modificado por 6HMT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.	91
Tabla 4.15	FDT en el AN, en el almidón modificado por 4OPT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.	92
Tabla 4.16	Contenido de fósforo y grado de sustitución en el almidón de mandioca modificado por los tratamientos combinados 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T.	96
Tabla 4.17	Valores del pH y acidez titulable del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	100
Tabla 4.18	Tamaños, distribución porcentual, medias, medianas, rango y volumen promedio de los gránulos del almidón de mandioca nativo y del almidón de mandioca modificado por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C.	103
Tabla 4.19	Poder de hinchamiento a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	108
Tabla 4.20	Solubilidad a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	109
Tabla 4.21	Índice de absorción de agua a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	110
Tabla 4.22	Valores de transmitancia (% T) (650 nm) de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación	

	6HMT-13EC T/T a 25 °C y a 4 °C medidas entre 0-192 h.	116
Tabla 4.23	Propiedades de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	120
Tabla 4.24	Temperaturas y entalpías de gelatinización del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	125
Tabla 4.25	Parámetros reológicos del modelo de Ley de Potencia para el AN y el almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.	132

---

# CAPITULO 1

---

## 1.1. INTRODUCCIÓN

En la Argentina, la provincia de Misiones es la principal productora de raíces de mandioca con mejores rendimientos por hectáreas. De toda la producción alrededor de un 25 % se destina a la industria. El derivado más explotado de las raíces de mandioca en la Argentina es el almidón nativo (AN) (Feltan *et al.*, 2016).

Los almidones nativos de diferentes orígenes botánicos como cereales, leguminosas, tubérculos, raíces y frutos son empleados en una amplia variedad de productos tanto en la industria de alimentos como en otras industrias. En los alimentos los almidones pueden influir en la textura, la viscosidad, la formación de gel, la adhesión, la retención de humedad, la formación de película y la homogeneidad. Los usos no alimenticios del almidón incluyen las industrias: farmacéutica, textil, de combustibles a base de alcohol y de adhesivos. Las nuevas aplicaciones del almidón abarcan alimentos bajas calorías, materiales de empaque biodegradables, películas delgadas y materiales termoplásticos (Biliaderis, 1998). El empleo de los almidones nativos, en la industria, es restringido debido a que presentan un rango limitado de propiedades físicas y químicas apropiadas para ciertos tipos de procesos tecnológicos. Además, diversas condiciones y combinaciones de temperatura, pH y presión pueden reducir el uso del almidón nativo al promover baja resistencia a tensiones de corte, descomposición térmica, alto grado de retrogradación y sinéresis (Bello-Pérez *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2004; Amani *et al.*, 2005). Las propiedades funcionales de los almidones nativos pueden mejorarse mediante modificaciones. Con ellas se obtienen almidones con atributos específicos que pueden resistir condiciones extremas de procesamiento. Las modificaciones de los almidones amplían sus aplicaciones industriales y otorgan mayor valor agregado (López, 2010).

Los métodos utilizados para las modificaciones de los almidones se clasifican en cuatro categorías: químicos, físicos, enzimáticos y genéticos (BeMiller, 1997; Jobling, 2004; Tharanathan, 2005). Los métodos químicos son los más empleados. Entre ellos se encuentran los métodos de: 1) degradación a través de hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática o reacciones de oxidación y 2) derivatización por esterificación, eterificación, enlaces cruzados (EC) o combinaciones de los mismos (Wurzburg, 1986a; Singh *et al.*, 2007). Las propiedades químicas y funcionales logradas dependen del origen botánico del almidón, de las condiciones de reacción, del tipo de sustituyente, del grado de sustitución y de la distribución de los sustituyentes en la molécula de almidón (Kavitha & BeMiller, 1998; Richardson *et al.*, 2000; Hirsch & Kokini, 2002; Wang &

Wang, 2002). Actualmente existe un creciente interés en el empleo de los métodos físicos para la obtención de almidones modificados de grado alimenticio. Estos almidones no solo son considerados ingredientes naturales y seguros sino que además su agregado en los alimentos no se encuentra limitado por la legislación (BeMiller, 1997; Kaur *et al.*, 2012). Los tratamientos hidrotérmicos de: templado “*annealing*” (ANN) y calor y humedad “*heat moisture treatment*” (HMT) son comúnmente utilizados para las modificaciones físicas de los almidones. Mediante estos, se alteran las propiedades fisicoquímicas del almidón sin destruir la estructura granular (Jayakody & Hoover, 2008). En los últimos años, se han informado nuevos métodos de modificaciones físicas, tales como congelamiento profundo “*deep-freezing*” (Szymonska, *et al.*, 2000), múltiple congelamiento profundo y descongelamiento (Szymonska, *et al.*, 2003), sobrecalentamiento (Steeneken, 2009) y presión osmótica “*osmotic pressure treatment*” (OPT) (Pukkahuta *et al.*, 2007), entre otros. Con el OPT se obtiene una modificación del almidón similar a la lograda con el HMT. En el OPT el incremento de la presión osmótica inhibe la gelatinización del almidón a temperaturas altas y permite una mejor distribución del calor, comparado con el HMT (Pukkahuta *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista nutricional, los almidones se clasifican en tres categorías en función de su velocidad de digestión enzimática en el intestino delgado: almidones de digestión rápida (ADR), almidones de digestión lenta (ADL) y almidones resistentes (AR) (Englyst *et al.*, 1992). Los AR se subdividen en cinco grupos de acuerdo a su grado de resistencia: AR tipo 1, 2, 3, 4 y 5. Dentro de ellos el AR tipo 4 es el que se obtiene por modificación química (Englyst *et al.*, 1992; Woo & Seib, 2002; Homayouni *et al.*, 2014; Dupuis *et al.*, 2014; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Lockyer & Nugent, 2017). La digestibilidad de los almidones varía en función del origen botánico, del procesamiento, del tamaño del gránulo, de la relación amilosa-amilopectina, del tipo de estructura cristalina y de la presencia de complejos amilosa-lípidos (Ring *et al.*, 1988; Holm & Bjorck, 1992). Los AR se encuentran presentes naturalmente en los alimentos en diferentes proporciones dependiendo de la fuente. Estos han adquirido gran importancia por sus efectos beneficiosos para la salud. Los AR, están asociados con funciones de: prevención de cáncer de colon, agente hipoglucemiante, sustrato para el crecimiento de microorganismos probióticos, reducción de la formación de cálculos biliares, reducción del colesterol, inhibición de la acumulación de grasa y acrecentamiento de la absorción de minerales (Sajilata *et al.*, 2006). Los AR contribuirían positivamente a problemas de salud tales como obesidad, diabetes tipo II e

hiperlipemias. Los ADL ayudarían a estabilizar el metabolismo de la glucosa, el funcionamiento mental y la saciedad (Lehmann & Robin, 2007).

En la actualidad existe una creciente demanda e interés por los llamados alimentos funcionales, los cuales además de cumplir con sus funciones nutricionales básicas proveen beneficios fisiológicos y/o reducen el riesgo de enfermedades crónicas. Con tales propósitos, los AR son utilizados como ingredientes en alimentos con los cuales se consigue no solo funcionalidad nutricional sino también funcionalidad física y estabilidad durante el procesamiento (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010). Los productos logrados tendrían mejores propiedades fisicoquímicas que las obtenidas empleando fibras convencionales debido a que los AR afectan en menor grado las propiedades sensoriales del alimento terminado, dándole mejor apariencia, textura y suavidad al paladar (Charalampopoulos *et al.*, 2002). Las condiciones de procesamiento y de almacenamiento pueden afectar a los AR presentes en los alimentos. Esto ha despertado el interés en la tecnología de alimentos, ya que técnicamente mediante la aplicación de tratamientos adecuados es posible aumentar el contenido de AR (Sajilata *et al.*, 2006).

Los AR también se pueden preparar usando tratamientos físicos, químicos, enzimáticos o combinaciones de los anteriores. Estos AR, a diferencia de los que se hallan en las fuentes naturales, no son afectados por el procesamiento o el almacenamiento (Sajilata *et al.*, 2006). Los niveles de AR logrados dependen del método empleado, de la naturaleza de los reactivos, de las condiciones de reacción (pH, temperatura, tiempo, etc.) y del origen botánico (Woo & Seib, 2002). Entre los tratamientos térmicos utilizados, se hallan: cocción por encima de la temperatura de gelatinización y secado simultáneo y autoclave-enfriamiento (Dupuis *et al.*, 2014; Ashwar *et al.*, 2016a; Park *et al.*, 2009). Los tratamientos hidrotérmicos resultan muy prometedores debido a que no implican modificaciones químicas, considerándose a sus productos como más saludables. Actualmente han recibido gran importancia debido a sus posibles aplicaciones en la industria de alimentos ya sea solo o combinados con otros tipos de modificaciones. Las modificaciones químicas de esterificación, eterificación y EC pueden conducir a la formación de AR. Se ha demostrado que estos AR tipo 4 son los más resistentes cuando son tratados *in vitro* con enzimas apropiadas (Mun & Shin, 2006). Dentro de los agentes formadores de EC, utilizados para obtener AR de grado alimenticio, se encuentran: trimetafosfato de sodio (TMFS), tripolifosfato de sodio (TPFS), oxiclorigeno de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ), epiclorhidrina (EPI), entre otros (Woo & Seib, 2002). La fosforilación con TMFS o mezcla de TMFS/TPFS es uno de los

métodos comúnmente empleados para la obtención de almidones de enlace cruzados por su baja toxicidad y su eficiencia (Gui-Jie *et al.*, 2006).

Aunque muchos estudios se han avocados a la investigación de la formación de AR a partir de diversos orígenes botánicos empleando combinaciones de tratamientos químicos (Singh, *et al.*, 2007), escasos han utilizado combinaciones de tratamientos físicos (Chung *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010) o físicos y químicos a la vez (Brumovsky & Thompson, 2001; Kim *et al.*, 2010). Estos estudios mostraron que el empleo de la combinación de tratamientos físicos, ANN y el HMT, no produjeron incrementos en el contenido de AR comparados con los obtenidos por los tratamientos individuales en el almidón de maíz (Chung *et al.*, 2009) o cuando se empleó almidón de arveja, lenteja o poroto en estado granular; no obstante, observaron un incremento de AR en las últimas muestras gelatinizadas (Chung *et al.*, 2010). Otros investigadores en cambio obtuvieron aumento en los niveles de AR cuando aplicaron combinaciones de tratamientos hidrotérmicos (ANN, HMT o autoclave-enfriamiento) con químicos (hidrólisis ácida, formación de EC con TMFS/TPFS) en almidón de maíz de alta amilosa, almidón de maíz normal y arroz (Brumovsky & Thompson, 2001; Kim *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011). Brumovsky & Thompson (2001) mediante la aplicación de hidrólisis ácida en combinación con tratamientos hidrotérmicos obtuvieron AR estables a la ebullición. La aplicación combinada de EC con TMFS y el OPT mostró un incremento en la formación de EC en el almidón de mandioca, no obstante no se evaluó la digestibilidad de los mismos (Varavinit, *et al.*, 2007). Por lo tanto, resulta muy atrayente estudiar el efecto de la combinación de tratamientos hidrotérmicos con otras modificaciones físicas o químicas (da Rosa Zavareze *et al.*, 2011). Al presente, no se han reportado estudios empleando combinaciones de ANN, HMT, OPT y EC con EPI o EC con mezcla de TMFS/TPFS para la obtención de AR a partir del almidón de mandioca.

Por lo expuesto, con este trabajo, a través del empleo combinado de tratamientos hidrotérmicos y químicos, se propuso obtener AR de grado alimenticio y asociar un potencial uso como ingrediente alimenticio mediante la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas. El uso combinado de tratamientos hidrotérmicos y químicos podrían tener un efecto sinérgico en la formación de AR. Se aspiró a que el producto resultante de este estudio contribuyera a satisfacer la demanda de los consumidores por los llamados alimentos funcionales. La incorporación del AR a los alimentos permitiría la elaboración de alimentos con determinadas características fisicoquímicas y aportarían

fibra dietaria. También tendría un impacto positivo en la industria de los alimentos ya que permitiría la elaboración de productos con mejores propiedades organolépticas que las obtenidas mediante el empleo de fibras tradicionales. Considerando que los AR afectan de manera positiva a las características sensoriales del alimento terminado otorgándoles mejor apariencia, textura y suavidad al paladar que las conferidas por las fibras convencionales, el uso del almidón modificado en un alimento favorecería la aceptación del producto.

El aprovechamiento integral del almidón de mandioca en la provincia de Misiones es muy reducido. La mayoría de las industrias producen el almidón nativo como principal derivado de las raíces de mandioca, no encontrándose, consecuentemente éste, adaptado para cumplir con las especificaciones para sus posibles usos industriales: papel, textil, chacinados, industria farmacéutica, plásticos, etc. Con este estudio se pretendió contribuir positivamente con el sector industrial emprendedor dedicado a la producción de almidón de mandioca de la provincia de Misiones, ya que el desarrollo e implementación de la metodología que resulte más apropiada aportaría mayor valor agregado al AN y permitiría una mejora de la competitividad en los mercados nacional e internacional, representando por tanto una alternativa atractiva y promisoriosa para el sector industrial.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del empleo combinado de tratamientos hidrotérmicos: templado “*annealing*” (ANN), calor y humedad “*heat moisture treatment*” (HMT) o presión osmótica “*osmotic pressure treatment*” (OPT) con tratamientos químicos: enlaces cruzados (EC) con epíclorhidrina (EPI) o con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (TMFS/TPFS) en la formación de almidón resistente (AR), de grado alimenticio, a partir del almidón de mandioca nativo (AN) producido en la provincia de Misiones, Argentina y determinar las propiedades fisicoquímicas del almidón modificado con mayor contenido de AR.

### **Objetivos específicos**

- Obtener almidones modificados, a partir del AN producido en la provincia de Misiones, Argentina, mediante la aplicación de los tratamientos de: ANN, HMT, OPT, EC con EPI y EC con TMFS/TPFS.

- Obtener almidones de mandioca modificados por la combinación dual del tratamiento hidrotérmico: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico de EC con EPI o de EC con TMFS/TPFS.
- Determinar el contenido de AR como fibra dietaria total en los almidones modificados.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas del almidón modificado con mayor contenido de AR.

### **1.3. HIPÓTESIS**

La aplicación de una combinación apropiada de los tratamientos hidrotérmicos: ANN, HMT u OPT con los tratamientos químicos de EC con EPI o EC con TMFS/TPFS conduce a la formación de AR, de grado alimenticio a partir del AN producido en la provincia de Misiones, con propiedades fisicoquímicas adecuadas para su uso en productos alimenticios.

---

# CAPITULO 2

---

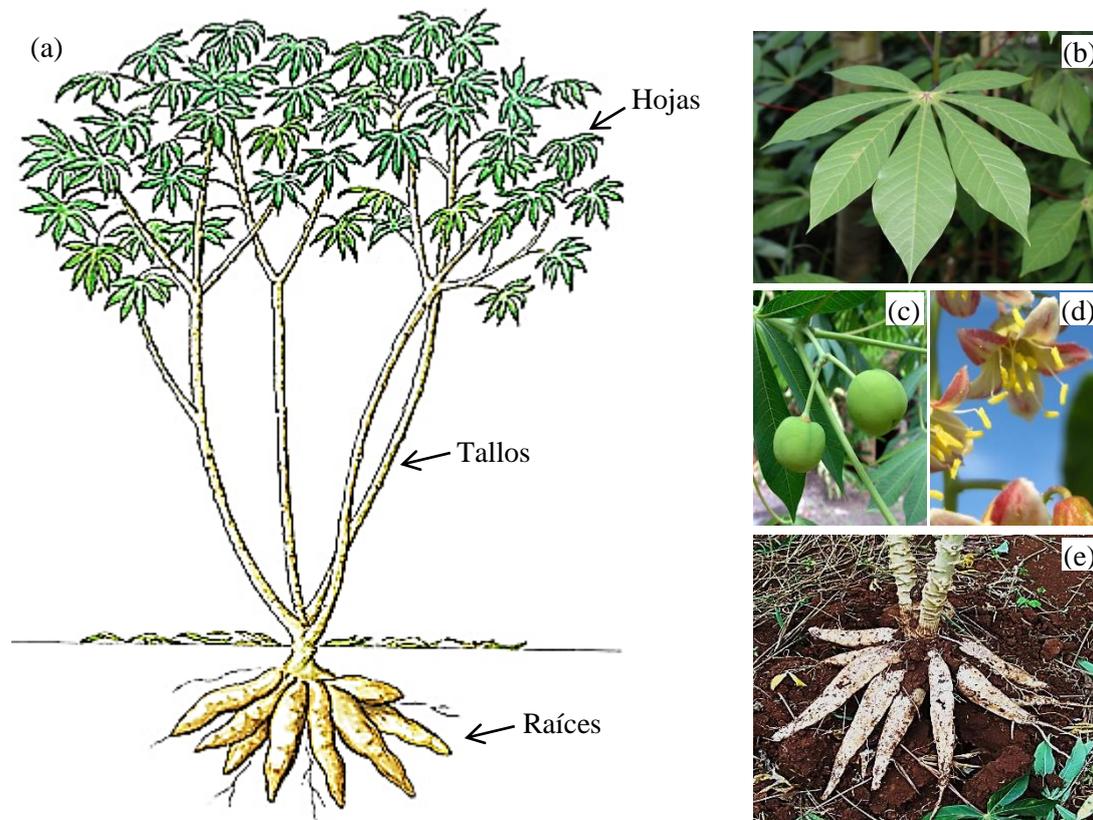
## 2. REVISIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

### 2.1. *MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ

*Manihot esculenta* Crantz es una especie vegetal conocida bajo una gran diversidad de nombres: mandioca, yuca, aipi, cassava, guacamote, manioc, manioca, macacheira, mhogo, entre otros (Aristizábal y Sánchez, 2007; Ceballos y De la Cruz, 2002). La mandioca pertenece a la clase Dicotyledoneae, a la familia Euphorbiaceae y al género *Manihot*. El género *Manihot* presenta más de 100 especies de las cuales *Manihot esculenta* es cultivada siendo la más importante desde el punto de vista económico (Suárez Guerra & Mederos Vega, 2011; Aguilar Brenes *et al.*, 2017). Inicialmente la mandioca fue clasificada en dos especies comestibles en función del contenido alto o bajo de ácido cianhídrico, *M. ultissima* Phol y *M. palmata* (aipí), también llamadas mandioca amarga o dulce respectivamente (Ceballos y De la Cruz, 2002). Actualmente se han clasificado como pertenecientes a la misma especie, *M. esculenta* (Breuninger *et al.*, 2009). Además se propone la división de la especie *M. esculenta* en tres subespecies: *M. esculenta*, *M. flavellifolia* y *M. peruviana*. Las últimas serían formas silvestres de la especie *M. esculenta* subespecie *esculenta* (Allem, 1994).

La mandioca es un arbusto perenne, leñoso de tamaño variable (Figura 2.1). La misma es monoica, de ramificación simpodial, con un tamaño promedio de tres metros de altura y presenta tallos semi-leñosos de forma cilíndrica con diámetro de 2-6 cm y ramas en su parte media y superior. Las hojas son caducas, simples compuestas por 4-10 lóbulos de color púrpura, verde oscuro, hasta verde claro. El pecíolo de la hoja puede tener una longitud entre 9 y 20 cm, es delgado y con una pigmentación variable de verde a morado. En la misma planta se hallan las flores femeninas y masculinas. La inflorescencia puede ser una panícula, un racimo o una combinación de los dos. Las flores tienen cinco sépalos y 10 estambres. El fruto es una cápsula de 1-2 cm de diámetro, aristado y prominente. La semilla es de forma ovoide a elipsoidal de 1 cm de largo por 6 mm de ancho y 4 mm de espesor. Las raíces son inicialmente fibrosas luego se agrandan, debido a la acumulación de almidón, y se denominan tuberosas. Pueden medir hasta 1 m y tener formas cilíndricas, cónicas, fusiformes o irregulares (Ceballos y De la Cruz, 2002; Aguilar Brenes *et al.*, 2017). El contenido de carbohidratos en las raíces es de 30-35 % de los cuales 80 % es almidón y 20 % son azúcares (sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa). Esta es la parte de la planta más utilizada principalmente para la alimentación humana y animal y para la industria de extracción de almidón entre

otras (Aristizábal y Calle, 2015). También en algunos países se consumen las hojas frescas o deshidratadas (Feltan *et al.*, 2016).



**Figura 2.1.** Planta de mandioca. (a) Partes de la planta, (b) hojas, (c) frutos, (d) flores masculinas y (e) raíces. Fuente: FAO (2013), <http://intainforma.inta.gov.ar><sup>1</sup>, <https://biologia.laguia2000.com/botanica/yuca><sup>2</sup>

Es una planta originaria de América que actualmente se cultiva en regiones tropicales del mundo, cuya producción se ha incrementado en las últimas décadas (Aristizábal y Calle, 2015; Feltan *et al.*, 2016) (Figura 2.2). Aunque la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2017) previó una ligera contracción de la producción mundial hacia el 2017.

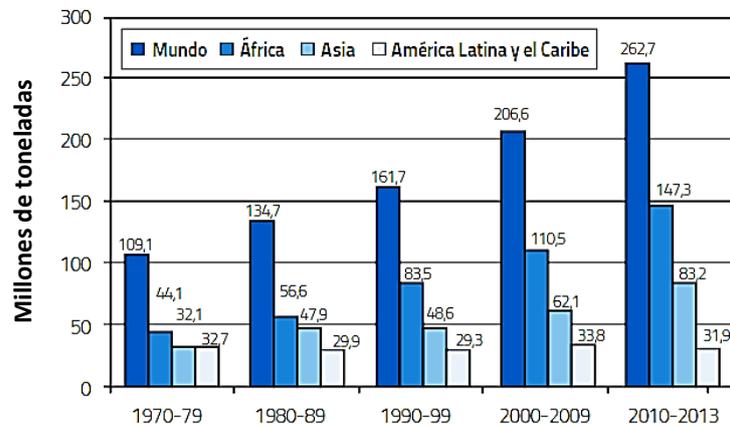
El 50 % de la producción mundial de mandioca se concentra en cinco países: Nigeria, Tailandia, Indonesia, Brasil y República del Congo (Aristizábal y Calle, 2015). En América del Sur los países con mayor producción son Brasil y Paraguay (Figura 2.3). En la Argentina la provincia de Misiones históricamente es la principal productora

<sup>1</sup> <http://intainforma.inta.gov.ar> (Fecha de consulta 30/04/2019)

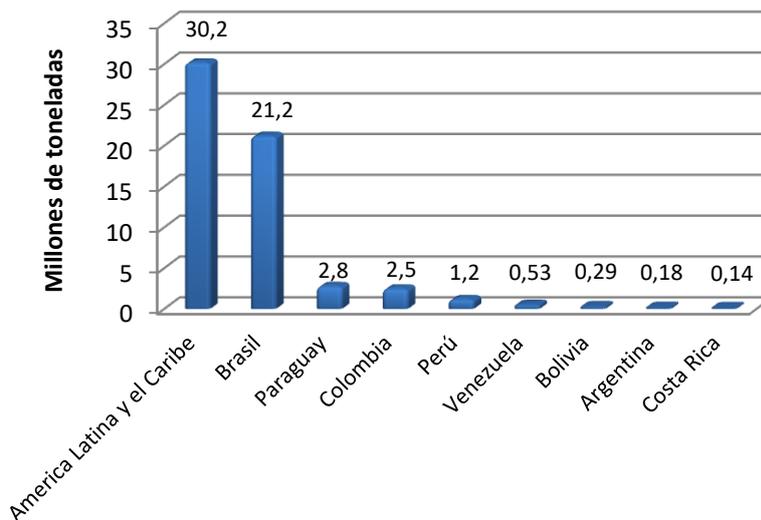
<sup>2</sup> <https://biologia.laguia2000.com/botanica/yuca> (Fecha de consulta 30/04/2019)

de mandioca, destinando aproximadamente 8.000 a 10.000 hectáreas al cultivo, seguida por las provincias de Corrientes, Formosa y Chaco (Zanini *et al.*, 2018) (Figura 2.4).

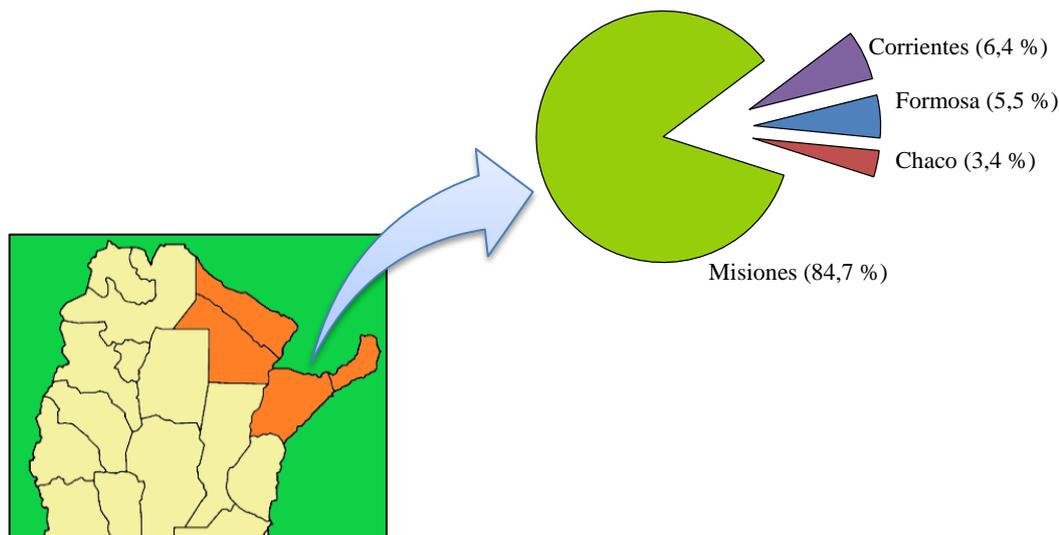
De toda la producción de la provincia de Misiones, aproximadamente el 50 % se destina al autoconsumo, el 25 % a la comercialización en fresco y el 25 % restante a la industria (Feltan *et al.*, 2016). El almidón es el producto derivado de la mandioca más explotado en la Argentina y en el mundo. Actualmente la mandioca se sitúa en segundo lugar como fuente principal de producción mundial de almidón, después del maíz y seguido de la papa y del trigo (Aristizábal y Calle, 2015).



**Figura 2.2.** Producción mundial promedio de mandioca entre 1970-2013. Fuente: Aristizábal y Calle (2015).



**Figura 2.3.** Principales países productores de mandioca en América Latina y el Caribe en 2013. Fuente: Aristizábal y Calle (2015).



**Figura 2.4.** Provincias productoras de mandioca en la Argentina (porcentaje del total de hectáreas cultivadas). Fuente: Zanini *et al.* (2018).

## 2.2. ALMIDÓN

### 2.2.1. Gránulo de almidón

El almidón es un polisacárido de reserva energética que puede ser encontrado en diversos tejidos, dependiendo de la planta, tales como hojas, tallos, frutos, raíces, tubérculos y semillas. Éste se localiza en los amiloplastos de las células vegetales para el almacenamiento por largo tiempo o en cloroplastos para el almacenamiento temporal. Las moléculas de almidón se disponen como gránulos densamente empaquetados con una estructura semicristalina. Los gránulos son insolubles y se hidratan levemente en agua fría (Pérez & Bertoft, 2010; Jane, 2009). En función de la fuente botánica, los gránulos, presentan diferentes formas, tamaños, composición y estructura molecular (Sivak & Preiss, 1998). Este puede ser esférico (trigo, maíz, papa), ovoide (papa), angular (maíz o arroz), filamentoso (maíz de alta amilosa), redondo con extremos truncados (mandioca), elongado, lenticular, etc. (Wurzburg, 1986b; Jane, 2009). En la superficie pueden tener poros o canales (Fannon *et al.*, 1992). Los gránulos presentan tamaños de menos de 1  $\mu\text{m}$  a más de 100  $\mu\text{m}$  los cuales pueden variar durante la maduración del tejido de reserva (Teerawanichpan *et al.*, 2008; Asaoka *et al.*, 1993) o por las condiciones ambientales (Svihus *et al.*, 2005). Se pueden presentar distribuciones de tamaños de gránulos de tipo unimodal, bimodal o trimodal. La forma y el tamaño del gránulo de almidón pueden influir en las propiedades funcionales de los almidones (Svihus *et al.*, 2005). El gránulo de almidón se encuentra formado por dos tipos de homopolisacáridos de glucopiranososa con diferentes estructuras y propiedades:

la amilosa y la amilopectina (Pérez & Bertoft, 2010). Además presenta moléculas intermedias entre amilosa y amilopectina y trazas de lípidos como fosfolípidos o ácidos grasos libres (1,5 % p/p), proteínas/enzimas (0,1-0,7 % p/p) y monoésteres de fosfatos (Jane, 2009). De acuerdo a diversos investigadores el almidón de mandioca presenta un contenido de proteínas: 0,06-0,75 %, lípidos: 0,01–1,2 %, fósforo: 0,0029–0,095 % y amilosa: 0-30,3 % (Zhu, 2015). Los gránulos de los almidones difieren en el contenido, la estructura y la organización de las moléculas de amilosa y amilopectina, en la estructura de las ramificaciones de la amilopectina y en el grado de cristalinidad (Lindeboom *et al.*, 2004). La relación entre amilosa/amilopectina varía con el origen botánico. Los llamados almidones céreos tienen un contenido de amilosa menor al 15 %, los almidones normales entre 20-30 % y los almidones de alta amilosa más de 40 % (Tester *et al.* 2004). La biosíntesis del gránulo de almidón comienza en el hilum. El gránulo aumenta su tamaño por aposición en el extremo no reductor a medida que las moléculas crecen en dirección radial (French, 1984).

### **2.2.2. Amilosa**

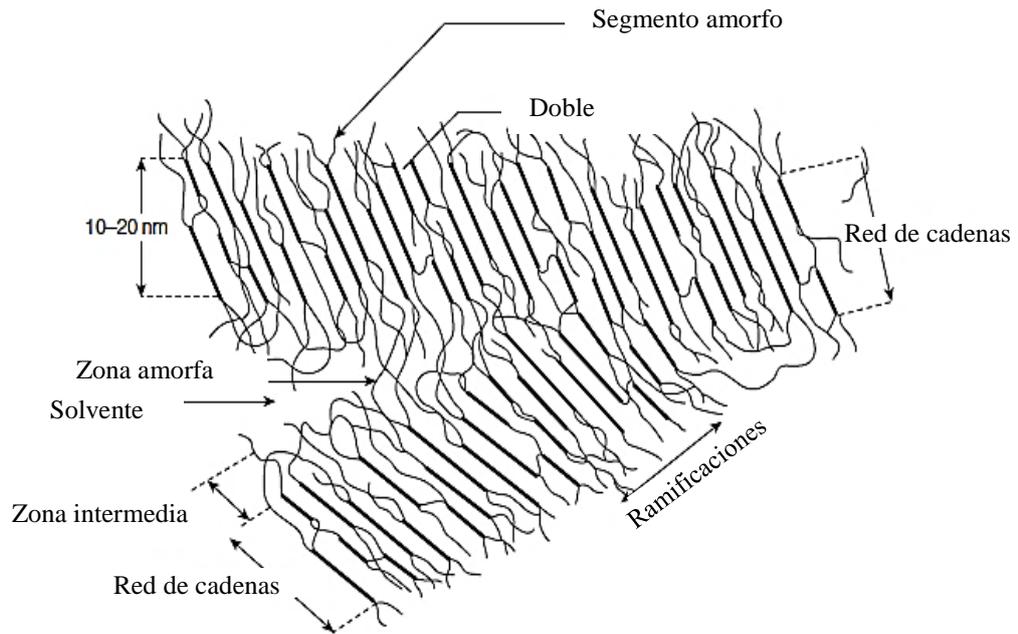
La amilosa es un polisacárido largo principalmente lineal formado por alrededor de 324 a 4920 unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 (99 %). Su estructura y tamaño varía en función del origen botánico. Además, se pueden presentar escasas ramificaciones de 9-20 conectadas por enlaces  $\alpha$ -1,6, cada 170-500 unidades de glucopiranosas. Las cadenas contienen aproximadamente 200 a 700 unidades glucosídicas (Tester *et al.*, 2004). Por lo general los almidones contienen mezclas de moléculas de amilosas lineales y ramificadas (Pérez & Bertoft, 2010). En el almidón de mandioca el grado de polimerización (GP) se encuentra en el rango de 2050-4390 con un número de ramificaciones en promedio de 4,7–7,5 (Charoenkul *et al.*, 2006). La estructura de la amilosa afecta las propiedades funcionales y usos del almidón (Ahuja *et al.*, 2013).

Se han propuesto tres hipótesis en cuanto a la localización de la amilosa en el gránulo de almidón. Dentro de ellas el modelo aceptado considera que las moléculas de amilosa se hallan distribuidas como cadenas individuales dispuestas al azar y orientadas radialmente entre las cadenas de la amilopectina. Las mismas se hallan en mayor concentración en la periferia del gránulo donde presentan cadenas más cortas que las observadas en la parte central del gránulo (Pérez *et al.*, 2009). Las cadenas más largas

de la amilosa participarían en la formación de doble hélices con la amilopectina (Imberty *et al.*, 1991).

En solución, la molécula de amilosa adopta una forma de espiral al azar inestable (Hayashi *et al.*, 1981) con 6 unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas por cada giro (Banks & Greenwood, 1975). Ésta forma complejos de inclusión de cadena simple con un ligando adecuado (Takeo *et al.*, 1973) o forma doble hélices por asociación entre sus cadenas (Jane, 2009). En los complejos de inclusión, también llamados amilosa tipo V, las cadenas lineales ubican sus residuos hidrofóbicos hacia el interior de la hélice la que se halla enrollada hacia la izquierda permitiéndole interactuar con las porciones no polares del ligando (Putseys *et al.*, 2010). El número de unidades de glucosa de las hélices de amilosa en los complejos de inclusión varía de acuerdo al compuesto. Algunos ligandos son yodo, alcohol, ácidos grasos libres, fosfolípidos y monoglicéridos (Pérez & Bertoft, 2010). Esto indica que parte de los lípidos presentes en los gránulos de almidón nativo se hallan formando complejos con las moléculas de amilosa (Kiseleva *et al.*, 2003). En ausencia del agente de inclusión la hélice de amilosa adopta la forma de espiral al azar o adquiere una estructura de doble hélice (Jane & Robyt, 1984). Para la formación de las dobles hélices se requiere un GP mínimo de 10. Las cadenas más cortas pueden co-cristalizar con cadenas largas de polímeros (Pfannemüller, 1987). Dependiendo del GP, las moléculas de amilosa pueden precipitar ( $GP < 110$ ) o formar geles ( $> 1100$ ) (Gidley & Bulpin, 1989). La estructura del precipitado de amilosa es de tipo cristalino de doble hélice. En la estructura de gel la amilosa forma una red continua de doble hélices unidas por segmentos de cadenas simples (Biliaderis, 1992; Leloup *et al.*, 1992) (Figura 2.5).

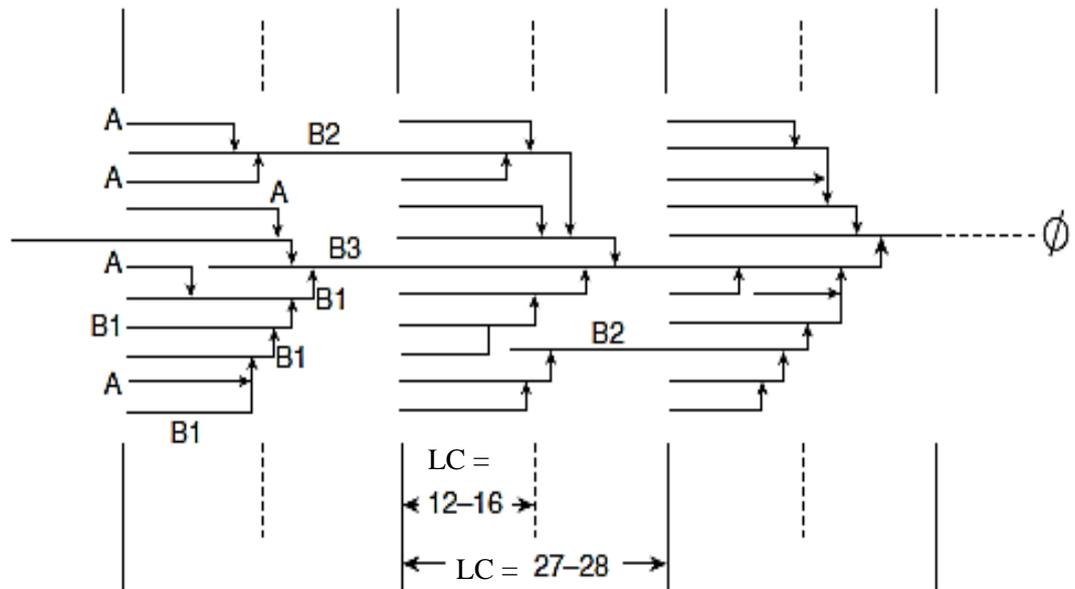
La estructura en dobles hélices de la amilosa retrogradada presenta patrones de difracción de rayos-X tipo A, B o C dispuestas en forma paralelas con giro hacia la izquierda con un ordenamiento hexagonal o pseudo-hexagonal (Pérez & Bertoft, 2010).



**Figura 2.5.** Modelo de red continua para el gel de amilosa. Fuente: Adaptado de Leloup *et al.* (1992).

### 2.2.3. Amilopectina

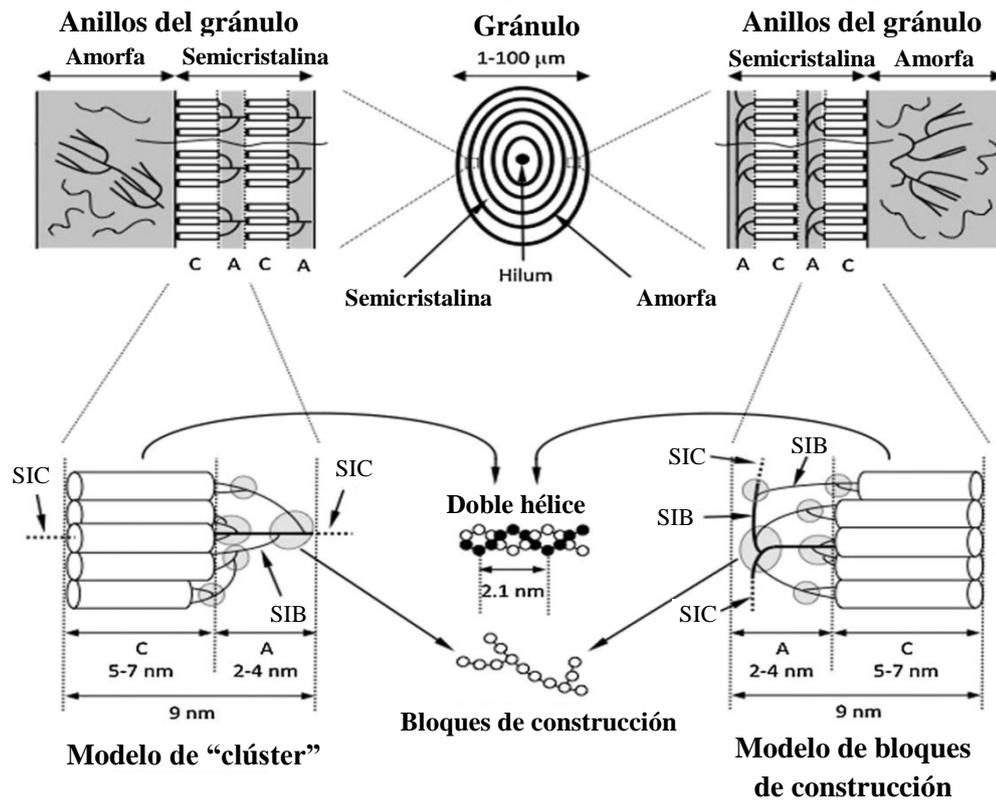
La amilopectina es un polisacárido altamente ramificado. Entre un 4-5 % de los enlaces glucosídicos son puntos de ramificación (Manner, 1989). Las cadenas de amilopectina difieren en tamaño presentando una distribución polimodal (Hizukuri, 1986). La longitud depende del origen del almidón, del estado de maduración y de la localización en el gránulo. En promedio, la longitud de las cadenas de amilopectinas es de 17-26 residuos de glucosa. Las ramificaciones de la amilopectina se agrupan en “clústers”. Se han propuesto diversos modelos de “clústers” de la estructura de la amilopectina como los presentados por French (1972), Robin *et al.* (1974), Nikuni (1978), Manners & Matheson (1981), Hizukuri (1986), entre otros. Bertoft *et al.* (1999) introdujeron el concepto de bloques de construcción, los cuales son considerados las unidades básicas del modelo de columna vertebral, que actualmente se encuentra en discusión (Tang *et al.*, 2006; Bertoft 2013; Vamadevan & Bertoft, 2015). El modelo de “clúster” propuesto por Hizukuri (1986), para la molécula de amilopectina, se muestra en la Figura 2.6.



**Figura 2.6.** Modelo de amilopectina. Fuente: Hizukuri (1986).

**Referencias:** A y B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub> = cadenas, ∅ = cadena C que lleva el extremo reductor, LC = longitud de las cadenas.

Las cadenas de la amilopectina pueden ser clasificadas en base a su longitud y a su posición en el gránulo. Las cadenas A son cadenas no ramificadas y se extienden a lo largo de un "clúster". Las cadenas A y B se unen por su extremo reductor a otras cadenas B o a la cadena C. Las cadenas B se encuentran ramificadas por cadenas A o por otras B. Estas últimas reciben el nombre de B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub> de acuerdo al número de "clúster" que abarcan 1-4 respectivamente. El extremo reductor de la molécula de amilopectina se encuentra en la única cadena C presente en la molécula orientada hacia el hilum del gránulo (Jane, 2009). Las cadenas A y B<sub>1</sub> se encuentran en la parte más externa de la molécula y forman doble hélices que pueden asociarse para formar zonas cristalinas (Figura 2.6). Los tamaños promedio de las cadenas son 12-16 (A), 20-24 (B<sub>1</sub>), 42-48 (B<sub>2</sub>), 69-75 (B<sub>3</sub>) y 101-119 (B<sub>4</sub>) unidades glucosídicas. En general, los almidones con cristalinidad tipo A presentan cadenas de menor tamaño en comparación a los mismos del tipo B (Tester *et al.*, 2004). Los "clúster" completos presentan un tamaño aproximado de 27-28 residuos de glucosa (Hizukuri, 1986). La relación entre cadenas largas y cortas influye en la forma de la amilopectina lo cual afecta el empaquetamiento en el gránulo (Jane, 2007). En la Figura 2.7 se muestra esquemáticamente las diferencias entre el modelo de "clúster" y el de bloques de construcción.



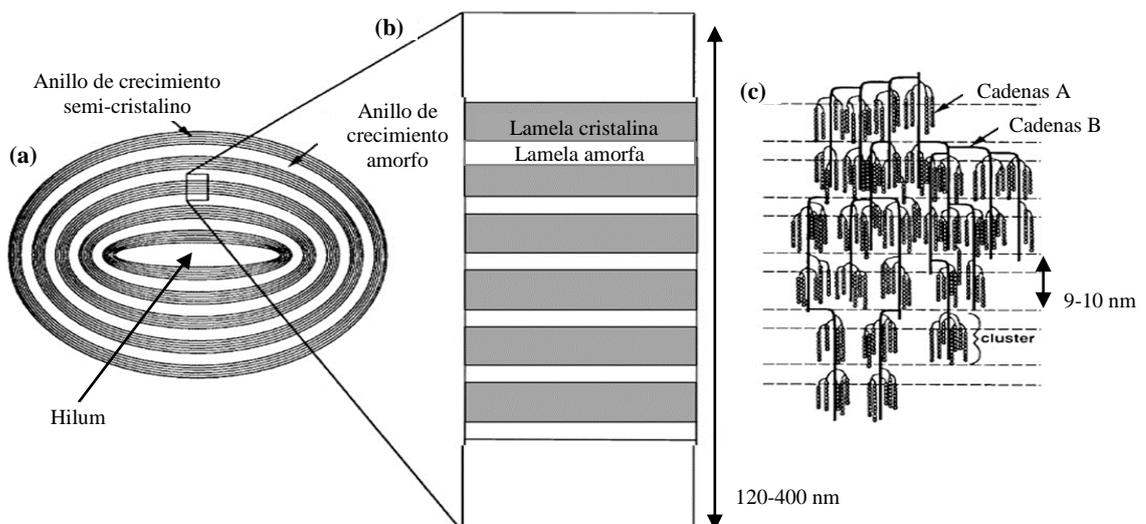
**Figura 2.7.** Representación esquemática de las diferencias a nivel estructural de los modelos de “clúster” y de bloques de construcción de la amilopectina. Fuente: Adaptado de Vamadevan & Bertoft (2015).

**Referencias:** C = lamela cristalina, A = lamela amorfa, SIB = segmentos interbloques, SIC = segmentos “interclúster”. La principal diferencia entre ambos modelos consiste en que en el modelo de “clúster” las moléculas de amilopectina (SIC) atraviesan las lamelas mientras que en el modelo de bloques de construcción permanecen en la lamela amorfa.

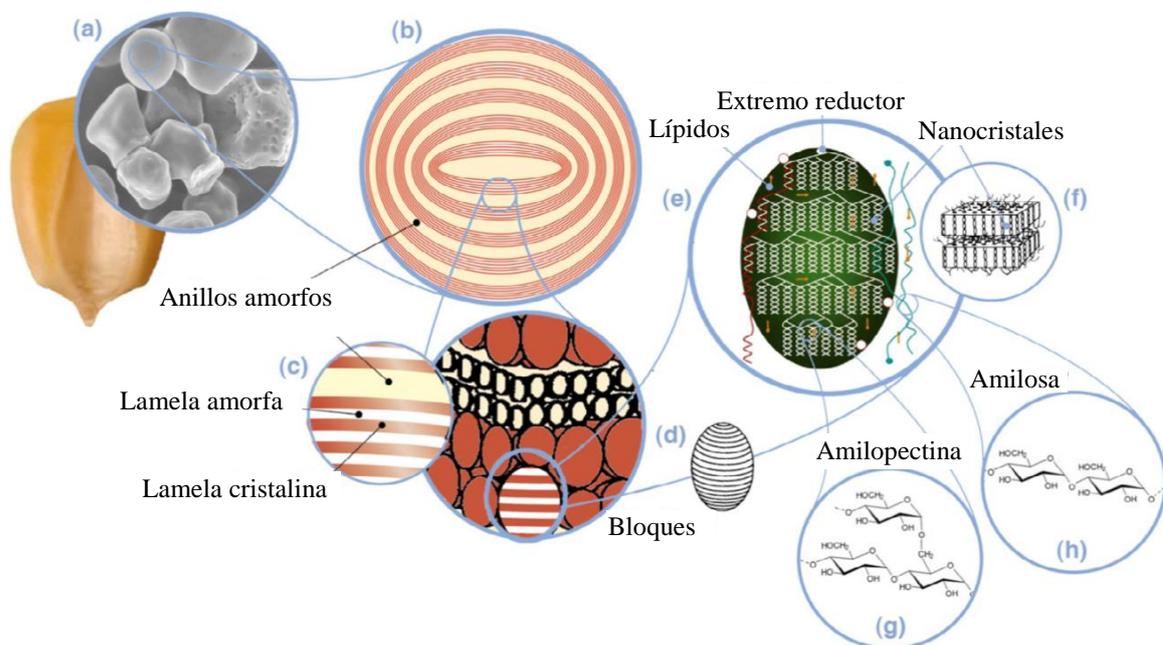
#### 2.2.4. Estructura del gránulo

En las Figuras 2.8 y 2.9 se representan la estructura del gránulo de almidón. En los gránulos, la amilosa y la amilopectina se disponen en forma de anillos semi-cristalinos y amorfos alternantes de crecimiento radial que nacen en el hilum considerado generalmente como una zona amorfa. Cada anillo tiene un espesor de 120 a 400 nm (Donald *et al.*, 2001). Esta disposición se debe a las variaciones de la disponibilidad de hidratos de carbono durante el crecimiento del gránulo en los tejidos vegetales (Cameron & Donald, 1992). Los gránulos de los almidones nativos presentan una cristalinidad de 15-45 %. La estructura organizada del gránulo, patrón concéntrico de anillos semi-cristalinos, da lugar a la birrefringencia (cruz de malta) que se observa

en un microscopio de luz polarizada (Copeland *et al.*, 2009). Los anillos amorfos se conformarían cuando existe menor cantidad de hidratos de carbono disponibles en el tejido vegetal (Cameron & Donald, 1992). Los anillos semi-cristalinos formados por una estructura lamelar comprenden zonas cristalinas y amorfas alternantes dispuestas a una distancia de 9-10 nm. Las zonas amorfas consisten en moléculas de amilosa y puntos de ramificación de la amilopectina, distribuidas en forma desordenadas mientras que las zonas cristalinas se hallan formadas por asociaciones de dobles hélices de cadenas cortas de amilopectina. Estas se conforman a partir de las cadenas individuales más externas de la amilopectina las que se unen a través de sus grupos hidroxilos por puentes de hidrógenos, aunque las cadenas de amilosa también pueden asociarse para formar dominios cristalinos (Pérez & Bertoft, 2010; Tester *et al.*, 2000). La amilopectina es la principal responsable de la cristalinidad del gránulo (Robin *et al.*, 1974; Veregin *et al.*, 1986) mientras que la amilosa en su gran mayoría se encuentra en forma amorfa (Kassenbeck, 1978). Las zonas cristalinas representan una fracción de toda la estructura del gránulo por lo que la gran parte de la amilopectina se halla en estado amorfo, probablemente en forma de doble hélice amorfa (Gidley & Bociek, 1985). Las cadenas más largas de la amilopectina y ciertas moléculas de amilosa, que se hallan en los “clústers” de amilopectina, pueden extenderse desde las zonas cristalinas hasta las zonas amorfas (Blazek *et al.*, 2009). En las zonas cristalinas las moléculas de amilosa presentarían una conformación más ordenada que en la zona amorfa (Kozlov *et al.*, 2007). Además, las zonas cristalinas de la amilosa afectarían la estructura ordenada de la amilopectina (Blazek *et al.*, 2009).



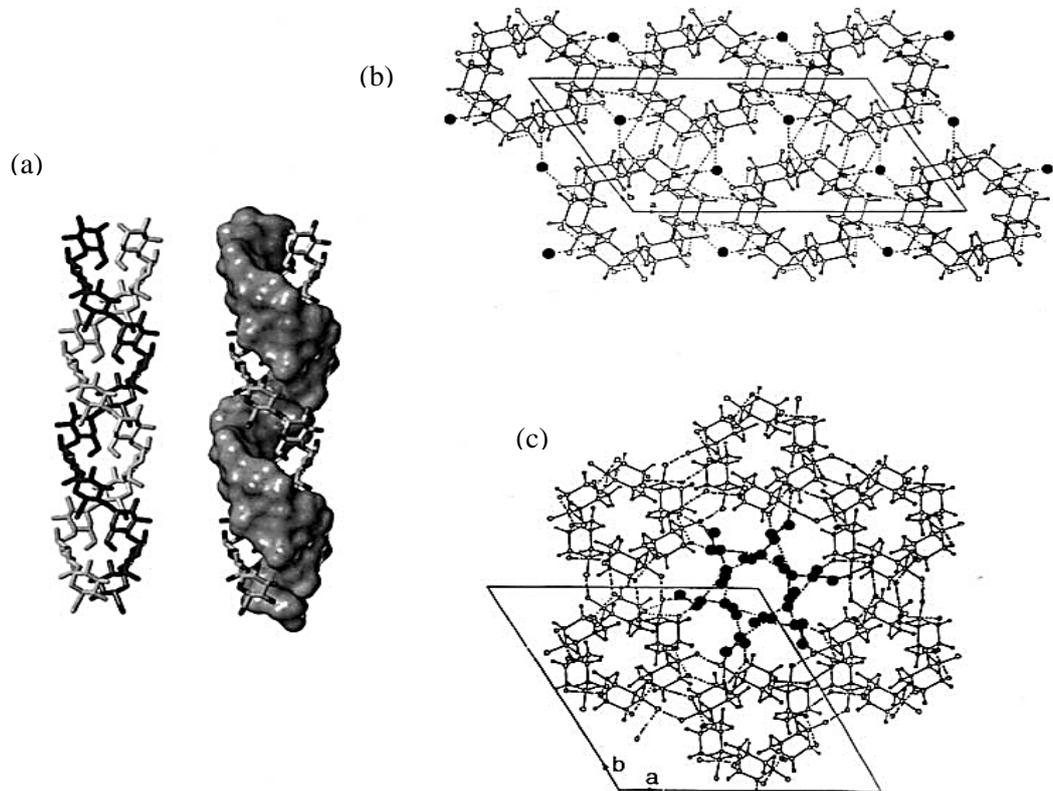
**Figura 2.8.** Estructura del gránulo de almidón. (a) Gránulo, (b) lamela y (c) cadenas de polímeros. Fuente: Adaptado de Blazek & Gilbert (2011).



**Figura 2.9.** Representación en varias escalas de la estructura del gránulo de almidón. (a) Gránulos de almidón de maíz (30 µm), (b) anillos semicristalinos y amorfos de los anillos de crecimiento del almidón, (c) lamelas cristalinas y amorfas, (d) anillos de crecimiento y estructura interna de los bloques (20–50 nm), (e) doble hélice de la amilopectina (f) nanocristales: otra representación de la lamela cristalina obtenida por hidrólisis ácida, (g) estructura molecular de la amilopectina y (h) estructura molecular de la amilosa. Fuente: Adaptado de Le Corre & Angellier-Coussy (2014).

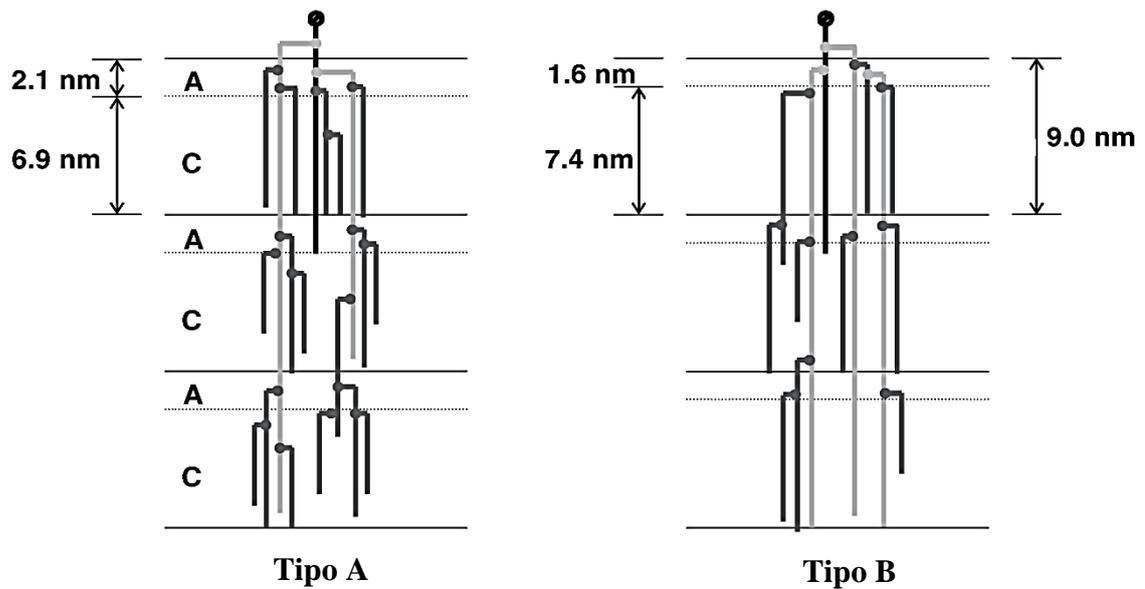
Mediante difracción de rayos X se ha determinado que existen tres patrones de cristalinidad del gránulo de almidón dependiendo de la longitud de las cadenas: tipo A, tipo B y tipo C. El último es una combinación del tipo A y B (Hizukuri, 1985; Sarko & Wu, 1978). Las cadenas que presentan más de 10 unidades glucosídicas participan en la formación de las dobles hélices conduciendo a los diferentes patrones. Cadenas con GP de 10 a 12 forman patrones de cristalinidad tipo A mientras que las cadenas con GP mayor a 12 forman patrones tipo B (Pérez *et al.*, 2009). En los patrones tipos A y B las dobles hélices son esencialmente iguales pero difieren en el empaquetamiento y en el contenido de agua (Imberty *et al.*, 1991). Existen dos modelos propuestos por Imberty *et al.* (1988) e Imberty & Pérez (1988). En el tipo B las moléculas se disponen en un empaquetamiento hexagonal de doble hélices formando un canal central que contiene 36 moléculas de agua presentando una estructura más abierta y núcleo hidratado. En el tipo A la región central se encuentra ocupada por una doble hélice y 8 moléculas de agua exhibiendo una estructura más compacta (Figura 2.10). Aquí, las cadenas de

amilopectina son más cortas. Las cadenas exteriores largas de la amilopectina favorecen la formación del patrón de cristalinidad tipo B (Jane, 2006). En los almidones tipo A, los puntos de ramificación se encuentran en las regiones amorfa y cristalina del gránulo. En los almidones tipo B, los puntos de ramificación se hallan solo en la región amorfa (Jane *et al.*, 1997) (Figura 2.11).



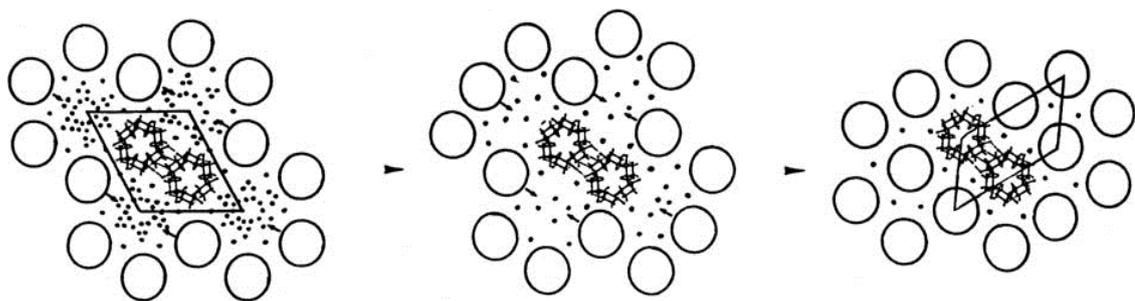
**Figura 2.10.** (a) Modelo molecular de doble hélice de la estructura cristalina del gránulo de almidón tipo A y B. Proyección en el plano de la estructura cristalina del gránulo de almidón: (b) tipo A y (c) tipo B. Las líneas de puntos representan puentes de hidrógenos y los círculos negros indican moléculas de agua. Fuente: Pérez *et al.* (2009).

Generalmente, los almidones de cereales presentan patrones de cristalinidad tipo A y los almidones de tubérculos, y con elevado contenido de amilosa, patrones de cristalinidad tipo B. Aunque se pueden presentar ambos tipos. El almidón de mandioca exhibe un patrón de cristalinidad tipo A o Ca. En el patrón Ca se observa un predominio del tipo A con respecto al tipo B (Zhu, 2015). El tipo B puede pasar al tipo A en presencia de alta temperatura y baja humedad (Pérez *et al.*, 2009) (Figura 2.12).



**Figure 2.11.** Modelos de la estructura tipo A y B de la amilopeptina. Fuente: Yoo & Jane (2002).

**Referencias:** A = zona amorfa y C = zona cristalina.



**Figure 2.12.** Modelo de transición del patrón de cristalinidad del almidón tipo B al tipo A. Los puntos indican moléculas de agua. Fuente: Imberty *et al.* (1991).

### 2.3. USOS DEL ALMIDÓN

Los almidones nativos de diferentes orígenes botánicos como cereales, leguminosas, tubérculos, raíces y frutos son empleados en una amplia variedad de productos en la industria de alimentos y otras industrias (Biliaderis, 1998). En la industria de alimentos se utilizan como materia prima principal o como aditivos en la elaboración de diversos tipos de alimentos procesados (Pizarro *et al.*, 2016). En los alimentos procesados los almidones pueden ser utilizados principalmente como espesantes o estabilizantes. Estas funcionalidades del almidón dependen de la estructura y de la proporción entre la amilosa y la amilopeptina (Charles *et al.*, 2005). Los almidones pueden influir en diferentes propiedades de los alimentos tales como textura,

viscosidad, formación de gel, adhesión, retención de humedad, formación de película y homogeneidad (Zia-ud-Din *et al.*, 2017). Los almidones se agregan como aditivos en alimentos tales como salsas, sopas, rellenos de fruta y productos horneados, a base de crema, cárnicos, congelados y lácteos entre otros (Davies, 1995; Pizarro *et al.*, 2016). Los usos no alimenticios del almidón se incluyen en las industrias: química, farmacéutica, textil, de combustibles a base de alcohol y de adhesivos. Las nuevas aplicaciones de los almidones abarcan el uso como sustitutos en alimentos bajas calorías, materiales de empaque biodegradables, películas delgadas, materiales termoplásticos y tratamiento de aguas (Biliaderis, 1998; Ogunsona *et al.*, 2018). El interés en el uso de los almidones se fundamenta en su amplia distribución mundial, abundancia y bajo costo (Ogunsona *et al.*, 2018).

El empleo de los almidones nativos en la industria, independientemente del origen botánico, es restringido debido a sus limitadas propiedades físicas y químicas apropiadas para ciertos tipos de procesos tecnológicos. Además, diversas condiciones y combinaciones de temperatura, pH y presión pueden reducir sus usos al promover baja resistencia, descomposición térmica, retrogradación y sinéresis (Bello-Pérez *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2004; Amani *et al.*, 2005). En ciertos alimentos que contienen almidones, al ser almacenados o sometidos a ciclos de congelamiento y descongelamiento, se producen fenómenos de retrogradación y sinéresis causando un aumento de la rigidez y pérdida de agua (Sae-Kang & Suphantharika, 2006). Para mitigar estos efectos indeseables y adaptar los almidones nativos a funciones específicas, los almidones son modificados en sus características estructurales para mejorar sus propiedades físico-químicas y funcionales. A partir de estas modificaciones se obtienen pastas con atributos específicos que pueden resistir condiciones extremas de procesamiento. Algunos de estos atributos son: estabilidad mecánica, térmica y a los ciclos de congelamiento y descongelamiento, resistencia a la retrogradación, claridad de las pastas, entre otros (Ogunsona *et al.*, 2018). Las modificaciones realizadas a los almidones nativos amplían sus aplicaciones industriales y otorgan mayor valor agregado (López *et al.*, 2010).

#### **2.4. MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN**

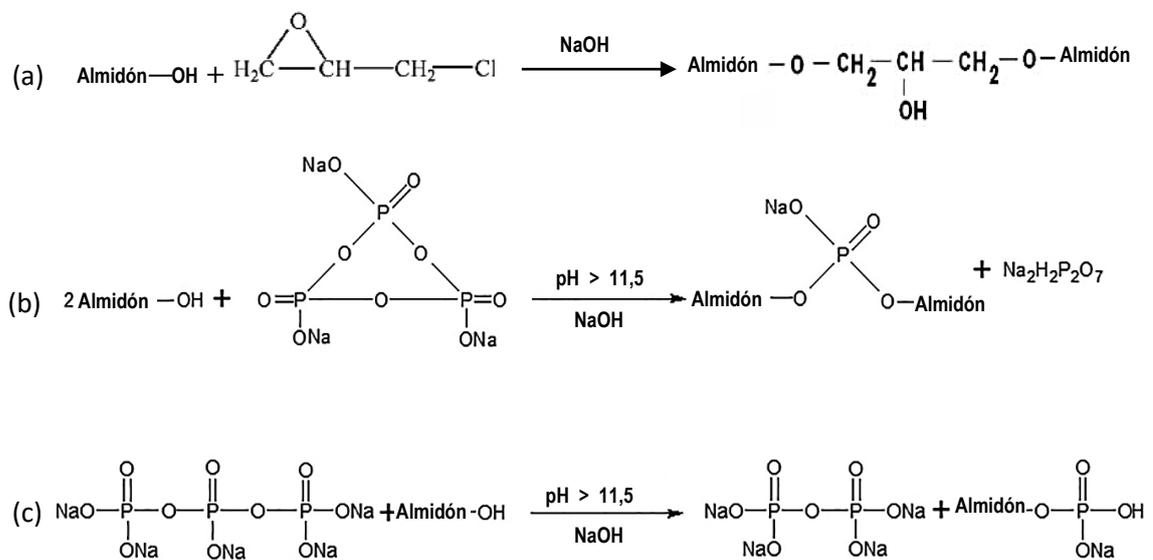
Se han empleado diversos métodos para modificar los almidones y lograr propiedades funcionales específicas. Los métodos utilizados para las modificaciones de

los almidones se clasifican en cuatro categorías: químicos, físicos, enzimáticos y genéticos (BeMiller, 1997; Jobling, 2004; Tharanathan, 2005).

**a) Métodos químicos:** Los métodos químicos son los más empleados. Entre ellos se encuentran los métodos de: 1) degradación a través de hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática o reacciones de oxidación y 2) derivatización por esterificación, eterificación, EC, acetilación, cationización o combinaciones de los mismos (Wurzburg, 1960; Singh *et al.*, 2007). Las propiedades químicas y funcionales logradas dependen del origen botánico del almidón, de las condiciones de reacción, del tipo de sustituyente, del grado de sustitución y de la distribución de los sustituyentes en la molécula de almidón (Kavitha & BeMiller, 1998; Richardson *et al.*, 2000; Hirsch & Kokini, 2002; Wang & Wang, 2002). Las propiedades físico-químicas principalmente afectadas son el poder de hinchamiento, la solubilidad y la claridad de las pastas del almidón (Singh *et al.*, 2007; Wongsagonsup *et al.*, 2014; Koo *et al.*, 2010; Mirmoghtadaie *et al.*, 2009).

Los almidones modificados por EC, obtenidos por modificación química, son los de mayor producción y uso en la industria de los alimentos (Shukri *et al.*, 2015). La modificación química de estos almidones implica la reacción entre los grupos hidroxilos de la molécula de almidón con compuestos con dos o más grupos funcionales para formar una estructura tipo red tridimensional. Esto permite la formación de puentes intra e intermoleculares, localizados al azar, en los que participan la amilopectina y la amilosa en menor medida (Singh *et al.*, 2007; Jane *et al.*, 1992). Se estima que la formación de EC se produce principalmente en las regiones amorfas del gránulo debido a que no se han observado modificación de los patrones de cristalinidad en el gránulo de almidón (Koo *et al.*, 2010). Los EC se obtienen por el tratamiento de los gránulos de almidón con reactivos capaces de formar uniones moleculares, tipo éster o éter, entre los grupos hidroxilos del almidón. Los agentes formadores de EC permitidos para su uso en alimentos, empleados frecuentemente, son EPI, TMFS, TPFS y POCl<sub>3</sub> (Singh *et al.*, 2007). Además, se han utilizado mezclas de ácido acético anhidro y ácido adípico y mezclas de TMFS y TPFS (Ashogbon & Akintayo, 2014). Se ha reportado que la formación EC puede ser influida por la fuente del almidón, concentración y composición del reactivo, extensión de la sustitución, pH, tiempo y temperatura de reacción (Chung *et al.*, 2004; Lim & Seib, 1993; Singh *et al.*, 2007). De acuerdo con Ačkar *et al.* (2010) y Jyothi *et al.* (2006), la modificación con EPI es uno de los métodos más frecuentemente usados en la química de polisacáridos. Esta modificación conduce a la formación de glicéridos de dialmidón que son altamente resistentes a

cambios en el pH y a tratamientos mecánicos, debido a los puentes de unión entre el reactivo y el almidón (Figura 2.13). El TMFS es considerado un eficiente agente formador de EC con baja toxicidad (Gui-Jie *et al.*, 2006) muy apropiado para ser usado en alimentos. La reacción del almidón con TMFS, en condiciones alcalinas, puede producir principalmente compuestos diesterificados (monofosfatos de dialmidón y difosfatos de monoalmidón) y en menor proporción mono y triesteres de fosfato (monofosfatos de monoalmidón, y trifosfatos de monoalmidón). La reacción con TPFS conduce principalmente a la formación de compuestos monoesterificados y, en menor proporción, a diesteres de fosfatos (Sang *et al.*, 2007) (Figura 2.13).



**Figure 2.13.** Principales productos de la reacción del almidón en condiciones alcalinas con (a) epíclorhidrina, (b) trimetafosfato de sodio y (c) tripolifosfato de sodio. Fuente: (a) Adaptado de Singh *et al.* (2007) y (b-c) Sechi & Marques (2017).

Los EC modifican la estructura del almidón alterando sus propiedades físico-químicas y fisiológicas. Con este método se ha logrado mejorar la estabilidad de las pastas de almidón durante el congelamiento o el almacenamiento en frío (Chung *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1999). El mismo proporciona estabilidad térmica y mecánica debido a que causa restricción del hinchamiento, disminuye la ruptura del gránulo y pérdida de viscosidad durante la cocción y tiene efectos beneficiosos para la salud desde el punto de vista nutricional (Koo *et al.*, 2010; Woo & Seib 1997). Las pastas de los almidones modificados por EC presentan mayor resistencia a cambios en el pH y fuerzas de cizalla. Además, se observa menor claridad de las pastas, lo que puede ser

atribuido a la incompleta gelatinización, y bajo poder de hinchamiento (Kaur *et al.*, 2006; Lim & Seib 1993). El uso apropiado de un agente formador de EC puede permitir un hinchamiento del gránulo de almidón sin disrupción y con ello controlar las propiedades reológicas de los almidones en los productos alimenticios (Kaur *et al.*, 2004). Las propiedades térmicas de los almidones con EC pueden ser afectadas en base a la naturaleza y concentración del reactivo utilizado y a la relación amilosa/amilopectina (Singh *et al.*, 2007).

**b) Métodos físicos:** Los métodos físicos son métodos simples, de bajo costo y seguros debido al no empleo de reactivos químicos o agentes biológicos (Ashogbon & Akintayo, 2014). Actualmente existe un creciente interés en el empleo de los métodos físicos para la obtención de almidones modificados de grado alimenticio. Estos almidones no solo son considerados ingredientes naturales y seguros sino que además su agregado en los alimentos no se encuentra limitado por la legislación (BeMiller, 1997; Kaur *et al.*, 2012). La modificación de los almidones por los métodos físicos puede producir pérdida o preservación de la integridad molecular. Los tratamientos mediante los cuales se obtienen los llamados almidones pre-gelatinizados, que implican la cocción del almidón y posterior secado, causan una destrucción de la estructura granular (Ashogbon & Akintayo, 2014). Los tratamientos hidrotérmicos de ANN y el HMT son comúnmente utilizados para las modificaciones físicas de los almidones. Los mismos modifican las propiedades fisicoquímicas del almidón sin destruir la estructura granular (Jayakody & Hoover, 2008).

Los tratamientos hidrotérmicos combinan calor y humedad. Hay condiciones críticas de temperatura y contenido de agua por sobre las cuales los tratamientos térmicos producen destrucción del gránulo. Estas condiciones dependen de la fuente del almidón. Los tratamientos de ANN y el HMT difieren principalmente en la cantidad de agua y temperatura empleada.

El tratamiento de ANN es un tratamiento térmico en presencia de alta humedad. En el mismo, el almidón es calentado entre la temperatura de transición vítrea y la temperatura de gelatinización en presencia de agua (40-76 % p/p) durante un cierto tiempo (generalmente  $\geq 24$  h) (Jacobs & Delcour, 1998; Chung *et al.*, 2009; Tester & Debon, 2000; Ashogbon & Akintayo, 2014). La hidratación del gránulo promueve un cambio de estado secundario (vítero a cristalino) en las moléculas de almidón causando la movilización de las moléculas de las regiones amorfas e incrementado la interacción en las regiones cristalinas (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Las interacciones

mencionadas se producirían entre las moléculas de amilosa-amilosa y amilosa-amilopectina (Chung *et al.*, 2010) mejorando la perfección de las zonas cristalinas. Esto lleva a un aumento de la estabilidad del gránulo del almidón y evita su desintegración. Además, la temperatura de gelatinización se incrementa debido a una disminución del hinchamiento normal de los gránulos de almidón y a una disminución de la lixiviación de amilosa.

El HMT es un tratamiento térmico en presencia de bajo contenido humedad. El tratamiento consiste en calentar el almidón húmedo, en presencia de menos de 35 % (p/p) de agua, entre sus temperaturas de transición vítrea y gelatinización. Las temperaturas comúnmente usadas se encuentran en el rango de 100 °C a 150 °C por períodos de 24 h o menores. La temperatura a la que finaliza la gelatinización de la mayoría de los almidones raramente excede los 100 °C. El uso de temperaturas elevadas en este tratamiento se puede explicar por el hecho de que las propiedades de gelatinización se modifican o dependen del contenido de humedad. Mediante calorimetría diferencial de barrido o DSC por sus siglas en inglés (*Differential Scanning Calorimetry*) se demostró que al disminuir el contenido de agua se produce un incremento de la temperatura de gelatinización. El efecto del HMT sobre las propiedades físico-químicas de los almidones modificados depende del origen botánico del almidón y de las condiciones utilizadas (Ashogbon & Akintayo, 2014). Este tratamiento causa un aumento en el rango y temperatura de gelatinización, disminuye el hinchamiento del gránulo y lixiviación de amilosa y aumenta la estabilidad térmica. Dependiendo del origen botánico se pueden presentar cambios en el patrón de difracción de rayos X, formación de complejos de amilosa-lípidos y aumento o disminución de la susceptibilidad a la degradación enzimática (Chung *et al.*, 2009).

Recientemente, se han informado nuevos métodos de modificaciones físicas, tales como congelamiento profundo “deep-freezing” (Szymońska *et al.*, 2000), múltiple congelamiento profundo y descongelamiento (Szymońska *et al.*, 2003), sobrecalentamiento (Steeneken, 2009) y presión osmótica “osmotic pressure treatment” (OPT) (Pukkahuta *et al.*, 2007), entre otros. El uso del OPT produce una modificación del almidón similar a la lograda con el HMT.

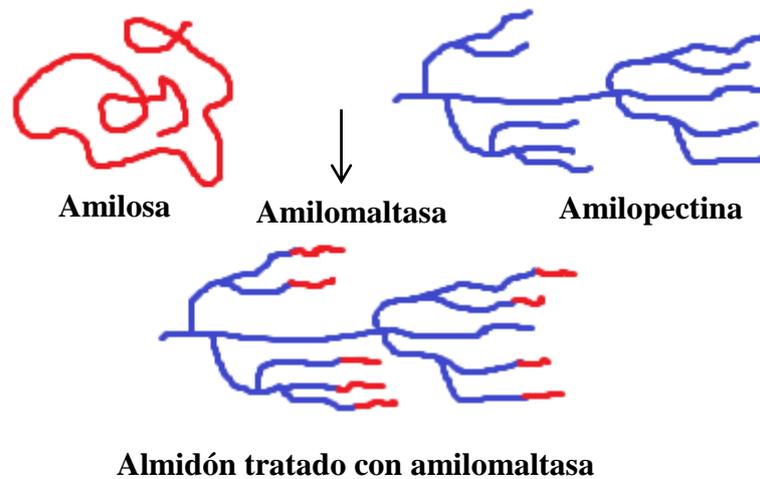
El OPT consiste en modificar el almidón en presencia de una solución salina concentrada (solución de sulfato de sodio o cloruro de sodio saturada). Éste fue desarrollado con el propósito de obtener almidones con la misma modificación física que la obtenida por el HMT pero en presencia de un mayor contenido de agua. El

sulfato de sodio se usa frecuentemente para evitar la gelatinización del almidón a valores de pH y temperaturas altas y porque facilita la reacción. El sulfato de sodio causaría una disminución de la actividad del agua y de la movilidad del solvente lo que evitaría el ingreso de agua al gránulo inhibiendo la gelatinización. El OPT permitiría obtener una suspensión homogénea de almidón con una mejor distribución del calor (Pukkahuta *et al.*, 2008). El uso del mismo ayudaría a contrarrestar los efectos no deseados obtenidos por el HMT tales como la penetración y distribución heterogénea del calor y la condensación del vapor durante el tratamiento. Esto último produciría la gelatinización del gránulo. Además, sería un método apropiado para la obtención de almidones modificados a gran escala (Pukkahuta *et al.*, 2007).

La susceptibilidad a la hidrólisis por la enzima  $\alpha$ -amilasa de los gránulos de almidón modificados por tratamientos hidrotérmicos puede ser variada. En algunos casos se observa una disminución y en otros un incremento.

**c) Métodos enzimáticos:** Los métodos de modificación enzimáticos del almidón para uso alimentario emplean enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y glucoamilasa. Con ellos se obtienen maltodextrinas, maltosa y glucosa (Van Der Maarel *et al.*, 2005). Otras enzimas menos frecuentemente utilizadas son las transferasas que forman nuevas uniones glucosídicas. Las uniones pueden ser intra o intermoleculares cuando participan la ciclodextrina glicosiltransferasa o la amilomaltasa ( $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -1,4 glucosil transferasa), respectivamente. La modificación con amilomaltasa implica la ruptura de un enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico entre dos moléculas de glucosa y la formación de un nuevo enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico. De acuerdo a Alting *et al.* (2009), fragmentos de las moléculas de amilosa se unen a las cadenas laterales de la amilopectina produciendo un aumento en su longitud con respecto al almidón nativo (Figura 2.14). Esta modificación es afectada principalmente por el tiempo de incubación impactando sobre las propiedades funcionales del almidón resultante. Van Der Maarel *et al.* (2005) observaron que el almidón de papa, a una concentración mayor o igual a 3 % (p/v), tratado con amilomaltasa, permitió la formación de un gel termorreversible similar a la gelatina. Los autores sugieren que el mismo podría ser utilizado como un sustituto de la gelatina de origen vegetal. El inconveniente es que, a diferencia de la gelatina, se forman geles turbios (Kaur *et al.*, 2012; Van Der Maarel *et al.*, 2005). Además, se ha observado ausencia o poca presencia de retrogradación. Estos productos se pueden emplear como rellenos de alimentos, en cosméticos, en productos farmacéuticos, en detergentes, en adhesivos, entre otros. Alting *et al.* (2009) utilizaron almidón de papa

modificado con amilomaltasa como sustituto de grasa en yogurt para aumentar la cremosidad.



**Figura 2.14.** Esquema de la transformación de la amilosa y de la amilopectina del almidón de papa tratado con la enzima amilomaltasa. Fuente: Adaptado de Alting *et al.* (2009).

Se usó ciclomaltodextrina glucosiltransferasa para producir ciclodextrinas, detectándose una mayor formación en presencia de isoamilasa (Kim & Robyt, 2000). Las ciclomaltodextrinas pueden formar complejos con moléculas orgánicas para aportar sabor, olor y flavor a los almidones entre otras características (Kaur *et al.*, 2012). Auh *et al.* (2006) emplearon ciclomaltodextrinasas para modificar el almidón de arroz y obtener un almidón modificado con bajo contenido de amilosa y escasa retrogradación.

**c) Métodos genéticos o modificación biotecnológica:** Estos métodos consisten en la modificación genética del almidón en el vegetal *in planta* enfocándose en las enzimas que participan en la biosíntesis del almidón (Kaur *et al.*, 2012). Con estos métodos se pueden lograr almidones con nuevas propiedades y aplicaciones sin la necesidad de la utilización de tratamientos químicos o enzimáticos, luego de la extracción, para su óptima funcionalidad (Slattery *et al.*, 2000). Las modificaciones genéticas pueden realizarse mediante técnicas tradicionales de reproducción o técnicas derivadas de la biotecnología. Se puede obtener una gran variedad de almidones debido a que son muchas las enzimas que participan en la biosíntesis del almidón, las cuales son susceptibles de ser afectadas. El principal propósito de las modificaciones genéticas se centra en alterar la relación amilosa/amilopectina, cambiar la distribución de la longitud de las cadenas de las moléculas de amilopectinas e incrementar el contenido de fosfato

(Zeeman *et al.*, 2010). Algunos de los productos obtenidos mediante este tipo de modificaciones son: almidón libre de amilosa (céreo), almidón de alta amilosa, almidón con la estructura de la amilopectina alterada (amilopectina con una elevada relación de cadenas cortas a cadenas largas), almidón con contenido modificado de fósforo, almidón con gránulos alterados en tamaño y cantidad, entre otros (Jobling, 2004; Edwards *et al.*, 1999).

## **2.5. DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN**

El almidón se consume comúnmente luego de un procesamiento. Un procesamiento en presencia de un elevado contenido de agua y alta temperatura produce destrucción de la estructura granular. Sin embargo, si el contenido de humedad es bajo se puede conservar la integridad del gránulo, como ocurre en la elaboración de galletitas (Englyst *et al.*, 2003).

La digestión del gránulo de almidón puede dividirse en tres fases: a) difusión de la enzima hacia el sustrato (depende de la porosidad del gránulo), b) adsorción de la enzima a las moléculas de almidón e c) hidrólisis (Colonna *et al.*, 1992). La digestión del almidón comienza en la boca. Inicialmente, las  $\alpha$ -amilasas de la saliva y del páncreas degradan el almidón a oligosacáridos y dextrinas. En el intestino delgado, las dextrinas son hidrolizadas a glucosa por la glucoamilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa. La glucosa es absorbida inmediatamente incrementando el índice de glucemia (IG) en sangre (Perera *et al.*, 2010).

La digestibilidad de los almidones varía en función del origen botánico, procesamiento, tamaño y porosidad del gránulo, relación amilosa/amilopectina, grado de asociación molecular entre los componentes, tipo de estructura cristalina (A, B o C), grado de cristalinidad, longitud de las cadenas de amilosa y de amilopectina y presencia de complejos amilosa-lípidos (Lehmann & Robin, 2007; Fannon *et al.*, 1992; Cummings & Englyst, 1995; Ring *et al.*, 1988; Holm & Bjorck, 1992). Otros factores que afectan incluyen el grado de gelatinización, retrogradación, características estructurales del alimento y presencia de otros componentes en el alimento (Perera *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista nutricional, y en función de su velocidad y extensión de la digestión enzimática en el intestino delgado, los almidones se clasifican en tres categorías: almidones de digestión rápida (ADR), almidones de digestión lenta (ADL) y almidones resistentes (AR). Los ADR y los ADL corresponden a las fracciones de

almidón que son hidrolizadas, luego de la ingestión, por la  $\alpha$ -amilasa en un período de 20 min y 120 min, respectivamente. El AR representa la fracción del almidón que no es hidrolizada a glucosa en el intestino delgado pero que es fermentada por la microbiota en el colon. Este almidón es resistente a la hidrólisis por la  $\alpha$ -amilasa luego de 120 min de la ingestión (Englyst *et al.*, 1992).

En base a la fuente botánica o procesos físicos o químicos a los que fueron sometidos, los AR se subdividen en cinco tipos (Homayouni *et al.*, 2014; Dupuis *et al.*, 2014; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011; Lockyer & Nugent, 2017).

- **AR tipo 1:** corresponde al almidón físicamente inaccesible por estar atrapado en una matriz no digerible. Por ejemplo, granos y semillas.
- **AR tipo 2:** representa al almidón crudo en los gránulos. Por ejemplo: almidón crudo en banana inmadura, en papa, en mandioca y en almidón de alta amilosa.
- **AR tipo 3:** corresponde a la fracción de almidón más resistente compuesto por amilosa retrogradada la cual se forma durante el enfriamiento prolongado del almidón gelatinizado. Por ejemplo, alimentos cocidos y enfriados.
- **AR tipo 4:** es el almidón que se obtiene por modificación química.
- **AR tipo 5:** se han propuesto dos definiciones para los AR tipo 5. La primera propone que es el almidón formado por complejos amilosa-lípidos. Almidón en el cual las cadenas de amilosa han formado complejos con componentes lipídicos. En alimentos que contienen almidón y lípidos se formarían durante el procesamiento o luego de la cocción. También pueden ser creados artificialmente y agregados a los alimentos (Seneviratne & Biliaderis 1991; Hasjim *et al.*, 2013; Lau *et al.* 2016, Froberg & Quanz, 2008). La segunda propone que son maltodextrinas resistentes. Estas se originarían en almidones procesados con el propósito de transformarlos en solubles y resistentes a la digestión (Mermelstein, 2009). La primera definición es la más utilizada.

Los alimentos son sometidos a diferentes procesos que causan un incremento en el contenido de la fracción de ADR. Los ADR se encuentran en elevadas cantidades en alimentos cocidos, con alto contenido de almidón, en presencia de agua y elevadas temperaturas. Algunos ejemplos son las papas y productos panificados. La ingesta de este tipo de alimentos causa un aumento en el IG postprandial lo que produciría un efecto negativo para la salud. Además, se produce una disminución de la saciedad lo

que llevaría a un aumento de la ingesta diaria de alimentos y con ello a un incremento del riesgo de padecer obesidad (Ludwig *et al.*, 1999; Ludwig, 2002). También se provocaría un aumento del riesgo de enfermedades como diabetes tipo II y cardiovasculares (Salmeron *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000; Ludwig, 2002). Los ADL y AR han despertados un especial interés debido a que se encuentran asociados a beneficios para la salud. Alimentos con elevado contenido de estos almidones estarían asociados con un IG bajo y una mayor saciedad permitiendo regular el peso corporal. Además ayudarían al funcionamiento mental, entre otros beneficios (Dupuis *et al.*, 2014, Lehmann & Robin, 2007).

## **2.6. ALMIDÓN RESISTENTE**

Los AR, con excepción del AR tipo 4, se encuentran naturalmente presentes en los alimentos procesados o no procesados que contienen almidón. Los granos de los cereales y las legumbres son las fuentes naturales más importantes de AR (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011). La cantidad de AR en un alimento depende de factores tales como el origen (legumbres, papa, banana, trigo, arroz, etc.), el tamaño y el tipo de gránulo, la cantidad inicial y el tipo de AR, la asociación con otros componentes (proteínas, lípidos, azúcares, gomas y otros compuestos bioactivos que pueden inhibir a la  $\alpha$ -amilasa (Lochocka *et al.*, 2015)), el procesamiento del alimento, el tipo de cocción, el almacenamiento y el modo de consumo (Brown, 1996). La cantidad inicial de AR, en un determinado almidón, se encuentra relacionada con la cantidad de amilosa presente debido a que la amilosa se digiere más lentamente que la amilopectina (Lockyer & Nugent, 2017).

El AR tipo 1 es estable al calor utilizado comúnmente en los procesos de cocción por lo que resulta apropiado para ser empleado como ingrediente en alimentos convencionales. El contenido de AR tipo 1 en los gránulos puede disminuir cuando estos son sometidos a molienda. Esto es debido a que la ruptura de las paredes celulares puede facilitar la gelatinización del almidón durante la cocción en presencia de agua disminuyendo la resistencia a la digestión (Lockyer & Nugent, 2017).

Dentro de los AR tipo 2, el almidón de maíz de alta amilosa presenta una elevada estabilidad. Este conserva su estructura y permanece resistente durante el procesamiento y preparación de los alimentos (Wepner *et al.*, 1999). Los AR tipo 3 se caracterizan por su gran termo-estabilidad. Estos se pueden formar en procesos en donde se utiliza calor y humedad, mientras que los AR tipo 1 y tipo 2 pueden ser destruidos (Faraj *et al.*,

2004). En las papas cocidas y enfriadas se puede formar AR tipo 3. El tipo de cocción puede influir en el contenido de AR tipo 3. Por ejemplo, se ha observado que las papas horneadas tienen un mayor contenido de AR tipo 3 comparadas con las cocidas en agua a ebullición (Raatz *et al.* 2016). Los AR tipo 1 y 2 comprenden almidones que son digeridos en forma muy lenta e incompleta en el intestino delgado (Sajilata *et al.*, 2006).

El hecho de que los AR pueden ser afectados por las condiciones de procesamiento y almacenamiento, es un factor de interés hacia la tecnología de alimentos debido a que es posible aumentar el contenido de AR en los alimentos mediante el empleo de tratamientos adecuados (Sajilata *et al.*, 2006). Se ha demostrado que todos los tipos de AR, a excepción del AR tipo 5, causan efectos beneficiosos para la salud de los consumidores (Homayouni *et al.*, 2014).

### **2.6.1. Almidón resistente como componente de la fibra dietaria**

Los AR resultan de gran importancia debido a que en los últimos años se ha reconocido que forman parte de la fibra dietaria (FD) de los alimentos (Woo *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2008). Maningat & Seib (2013) sostienen que “...los AR como componentes de la FD no solo son beneficiosos para la salud sino que pueden ser considerados como esenciales para la salud en general y el bienestar de los consumidores...”.

La FD está formada por componentes heterogéneos. La definición de FD, aceptada por la Comisión del *Codex Alimentarius* en 2008/2009 (Codex, 2009), es la siguiente: “Fibra dietaria abarca polímeros de carbohidratos con 10 o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por enzimas endógenas en el intestino delgado de humanos y pertenecen a las siguientes categorías:

- Polímeros de carbohidratos comestibles presentes naturalmente en alimentos en la forma de consumo.
- Polímeros de carbohidratos, que han sido obtenidos de alimentos crudos mediante tratamientos físicos, enzimáticos o químicos y que hayan demostrado tener efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, demostrado por una evidencia científica generalmente aceptada por autoridades competentes.
- Polímeros de carbohidratos sintéticos que hayan demostrado tener efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, demostrado por una evidencia científica generalmente aceptada por autoridades competentes.

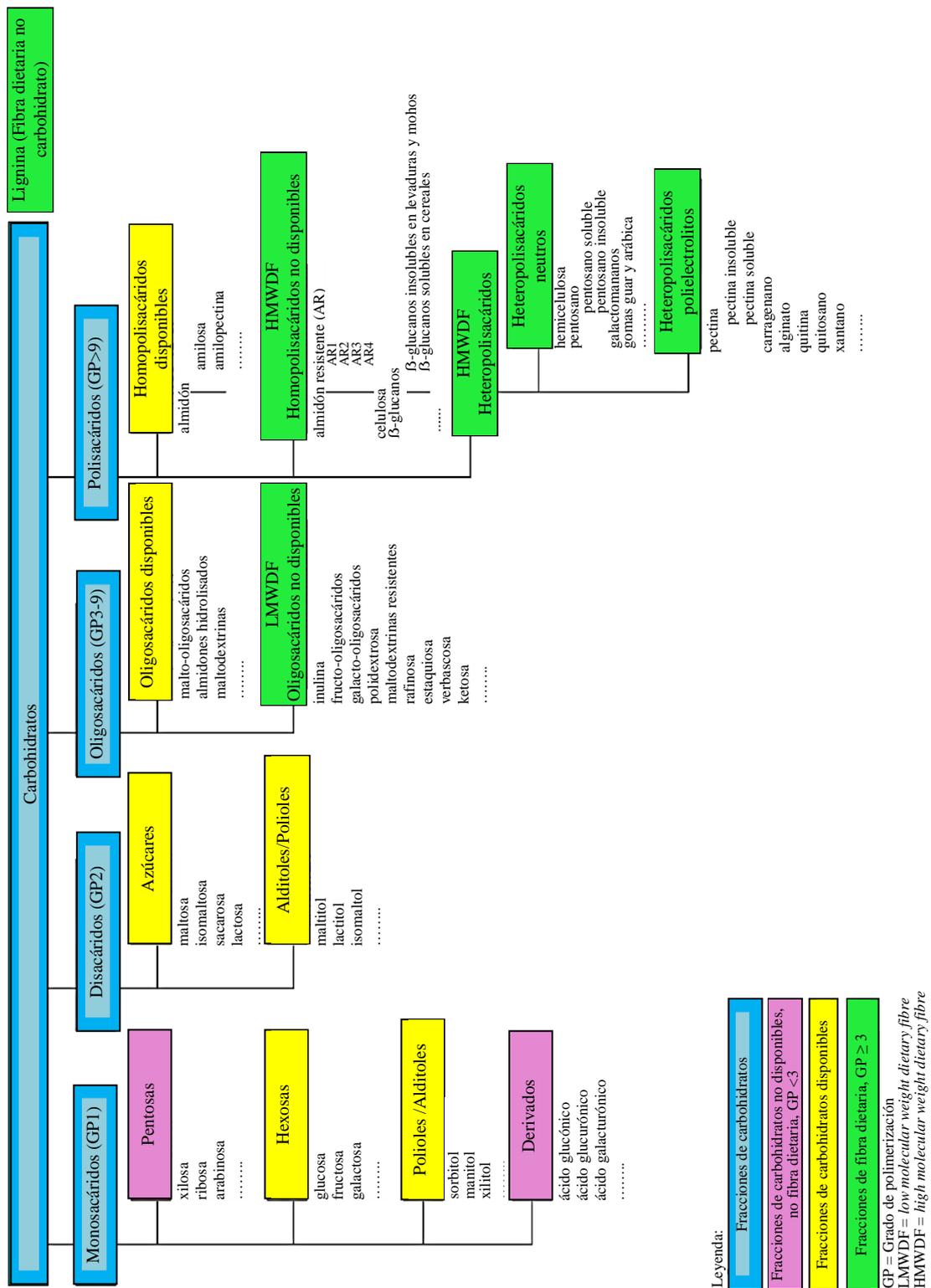
La decisión de incluir carbohidratos con 3 a 9 unidades monoméricas queda a criterio de las autoridades nacionales”.

Existen diferentes clasificaciones de las fracciones de la FD (dependiendo de la metodología empleada): soluble, insoluble, de alto peso molecular o bajo peso molecular. De acuerdo a Westenbrink *et al.* (2013), los AR pertenecen a la fracción de polisacáridos de tipo homopolisacáridos con un grado de polimerización mayor a 9 clasificada como FD de alto peso molecular o HMWDF por sus siglas en inglés (*high molecular weight dietary fibre*) (Figura 2.15).

### **2.6.2. Efectos fisiológicos beneficiosos de los almidones resistentes**

Actualmente los RS han adquirido gran interés por sus efectos beneficiosos para la salud y por sus propiedades funcionales (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010; Sajilata *et al.*, 2006). Los AR están asociados con los siguientes efectos beneficiosos:

**a) Prevención del cáncer de colon:** Los AR, cuando son fermentados en el colon por la microbiota, producen niveles elevados de ácido butírico o sus sales (Sharma *et al.*, 2008; Brouns *et al.*, 2002). Dentro de todos los componentes de la FD los AR son los que conducen a la mayor formación de ácido butírico (Raigond *et al.*, 2015). Se ha demostrado además que los AR estimulan a las bacterias intestinales que participan en la producción de ácido butírico (Champ *et al.*, 2003). El ácido butírico es la principal fuente de energía para las células del intestino grueso. Este puede reducir el riesgo de cambios malignos en las células. Se observó que *in vitro* inhibe la proliferación de células tumorales (Sharma *et al.*, 2008). También se ha informado que los AR producen aumento del volumen y disminución del pH de la materia fecal y mayor producción de ácidos grasos de cadena corta. Estos están asociados con la disminución de la incidencia de cáncer de colon (Ferguson *et al.*, 2000). Le Leu *et al.* (2002) reportaron que la combinación de AR con FD insoluble produce un aumento en los niveles de ácidos grasos de cadena corta y en especial de ácido butírico.



**Figura 2.15.** Representación esquemática de los hidratos de carbono que componen las fracciones de la fibra dietaria. Fuente: Adaptado de Westenbrink *et al.* (2013).

**b) Efectos hipoglucemiantes:** A diferencia de la digestión de los almidones comunes cocidos que se digieren prácticamente de inmediato, los AR se digieren en un

período de 5 a 7 h luego del consumo. Esto lleva a una disminución del IG postprandial, disminución de la insulinemia, mayor tiempo de sensación de saciedad y a la mantención de niveles energéticos adecuados (Reader, 1997). Además, se podría esperar un aumento de la utilización del tejido graso (Nugent, 2005). Los AR, al ser digeridos lentamente, pueden ser utilizados en situaciones en las cuales se necesita controlar la liberación de glucosa (Sajilata *et al.*, 2006). La asociación del consumo de AR con la disminución de IG postprandial resulta beneficiosa para el manejo de la diabetes (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Al-Tamimi (2007), en un estudio en individuos adultos, reportó una disminución de IG luego del consumo de barras de cereales formuladas con AR tipo 4 (almidón de trigo con EC) comparados con el control. Este investigador sugiere que dichos almidones permitirían controlar el peso corporal y la diabetes tipo II.

**c) Almidón resistente como prebiótico:** Prebiótico se define como “ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas” (Olagnero *et al.*, 2007). Los AR pueden ser utilizados como prebióticos debido a que no son digeridos hasta llegar al intestino grueso donde actúan como sustrato para el crecimiento de microorganismos beneficiosos (*Bifidobacterium*, etc.), generando una biomasa adecuada y pH óptimo (Brown *et al.*, 1996; Sajilata *et al.*, 2006; Olagnero *et al.*, 2007; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011).

**d) Reducción de la formación de cálculos biliares:** Se ha observado que los AR reducen la formación de cálculos biliares. La formación de cálculos biliares está relacionada con el aumento de la síntesis del colesterol. La misma es estimulada por la secreción de insulina en grandes cantidades como ocurre cuando se consumen almidones que se digieren fácilmente (Malhotra, 1968; Sajilata *et al.*, 2006). El AR, al disminuir los niveles de insulina, contribuiría a evitar la formación de cálculos biliares.

**e) Reducción de los niveles de colesterol:** En estudios realizados en ratas se ha demostrado que los AR influyen en el metabolismo de los lípidos. Estos causan disminución del colesterol total, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia, triglicéridos y lipoproteínas ricas en triglicéridos (Nugent, 2005). Estos efectos demuestran su potencial uso para mejorar la salud cardiovascular (Martínez-Flores *et al.*, 2004). En humanos, las investigaciones realizadas muestran resultados discordantes

por lo que sería necesario la realización de más estudios para establecer el efecto de los AR sobre el metabolismo de los lípidos (Nugent, 2005; Raigond *et al.*, 2015).

**f) Inhibición de la acumulación de grasas:** Muchos investigadores han evaluado la capacidad de los AR para afectar la oxidación de las grasas, impartir saciedad, controlar el peso corporal y reducir la obesidad. Sin embargo, los resultados no son concluyentes (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010). Higgins *et al.* (2004) han sugerido que el reemplazo de 5,4 % de los carbohidratos en un alimento por AR causaría un incremento en la oxidación postprandial de los lípidos lo que llevaría a una reducción de la acumulación de grasas. Tapsell (2004) sostiene que la disminución de los niveles de insulina, tras la ingestión de AR, promovería la utilización de las grasas del tejido adiposo y tendría un efecto beneficioso en el control del apetito. Bodinham *et al.* (2010), coincidiendo con el último investigador, sugieren que el consumo de 48 g de AR podría permitir el control del apetito. En contraposición, Ble-Castillo *et al.* (2017) y Al-Mana & Robertson (2018) no han observado una disminución subjetiva del apetito o saciedad luego del consumo de alimentos ricos en AR. Además, se ha reportado en estudios realizados en ratas, que los AR pueden incrementar hormonas intestinales que afectarían el balance energético representado una forma natural de controlar la obesidad (Keenan *et al.*, 2006). Higgins (2014) observó que los efectos de los AR sobre las grasas mostrarían su utilidad para la pérdida y mantenimiento del peso corporal. Sin embargo, no existe actualmente información directa que demuestre que los AR afecten al peso corporal, al consumo de energía o gasto de energía en humanos. Esta situación genera la necesidad de estudios bien diseñados para llegar a resultados concluyentes. Raigond *et al.* (2015) proponen que el consumo de AR está relacionado con un menor aporte de calorías, reducción de la acumulación de grasa en el cuerpo y menor tamaño de las células adiposas. La disminución de la producción de lípidos está asociada a un incremento de la oxidación de los lípidos a expensas de la oxidación de los carbohidratos.

**g) Absorción de minerales:** Se ha reportado que en ratas alimentadas con alimentos ricos en AR se produjo un incremento de la absorción de minerales como calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre (López *et al.*, 2001). En cambio, en humanos se detectó solo un incremento en la absorción de calcio (Coudray *et al.*, 1997).

**h) Otros beneficios de los AR:** Los AR pueden tener efectos positivos en problemas intestinales como colitis ulcerosa, diverticulitis y constipación (Nugent, 2005). Causan aumento del volumen de la materia fecal, influyen en la consistencia y

tiempo de tránsito en el intestino. Moreau *et al.* (2003) observaron que la alimentación con AR a ratas con colitis inducidas por sustancias químicas causó una normalización de las funciones celulares. Además, se ha informado que influyen en forma positiva sobre el sistema inmunológico (Sotnikova *et al.*, 2002; Raigond *et al.*, 2019).

### 2.6.3. Obtención de almidón resistente

En los alimentos que tienen almidón, es posible incrementar el contenido de AR mediante un adecuado control de las variables de procesamiento tales como: contenido de humedad, pH, temperatura, tiempo de calentamiento, ciclos de calentamiento y enfriamiento o congelado y descongelado, etc. (Sajilata *et al.*, 2006). La manipulación del contenido de AR presente naturalmente en los alimentos representa un desafío complejo. Se han reportados resultados contradictorios, informándose incrementos y disminuciones del contenido de AR para el mismo sistema. Por otro lado es posible preparar AR para ser utilizado como ingrediente o aditivo en la elaboración de alimentos. No todos los AR son adecuados para ser utilizados como ingredientes en alimentos debido a que ciertos procesos pueden degradarlos. Los AR tipo 1 y 2 pueden ser afectados por temperaturas elevadas (Lockyer & Nugent, 2017).

Se pueden obtener AR mediante la utilización de tratamientos hidrotérmicos, enzimáticos, químicos, mediante el empleo de métodos genéticos y combinaciones de tratamientos (Sajilata *et al.*, 2006; Dupuis *et al.*, 2014). Estos AR, a diferencia de los que existen en las fuentes naturales, no son afectados por el procesamiento o almacenamiento (Sajilata *et al.*, 2006). Los niveles de AR logrados dependen del método empleado, la naturaleza de los reactivos, de las condiciones de reacción (pH, temperatura, tiempo, etc.) y del origen botánico del almidón (Woo & Seib, 2002).

**a) Tratamientos hidrotérmicos:** Entre los tratamientos hidrotérmicos más empleados para la obtención de AR se encuentran los tratamientos de ANN y el HMT. Mediante los mismos se obtienen AR sin destruir la estructura granular. En estos tratamientos, la formación de AR se debería a los cambios a nivel molecular producidos por la formación de doble hélice entre las moléculas de amilosa y amilopectina. Esto incrementaría la perfección de zonas cristalinas preexistentes y aumentaría la estabilidad del gránulo (Chung *et al.*, 2009).

**HMT:** Con la utilización del HMT se han logrado obtener diferentes niveles de AR en almidones de distintos orígenes botánicos bajo diversas condiciones de temperatura, humedad y tiempo. En almidón de maíz, de arveja y de lenteja (modificados por el

HMT y gelatinizados) se detectó un aumento del contenido de AR con respecto a los almidones nativos de 4,6 % a 13,2 %, de 5,2 % a 16,4 % y de 5,3 % a 15,7 %, respectivamente en condiciones de 30 % de humedad a 120 °C con un tiempo de 2 h (Chung *et al.*, 2009). Brumovsky & Thompson (2001) obtuvieron un 52,7 % de AR estable a la ebullición en el almidón de maíz de alta amilosa. Este resultado, logrado con un tratamiento a 30 % de humedad, 140 °C y durante 80 min, correspondió a un incremento de 34,3 % con respecto al almidón nativo (18,4 %). Brumovsky *et al.* (2009) observaron un aumento en el contenido de AR estable a la ebullición en almidones de maíz, papa y trigo modificados por el HMT, en condiciones de 30 % de humedad, a 80-120 °C y durante de 40-60 min, comparados con sus correspondientes almidones nativos, mientras que en el almidón de mandioca observaron una disminución. El almidón de maíz presentó el mayor valor de AR (4,2 %), en las experiencias realizadas a 120 °C durante 60 min. La termoestabilidad del AR pone en evidencia que algunas de las interacciones moleculares soportan la gelatinización y minimizan el acceso de las enzimas (Chung *et al.*, 2009). Estos autores sugieren que dichas interacciones se realizarían entre las moléculas de amilosa-amilosa que, al ser más fuertes, resistirían mayores temperaturas que las interacciones amilosa-amilopectina o amilopectina-amilopectina. El almidón de papa céreo no gelatinizado alcanzó un contenido de AR de 66,8 % en condiciones de 20 % de humedad a 110 °C por 5 h (Lee *et al.*, 2012). Zeng *et al.* (2015) observaron una disminución de 4,0 % del contenido de AR en almidón de arroz céreo modificado por el HMT, comparado con el almidón nativo, en condiciones de 25 % de humedad a 110 °C y por 8 h. La sensibilidad a la digestión enzimática de los almidones modificados por el HMT depende del origen botánico, del contenido de humedad, del tiempo y de la temperatura, de la formación de complejos amilosa-lípidos y de la interacción amilosa-amilosa, amilosa-amilopectina y amilopectina-amilopectina (Franco *et al.*, 1995; Gunaratne & Hoover, 2002; Hoover & Vasanthan, 1994).

**ANN:** Se ha reportado en varios estudios que el tratamiento de ANN es menos efectivo en comparación con el HMT para la formación de AR estable a la ebullición (Brumovsky & Thompson, 2001) o para la formación de AR en muestras gelatinizadas (Chung *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010). Brumovsky & Thompson (2001) reportaron un incremento de 18,4 % a 28,1 % de AR estable a la ebullición en el almidón de maíz de alta amilosa, con respecto al almidón nativo, modificado por ANN en condiciones de 30 % de humedad, a 70 °C y durante 24 h. Este valor resultó menor al obtenido por el HMT. Chung *et al.* (2009) y Chung *et al.* (2010) observaron incrementos en el

contenido de AR en almidones de maíz, de lenteja, de arveja y de poroto (*navy bean*), tratados con ANN, aunque resultaron ser inferiores a los obtenidos mediante el HMT. En almidones de poroto *pinto* y *black bean*, modificados por ANN a 50 °C con 50 % de humedad por 24 h, se detectaron incrementos de AR de 39,7 % y 19,7 %, respectivamente (Simsek *et al.*, 2012). Algunos investigadores reportaron reducciones en el contenido de AR en almidones modificados por ANN. En almidón de arroz céreo modificado por ANN se observó una disminución del 4,4 % en el contenido de AR, comparado a su variedad nativa, en condiciones de 80 % de humedad a 50 °C y por 24 h (Zeng *et al.*, 2015). De acuerdo a O'Brien & Wang (2008), el aumento de la digestibilidad de los almidones modificados por ANN puede estar relacionado con el incremento en la porosidad del gránulo, lo cual facilitaría el ingreso de las enzimas al interior de los gránulos.

Otros tratamientos hidrotérmicos empleados para la obtención de AR son: la cocción por encima de la temperatura de gelatinización junto con un secado simultáneo y ciclos de autoclave-enfriamiento. En los tratamientos de ciclos de autoclave-enfriamiento (A-E) se utilizan temperaturas superiores a 100 °C, generalmente entre 120-145 °C, y tiempos de 5-30 min por ciclo (Dupuis *et al.*, 2014; Ashwar *et al.*, 2016a, Park *et al.*, 2009). Cuanto mayor es el número de ciclos mayor es la formación de AR (Dupuis *et al.*, 2014; Sievert & Pomeranz, 1989). La formación de AR por A-E se produce en dos etapas. Inicialmente, el tratamiento con autoclave produce la gelatinización del almidón durante el cual las moléculas de amilosa son lixiviadas fuera del gránulo en forma de espirales al azar. Luego, en la etapa de enfriamiento, se produce la retrogradación del almidón. Aquí, las cadenas de amilosa recristalizan formando paquetes de doble hélices estabilizados por puentes de hidrógenos otorgándoles resistencia a la hidrólisis enzimática (Ashwar *et al.*, 2016b).

**b) Tratamientos enzimáticos:** El AR se obtiene generalmente usando las enzimas pululanasa o isoamilasa que hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -(1,6)-glucosídicos de las ramificaciones de la amilopectina transformándola en lineal. La formación de AR se debería al aumento de la amilosa aparente como consecuencia de la hidrólisis de las ramificaciones de la amilopectina. Posteriormente, se produciría una retrogradación y formación de una estructura cristalina compacta que bloquearía a las enzimas digestivas. La agregación y ordenamiento de las doble hélices, formadas por las cadenas cortas de las moléculas de amilosa, incrementarían el contenido de AR (Van Hung *et al.*, 2012).

Las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa se emplean menos frecuentemente. Las mismas hidrolizan principalmente las moléculas de las zonas amorfas del gránulo produciendo paquetes de cristalitas que presentan mayor resistencia a la digestión (Dupuis *et al.*, 2014). Existe mucha variabilidad entre almidones de diferentes orígenes. Por lo tanto, es necesaria una correcta elección de la enzima, de las condiciones de pH y de la temperatura a utilizar para aumentar la efectividad de la enzima. Estas variables están influenciadas por las características de la amilopeptina. Otros componentes del almidón pueden afectar la reacción. Este es el caso de los lípidos (que conducen a la formación de complejos, AR tipo 5), proteínas, fósforo entre otros (Singh *et al.*, 2003).

Se realizaron varios estudios para evaluar el efecto combinado de la hidrólisis con ciclos de A-E y temperaturas de almacenamiento y combinaciones de tratamientos de alta temperatura-presión en la formación de AR a partir de almidones de diversos orígenes. Se observaron incrementos en el contenido de AR en almidones de maíz de 11,4 % a 29,9 % y de trigo de 9,1 % a 27,8 % mediante combinaciones de autoclave-hidrólisis con  $\beta$ -amilasa-autoclave (Hickman *et al.* 2009). A partir del almidón de mandioca y papa se lograron incrementar los niveles de AR de 3 % a 35 % y de 5 % a 48 % respectivamente mediante pululanasa seguida de tratamiento en autoclave y almacenamiento (Van Hung *et al.*, 2012). Además, se obtuvieron cantidades elevadas de AR a partir de almidones de batata (con un aumento de 13,52 % a 28,76 %) (Babu & Parimalavalli, 2018), arroz (Lee *et al.*, 2013), maíz de alta amilosa (Ozturk *et al.*, 2009), banana (González-Soto *et al.*, 2007), entre otros.

**c) Tratamientos químicos:** Las modificaciones químicas han sido ampliamente utilizadas para reducir la digestibilidad *in vitro* de los almidones (Ashwar *et al.*, 2016b).

Las reacciones de eterificación, esterificación o las que llevan a la formación de EC conducen a la obtención de AR tipo 4. Se ha demostrado que este tipo de AR presenta mayor resistencia *in vitro* (cuando es tratado con enzimas apropiadas) y mayor estabilidad a pH bajos (Mun & Shin, 2006). Generalmente, el grado de EC que presentan los almidones modificados utilizados como espesantes de los alimentos es muy bajo para producir resistencia a la degradación por las  $\alpha$ -amilasas (Woo & Seib, 2002). Dentro de los agentes formadores de EC que se utilizan para la obtención de AR de grado alimenticio se encuentran: TMFS, TPFS,  $\text{POCl}_3$ , EPI y mezclas de ácido acético anhidro y ácido adípico (Woo & Seib, 2002). Estos compuestos presentan dos o más grupos reactivos polifuncionales los cuales pueden reaccionar con dos o más grupos hidroxilos de las moléculas de almidón (Maningat & Seib, 2013).

Los tratamientos con EC han conducido a la formación de AR a partir de almidones de arroz, trigo, maíz, papa, mandioca, entre otros (Ashwar *et al.*, 2016b). La resistencia a la digestión de los almidones modificados por EC se debería a la presencia de grupos sustituyentes en las moléculas de almidón. Estos grupos evitan la acción de las enzimas y confieren resistencia a los enlaces vecinos. Los EC inhiben el hinchamiento granular y causan impedimento estérico interfiriendo en la unión de la enzima con el sitio activo. Los EC también podrían limitar el ingreso de la enzima  $\alpha$ -amilasa a través de los poros y canales en la superficie de los gránulos (Maningat & Seib, 2013; Woo & Seib, 2002). La fosforilación constituye uno de los métodos frecuentemente usados para la formación de EC. Se utilizan para ello TMFS, TPFS,  $\text{POCl}_3$  o mezclas de TMFS/TPFS. La reacción con TMFS/TPFS se realiza comúnmente a pH alcalino, de 9 a 12, rango en el cual la variación en los niveles de AR es mínima (Sang *et al.*, 2010). Woo & Seib (2002) evaluaron el efecto de diferentes proporciones de TMFS/TPFS y observaron que la relación de 99:1 fue la que condujo a la mayor formación de AR en almidones de trigo.

Las reacciones de fosforilación llevan a la incorporación de fosfatos a las moléculas de almidón. El contenido máximo de fósforo en los almidones modificados de grado alimenticio se encuentra regulado por legislaciones nacionales e internacionales. De acuerdo al Código Alimentario Argentino (2018) ((CAA), Capítulo XVIII, Artículo 1398; 23.1-4G) y al *Code of Federal Regulations* (2010) de los Estados Unidos ((CFR), *Food-Starch Modified, Title 21, Part 172.892*) el contenido máximo de fosfatos, como fósforo permitido en los almidones modificados de grado alimenticio, con la mezcla de TMFS y TPFS de sodio es de 0,4 % y de 0,04 % cuando se utiliza TMFS. En almidones modificados de diferentes orígenes botánicos como trigo, arveja, maíz, papa, trigo céreo y maíz céreo (Sang *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2004; Woo & Seib, 2002) se observó que la utilización de concentraciones de TMFS/TPFS de 12 % incrementó el contenido de fósforo a valores inferiores pero cercanos al límite superior de 0,4 %. Esto indicaría que la concentración de 12 % sería adecuada para modificar los almidones sin exceder el límite máximo permitido (Dupuis *et al.*, 2014).

Shin *et al.* (2004) reportaron valores de AR, medidos por el método 991.43 de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2012), en almidones de trigo, maíz, arroz, papa y maíz de alta amilosa de 72,9 %, 52,2 %, 9,4 %, 99,6 % y 51,2 %, respectivamente. Estos autores emplearon una concentración de TMFS/TPFS (99:1) de

12 %, a pH 11, 45 °C y tiempo de reacción de 3 h. En las mismas condiciones, Koo *et al.* (2010) observaron un contenido de 58,68 % de AR en el almidón de maíz determinado por el método de Englyst *et al.* (1992).

Para la obtención de AR tipo 4 en almidón de trigo se han utilizado condiciones de reacción de EC tales como: 0-20 % de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, relación de TMFS/TPFS de 99:1, rango de pH de 11,5-12,3, temperatura de reacción entre 25-70 °C y tiempo de reacción de 0,5-12 horas. En las condiciones mencionadas se detectó un contenido de fósforo de 0,32-0,35 % y de fibra dietaria total (FDT) de 75,7-88,1 %. En general, se reportaron valores de fósforo de 0,32 %, 0,32 %, 0,34 %, 0,33 % y 0,32 % y contenidos de FDT de 76 %, 80 %, 25 %, 58 % y 73 %, en almidones de trigo, trigo céreo, maíz, maíz céreo y papa, respectivamente (Maningat & Seib, 2013).

Dentro de los escasos informes de almidón de mandioca modificado por la mezcla TMFS/TPFS se encuentra el trabajo realizado por Wongsagonsup *et al.* (2014). Éstos investigadores reportaron un contenido de fósforo de 0,033 % para el almidón de mandioca modificado con 6 % de la mezcla de TMFS/TPFS (99:1) aunque no realizaron determinaciones del contenido de AR.

La utilización de POCl<sub>3</sub>, en concentraciones de 0,5-1,5 %, reduce la susceptibilidad del almidón de papa modificado a la digestión por la enzima pancreatina (Janzen, 1969). Han & BeMiller (2007) reportaron un incremento de AR de 0 % a 12,9 % en el almidón céreo de maíz modificado con 0,08 % de POCl<sub>3</sub>. El límite máximo de POCl<sub>3</sub> permitido para un almidón modificado de grado alimenticio por las legislaciones antes mencionadas es de 0,1 % (p/p).

El uso de EPI, para la obtención de almidones modificación de grado alimenticio, se encuentra regulado por el CAA (2018) siendo la cantidad máxima permitida de 0,3 %. Aunque existe un gran número de reportes de almidones modificados con EPI, en los cuales se estudiaron diversas propiedades, pocos han evaluado la digestibilidad *in vitro* de los almidones obtenidos. Woo & Seib (2002), Aćkar *et al.* (2010) y Jyothi *et al.* (2006) han reportado que el empleo de EPI, en concentraciones en el rango permitido para uso alimentario, no causa un efecto importante en la digestibilidad *in vitro* de los almidones de trigo y mandioca. Sin embargo, concentraciones mayores conducen a una reducción de la digestibilidad. En el almidón de banana se observó una disminución del contenido de AR, por tratamiento con EPI al 0,05 %, con respecto al almidón nativo crudo y luego de un tratamiento de cocción (Carlos-Amaya *et al.*, 2011).

Los AR también pueden ser obtenidos por carboximetilación mediante ácido monocloroacético. Los átomos de cloro y las moléculas intermediarias del reactivo se unen a los grupos hidroxilos libres del almidón a través de uniones éter. Estos grupos de gran tamaño perjudican la acción de las enzimas digestivas. En almidón de papa se obtuvieron valores de 20-20,4 % de AR con grados de sustitución de 0,30-0,32 (Liu *et al.*, 2012). Otras modificaciones químicas que conducen a la formación de AR son oxidación, acetilación e hidroxipropilación. También se han empleado anhídrido succínico y octenil succínico anhídrido (OSA), ácido cítrico o ácidos minerales.

**d) Métodos genéticos:** Un posible método para aumentar la cantidad de AR es incrementar el contenido de amilosa endógeno. Esto es posible mediante: 1) el desarrollo de mutantes portadores de genes para la producción de almidón de alta amilosa o 2) a través de la inhibición de las enzimas que participan en la ramificación del almidón durante la síntesis. El primer método se ha utilizado para incrementar el contenido de amilosa en los almidones de maíz, arveja, cebada y arroz. La inhibición de la expresión de las enzimas, en el segundo método, evita la formación de los puntos de ramificación de la amilopectina y conduce a la formación de mayor cantidad de amilosa (Dupuis *et al.*, 2014). Este último ha sido utilizado exitosamente en almidones de papa, cebada, trigo, arroz y batata (Schwall *et al.*, 2000; Hofvander *et al.*, 2004; Regina *et al.*, 2010, Regina *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2006).

**e) Combinaciones de tratamientos:** Se han aplicado tratamientos combinados o duales a almidones de diferentes orígenes botánicos con el propósito de mejorar las propiedades funcionales y obtener niveles apropiados de AR. Para las modificaciones duales generalmente se han utilizado la combinación de tratamientos químicos y físicos o químicos y enzimáticos.

**Químico/químico:** Han & BeMiller (2007) reportaron incrementos del contenido de AR en el almidón céreo de maíz modificado por la combinación de tratamientos químicos. Estos investigadores utilizaron las combinaciones de los tratamientos de EC-acetilación, EC-hidroxipropilación e hidroxipropilación-EC. Estas combinaciones en presencia de diferentes concentraciones de sales, produjeron valores de AR de 24,2 %, 13,9 % y 25,6 %, respectivamente. Los valores resultaron ser mayores a los hallados por el tratamiento individual de EC con  $\text{POCl}_3$ . En cambio, los autores detectaron una disminución del contenido de AR (comparados con los tratamientos individuales) al emplear las combinaciones de EC-OSA y OSA-EC. Carlos-Amaya *et al.* (2011) observaron niveles de AR de 29,14 % y 25,49 % en el almidón de banana modificado

por la combinación de EC-OSA y OSA-EC, respectivamente. Los mismos se obtuvieron luego de un tratamiento de cocción y fueron mayores a los reportados usando tratamientos individuales de EC con EPI al 0,05 % y OSA. Kittipongpatana & Kittipongpatana (2013) realizaron modificación simultánea de acetilación-EC del almidón de arroz. Para la reacción de EC utilizaron concentraciones de EPI en el rango de 0,1-15 %. Estos investigadores reportaron que con el uso de EPI, a concentraciones permitidas para uso alimentario, se detectó una disminución del contenido de AR comparado con el almidón nativo. Las concentraciones de 5-7,5 % causaron un incremento en el contenido de AR.

Mediante combinaciones de tratamientos hidrotérmicos (ANN, HMT y A-E) y tratamientos hidrotérmicos con químicos (hidrólisis ácida y EC) diversos investigadores han reportado que se logra obtener mayores niveles de AR comparado con los obtenidos por los tratamientos individuales. Además, se ha demostrado que los mismos son estables a la ebullición (Brumovsky & Thompson, 2001; Chung, *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

**Hidrotérmico/hidrotérmico:** En almidones de arroz céreo (Zeng *et al.*, 2015) y maíz (Chung *et al.*, 2009), modificados por ANN, HMT y sus combinaciones ANN-HMT o HMT-ANN, se encontró una disminución del contenido de AR comparado con los respectivos almidones nativos. En cambio en almidones de arveja, lenteja y poroto (*navy bean*) los tratamientos tanto simples como combinados de ANN y el HMT causaron un incremento en el contenido de AR (luego de la cocción). Los cambios más pronunciados se observaron usando tratamientos duales (Chung *et al.*, 2010).

**Hidrotérmico/químico:** Park *et al.* (2018) observaron que al combinar los tratamientos de EC-HMT se produjo un aumento en el contenido de AR en el almidón de maíz céreo crudo y gelatinizado. La secuencia HMT-EC incrementó el contenido de AR en el almidón crudo. Estos autores usaron la mezcla TMFS/TPFS (99:1) para la reacción de EC. El efecto de la combinación de ANN-EC en el almidón de arroz fue estudiado por Song *et al.* (2011). Los mismos reportaron valores máximos de AR de 69,37 %, medido por el método 991.43 de la AOAC (2012), y de 24,16 % medido por el método pancreatina-gravimétrico. El tratamiento de ANN se realizó a partir de una solución de almidón al 50 % a 50 °C y durante 12 h. El tratamiento de EC se efectuó con la mezcla de TMFS/TPFS (99:1) al 12 %, pH 12, a 45 °C y con un contenido de almidón de 40 %. Además, observaron que la hidrólisis con HCl, posterior al tratamiento de ANN-EC, incrementó el contenido de AR medido por ambos métodos. Sin embargo, la aplicación

de sonicación durante el tratamiento de EC no causó un incremento importante en el almidón modificado por ANN-EC.

Para la producción de AR termoestable se ha utilizado la combinación de hidrólisis previa al HMT con ácidos orgánicos tales como: ácido acético, ácido láctico y ácido cítrico. Empleando ácido cítrico se obtuvieron aumentos del contenido de AR a partir del almidón de batata (42,1 %), *yam* (46,4 %) (Hung *et al.*, 2014), mandioca (40,2 %) y papa (39 %) (Van Hung *et al.*, 2017). Estos autores sugieren que los mayores niveles de AR podrían estar relacionados con una mayor cantidad de cadenas cortas originadas por el uso de ácido cítrico, favoreciendo la movilidad de las moléculas y permitiendo un mejor reordenamiento durante el HMT. En el almidón de mandioca se obtuvieron valores de 2,68 % y 9,97 % de AR mediante la combinación de autoclave-hidrólisis ácida empleando 1 ó 10 mmol/L de ácido láctico, respectivamente. Concentraciones más altas de ácido láctico (100 mmol/L) causaron disminución de la cantidad de AR. Los valores máximos se obtuvieron a los 45 min de tratamiento de autoclave. Luego, los valores de AR descendieron. Los valores bajos de AR obtenidos se deberían a que los polímeros generados a partir de las moléculas de almidón no resultaron tener un tamaño suficiente para formar cristalitas resistentes a la acción de las enzimas (Onyango *et al.*, 2006). Cuando el grado de polimerización es menor a 100 ocurre una menor cristalización (Eerlingen *et al.*, 1993). Brumovsky & Thompson (2001) utilizaron ácido clorhídrico para la hidrólisis previa al HMT o ANN. Estos investigadores reportaron que en el almidón de maíz de alta amilosa la combinación de tales tratamientos incrementó el contenido de AR estable a la ebullición comparado con los tratamientos individuales de ANN y el HMT. El mayor incremento se presentó con la combinación hidrólisis-HMT con la que obtuvieron un valor máximo de 63,2 % de AR. Estos investigadores sugieren que la hidrólisis ácida afecta principalmente las regiones amorfas del gránulo lo cual otorga mayor movilidad a las cadenas y contribuye a la formación y a la asociación de dobles hélices. Esto lleva consecuentemente a la obtención de una estructura más ordenada. La combinación hidrólisis-HMT favorecería en mayor proporción a la formación de estructuras estables a 100 °C en presencia de exceso de agua. Mediante la aplicación de ciclos de AE y EC con ácido adípico o con TMFS/TPFS (99:1) en el almidón de maíz, se incrementó el contenido de AR en un 13,11 % (13,8 %) y 154 % (31,0 %) respectivamente con referencia al tratamiento de AE (12,2 %). Esto indicaría que el almidón modificado por AE-EC con ácido adípico presenta menor estabilidad al ataque enzimático que la combinación AE-EC con

TMFS/TPFS (Kim *et al.*, 2010). Shin *et al.* (2004) reportaron que la combinación de hidrólisis parcial-AE-HMT consiste en una metodología apropiada para incrementar el contenido de AR en almidones de tubérculos. Estos investigadores trabajaron con almidón de papa y batata utilizando HCl para la hidrólisis. Si bien en ambos almidones detectaron incrementos importantes, el almidón de batata fue el que presentó mayores valores de AR.

#### **2.6.4. Métodos para la determinación de almidón resistente**

##### **2.6.4.1. Métodos *in vivo***

Se han desarrollado diferentes métodos para el análisis de AR *in vivo*. Entre ellos, se encuentran el test de hidrógeno espirado, análisis del contenido del ileum de pacientes con ileostomía y de individuos sanos con tubos triples (intubación). También se han utilizado modelos animales, como ratas tratadas con antibióticos, en las cuales se determina el contenido de AR en la materia fecal o mediante el marcado con  $^{14}\text{C}$  o  $^{13}\text{C}$  (en cerdos). La metodología más utilizado, aunque no perfecta, consiste en evaluar el almidón no digerido al final de ileum en modelos humanos sanos con ileostomía (McCleary, 2013). Este método resulta dificultoso de realizar debido a que es muy lento, laborioso, costoso, sujeto a cuestiones éticas y requiere una gran experiencia (Bird *et al.*, 2009; Iacovou *et al.*, 2017). Se ha observado que los hábitos de masticación de los alimentos influyen en las cantidades de AR presentes en el colon luego del consumo (Englyst *et al.* 1992). Además, la digestión se produce mediante la participación de enzimas endógenas las cuales dependerán del individuo. Otros factores que pueden afectar las determinaciones son la presencia de inhibidores de enzimas en los alimentos, la viscosidad y las proteínas endógenas (Dupuis *et al.*, 2014).

##### **2.6.4.2. Métodos *in vitro***

Para la determinación *in vitro* de AR total o un tipo específico de AR (AR tipo 1, 2, 3 y 4) se han desarrollado diversos métodos que intentan reproducir la digestión gastrointestinal. Las técnicas difieren en la preparación de las muestras (homogenización, masticación, molienda, etc.), los tipos de enzimas y las condiciones experimentales utilizadas (tiempo de incubación, pH, etc.) (Ashwar *et al.*, 2016b). Estas diferencias causan que los niveles de AR detectados varíen de acuerdo a la metodología empleada (Perera *et al.*, 2010). Actualmente no existe un método específico universal para la determinación de AR (Ashwar *et al.*, 2016b). Las metodologías se hallan aún en

desarrollo. Recientemente, Shi *et al.* (2019) y Shukri *et al.* (2015) han propuesto técnicas para medir en forma directa AR en almidones modificados por EC (fosforados). En general, los métodos utilizados tratan de imitar las condiciones fisiológicas mediante la molienda de la muestra (equivalente a la masticación), la separación del almidón que ha sido hidrolizado enzimáticamente y la utilización de una temperatura de incubación similar a la corporal (Lockyer & Nugent, 2017). Generalmente, la hidrólisis enzimática se combina con la hidrólisis química o separación gravimétrica para cuantificar el almidón no digerido (Perera *et al.*, 2010). La cuantificación de AR *in vitro* se torna dificultosa debido a que la resistencia está asociada a barreras físicas que impiden la digestión por la  $\alpha$ -amilasa y que pueden ser alteradas durante el proceso de digestión *in vitro* (Shukri *et al.*, 2015).

**Método de Englyst *et al.* (1982):** Englyst *et al.* (1982) fueron los pioneros en proponer un método para la determinación de AR. El mismo consiste en separar al AR y a otros polisacáridos diferentes del almidón, del almidón hidrolizado por enzimas. El protocolo utilizado indicaría que solamente se cuantifica AR tipo 3. El método tiene etapas de homogenización y de ebullición en las cuales se eliminarían los AR tipo 1 y 2. La hidrólisis se realiza utilizando  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y amiloglucosidasa durante 16 h a 40 °C. El almidón no hidrolizado es precipitado con etanol absoluto y el pellet es lavado con etanol 80 %. El residuo es secado con acetona y posteriormente solubilizado con hidróxido de potasio a temperatura ambiente. Una porción del almidón solubilizado es hidrolizado con amiloglucosidasa en presencia de ácido acético a 65 °C durante 1 h. Luego se enfría, se centrifuga y se determina el contenido de glucosa (como AR tipo 3) en el sobrenadante, por cromatografía líquida-gaseosa.

**Método de Berry (1986):** Berry (1986) desarrolló una metodología para medir AR mediante el agregado de la mezcla  $\alpha$ -amilasa/pululanasa al método utilizado por Englyst *et al.* (1982). Además, propuso una mejor imitación a las condiciones fisiológicas que consistió en no realizar el calentamiento inicial a 100 °C.

**Método de Englyst *et al.* (1992):** El método de Englyst *et al.* (1982) fue modificado por Englyst *et al.* (1992) con el objeto de aproximarse mejor a las condiciones fisiológicas. La hidrólisis enzimática se realizó a una temperatura de 37 °C y no a 40 °C y, en lugar de determinar el contenido de AR luego de una digestión prolongada por 16 h, se evalúan alícuotas a los 20 min y 120 min luego de iniciada la digestión. Esto permite la diferenciación entre las fracciones de ADR, ADL y AR. Además, se agregó goma guar (para aumentar la viscosidad), perlas de vidrio (para un apropiado mezclado

y ruptura de las células durante la digestión) y se empleó un movimiento longitudinal (para simular el movimiento peristáltico del intestino). Para la digestión se empleó una mezcla de pancreatina, amiloglucosidasa e invertasa. El almidón digerido a los 20 min representa al ADR, el digerido entre los 20 min y 120 min representa al ADL y el almidón que no es digerido a los 120 min corresponde al AR. Esto permite una estimación del grado de hidrólisis a través del tránsito por el tracto digestivo. Los AR tipo 2 no serían hidrolizados por la  $\alpha$ -amilasa debido a que la máxima temperatura alcanzada es de 37 °C, la cual se halla por debajo de la temperatura de gelatinización. La medición de AR mediante esta técnica comprende los AR tipo 1, 2 y 3.

**Método de Goñi *et al.* (1996):** Goñi *et al.* (1996) introdujeron modificaciones en la metodología propuesta por Berry (1986) y Englyst *et al.* (1992). Las mismas consistieron en utilizar un pH de 1,5 para imitar el pH gástrico y la enzima pepsina durante 1 h a 40 °C para remover las proteínas. Posteriormente, el pH es llevado a 6,9 para lograr condiciones similares a las del intestino delgado. Para la hidrólisis no se emplea una mezcla de enzimas sino la  $\alpha$ -amilasa pancreática a 37 °C durante 16 h simulando el tiempo de tránsito intestinal. En el valor de AR determinado por esta metodología no se incluye al AR tipo 1 debido a las etapas de molienda y homogeneizado. Este abarcaría el contenido de AR tipo 2 de alimentos crudos, ya que la máxima temperatura alcanzada es de 40 °C, y al AR tipo 3. Se utiliza un ensayo colorimétrico para determinar el contenido de glucosa.

Otros métodos que también derivan de los antes mencionados son los empleados por Faisant *et al.* (1995), Akerberg *et al.* (1998), Champ (1992) y Chung *et al.* (2006). En general, las modificaciones abarcan cambios en los tipos y las concentraciones de las enzimas, la preparación de las muestras, el pH y el agregado o no de etanol luego de la digestión (Perera *et al.*, 2010).

**Método 32-40.01 de la AACC (*American Association of Cereal Chemistry*) y método AOAC 2002.02:** El método 32-40.01 de la AACC y el 2002.02 de la AOAC (método de McCleary & Monaghan, 2002) son idénticos, frecuentemente utilizados para la determinación de AR en alimentos y muestras de almidón crudo. Estos ensayos pueden realizarse mediante el empleo del kit Megazyme® (Megazyme 2018). Ambos derivan de otros métodos como el de Goñi *et al.* (1996) y el de Englyst *et al.* (1982). La muestra empleada en estas técnicas es molida en forma gruesa por lo que permiten la cuantificación del AR tipo 1. Además, la muestra no es sometida a ebullición. Se emplea una mezcla de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa en la etapa de

hidrólisis y solubilización de los almidones no resistentes. Esta se realiza a 37 °C durante 16 h por lo que los AR tipo 2 no serían hidrolizados. La hidrólisis del residuo insoluble con amiloglucosidasa se realiza a 50 °C durante 30 min en lugar de 1 h a 65 °C (condiciones utilizadas por Englyst *et al.* (1982)). El contenido de glucosa se determina colorimétricamente. En contraste con el método de Englyst *et al.* (1992), no diferencian ADL y ADR.

**Método 985.29 de la AOAC y 991.43 de la AOAC para FDT:** Los métodos 985.29 y 991.43 de la AOAC para FDT han sido ampliamente utilizados para medir AR. Los mismos pueden ser realizados por los Kits para FDT de Sigma® (TDF-100A)<sup>3</sup> y de Megazyme® (Megazyme, 2017). Estas metodologías resultan adecuadas para cuantificar AR en muestras que no presentan otras fibras porque ello llevaría a una sobrevaluación del contenido de AR. Los métodos 985.29 y 991.43 de la AOAC combinan técnicas enzimáticas y gravimétricas. En el método 985.29 las muestras son sometidas a ebullición en presencia de  $\alpha$ -amilasa termoestable, luego son tratadas con proteasa y amiloglucosidasa. Mediante el agregado de etanol se precipita la fibra insoluble. El precipitado se filtra, se lava con etanol y acetona y se seca. Se evalúa además el contenido de proteínas y de cenizas a una parte del residuo. El contenido de AR se determina como el peso del residuo remanente luego de la hidrólisis, el lavado y el secado menos el peso de las proteínas y de las cenizas y se expresa en porcentaje en base seca.

Debido a que el almidón se consume frecuentemente luego de un tratamiento de cocción, ciertos investigadores (Li *et al.*, 2008) sostienen que el método 991.43 de la AOAC, y por lo tanto el 985.29, evaluarían de un modo certero el contenido de AR presente en el alimento en la forma en que éste es consumido habitualmente. Estos investigadores sugieren que dichos métodos deberían ser empleadas en reemplazo de otros como el de Englyst *et al.* (1992) o el de la AOAC 2002.02/AACC 32-40.01. La metodología de Englyst *et al.* (1992) ha sido empleado por diversos investigadores para evaluar el contenido de AR en alimentos procesados y en los denominados “alimentos listos para comer” (*ready to eat*). El método de la AOAC 2002.02/AACC 32-40.01 ha sido utilizado para determinar el contenido de AR en el almidón crudo o en materiales de origen vegetal. En los procedimientos 985.29 y 991.43 de la AOAC el tratamiento

---

<sup>3</sup>[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/tdf100a\\_tdfc10\\_a.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/tdf100a_tdfc10_a.pdf) (Fecha de consulta 19/02/2019)

térmico realizado a 95 °C permitiría una adecuada actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa termoestable y gelatinización del almidón. Esto representaría la condición en que el almidón es mayormente ingerido por los consumidores (Dupuis *et al.*, 2014). Li *et al.* (2008) sostienen que la determinación de AR en una muestra sin haberse realizado un tratamiento de cocción no sería significativa y sería engañosa. En la técnica de la AOAC 2002.02/AACC 32-40.01 la hidrólisis se efectúa a 37 °C. La misma no resulta suficientemente alta para gelatinizar al almidón. Esta situación suele salvarse mediante un tratamiento de cocción previo a la determinación de AR (Dupuis *et al.*, 2014). Se han observado diferencias en el contenido de AR en muestras crudas y cocidas (gelatinizadas). Englyst & Cumming (1987) reportaron una disminución de aproximadamente 95 % del contenido de AR en el almidón de papa sometido a cocción en agua a ebullición con respecto al almidón de papa crudo (Li *et al.*, 2008).

Se ha reportado que los valores de FD en alimentos, evaluados por el método 985.29 de la AOAC al abarcar lignina y AR, resultan más elevados que los obtenidos por el de Englyst & Hudson (1996). La AOAC, entre otras autoridades, no incluyó al método de Englyst & Hudson (1996) como estándar para la determinación de FD. No obstante algunos países, entre ellos Reino Unido, han utilizado los valores de FD obtenidos por este último para la elaboración de la base de datos de composición de alimentos (Westenbrink *et al.*, 2013).

Los métodos 985.29 y 991.43 de la AOAC han sido utilizados ampliamente para la evaluación *in vitro* de FD en los alimentos (DeVries, 2010; Maningat *et al.*, 2013). Las recomendaciones de la ingesta de FD tienen como base los reportes de estudios en los que han empleado los métodos clásicos de la AOAC 985.29 y 991.43. En los mismos, se detecta a la fracción denominada HMWDF incluyendo los AR (entre otras fracciones de los carbohidratos de la FD) (Westenbrink *et al.*, 2013).

La metodología 985.29 de la AOAC es equivalente al de la AACC 32-05.01. Ambos constituyen los métodos oficialmente aprobados del original de Prosky (Maningat *et al.*, 2013). En la técnica de la AOAC 985.29 no se realiza diferenciación entre las fracciones solubles e insolubles de HMWDF. El contenido de HMWDF se determina como la suma de las dos fracciones. Es importante diferenciar ambas fracciones de HMWDF debido a que presentan diferentes efectos fisiológicos. Esto llevó a una modificación del procedimiento de Prosky, el cual recibió el nombre de método de Lee (Lee *et al.*, 1992), y fue incluido como los métodos aprobados de la AOAC 991.43 y de la AACC 32.07.01. La técnica de Prosky fue adoptada por la *Food*

*and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos como oficial para la determinación de FD para el rotulado en alimentos en los años 90 (DeVries *et al.*, 1999; Gordon, 2007).

Otras metodologías se han desarrollado para medir FD, incluyendo la medición de AR, como la de McCleary (McCleary, 2007). Ésta representa una manera integrada de medición de FD que permitiría medir ciertas fracciones de los componentes de la FD que escapan a los métodos de Prosky y de Lee. La técnica de McCleary se ha convertido en los métodos aprobados 32-45.01 de la AACC y 2009.01 de la AOAC para la medición de FDT. Los métodos 32-50.01 de la AACC y 2011.25 de la AOAC derivan de los anteriores y permiten diferenciar FD soluble, insoluble y FDT. Estos representarían una alternativa para la medición de AR. El surgimiento de nuevas metodologías pone en evidencia que aún no existe una perfecta que abarque todas las situaciones.

Actualmente los métodos 991.43 y 2009.01 de la AOAC y los correspondientes equivalentes aprobados por la AACC forman parte de los métodos clasificados como tipo I de acuerdo al *Codex Alimentarius*, considerados como técnicas generales de definición (Zielinski *et al.*, 2013).

Maningat *et al.* (2013) observaron que los niveles de AR tipo 4 (modificado por EC) y AR tipo 5 (complejo de amilosa con ácido esteárico), evaluados en almidones de trigo y mandioca modificados, presentaron valores más elevados cuando fueron determinados por el método 991.43 de la AOAC/32-07.01 de la AACC que cuando fueron evaluados por el 2009.01 de la AOAC/32-45.01 de la AACC. Esto sugiere que el último desestima los niveles de AR probablemente debido al procedimiento agresivo de digestión. Entonces, se sugiere que el método 991.43 de la AOAC/32-07.01 es apropiado para cuantificar AR obtenido por EC.

Los valores de AR determinados en los alimentos mediante metodologías *in vitro* dependen de la utilizada. De acuerdo a Zielinski *et al.* (2013), el empleo de un único método de dosaje de FD no sería perfecto para abarcar todas las situaciones y tipos de productos. Resulta entonces difícil recomendar uno en particular que cubra todos los tipos de AR. Para conocer el contenido de FDT en un alimento fortificado con AR se necesita por lo tanto conocer el tipo de AR agregado para seleccionar un método de evaluación apropiado (Maningat *et al.*, 2013).

### **2.6.5. Propiedades funcionales de los almidones resistentes**

Los AR presentan propiedades funcionales únicas a través de las cuales aportan características especiales de alta calidad a los alimentos. Tales características no podrían obtenerse mediante el empleo de las fibras tradicionales (Baixauli *et al.*, 2008; Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Además, al ser partículas de pequeño tamaño y presentar un color blanco y tener un sabor suave, resultan muy apropiados para la elaboración de una gran variedad de alimentos lácteos, horneados y pastas (Lobato-Calleros *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2013; Aravind *et al.* 2013). Comparados con las fibras tradicionales, los AR otorgan a los alimentos una mejor apariencia, textura y palatabilidad, mejoran la expansión y la crocancia en algunos alimentos (Yue & Waring, 1998), reducen la absorción de aceite en alimentos sometidos a fritura (Homayouni *et al.*, 2014), entre otras. Dentro de las propiedades funcionales que presentan los AR se encuentran hinchamiento, incremento de la viscosidad, aumento de la temperatura de gelificación y baja capacidad de retención de agua (Fausto *et al.*, 1997), entre otras. Además, pueden ser solubles o insolubles en agua (Homayouni *et al.*, 2014). Algunos AR permitirían el reemplazo de las harinas en proporciones 1 en 1 sin que se produzcan cambios importantes en el manejo de la masa o reología (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Los AR tienen un menor efecto en las propiedades sensoriales en comparación con las fibras como las de los granos enteros, del salvado o las fibras de las frutas lo cual favorece la aceptabilidad de los consumidores (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010). Debido a su reducido aporte en calorías (1,6-2,8 Kcal/g), los AR pueden ser utilizados para proveer fibras a alimentos formulados con bajo contenido de grasas y azúcares. Además, al presentar baja capacidad de retención de agua, resultan muy apropiados para la elaboración de alimentos de humedad baja e intermedia. Esto permitiría mejorar el tiempo de vida útil de alimentos secos y evitar la formación de cristales de hielo en productos congelados (Raigond *et al.*, 2015).

### **2.6.6. Usos de los almidones resistentes en alimentos**

Los AR han despertado el interés en el área de la nutrición y en la industria de alimentos debido a sus potenciales efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y a sus propiedades funcionales (propiedades físicas y estabilidad durante el procesamiento) (Raigond *et al.*, 2015). Las propiedades nutricionales están relacionadas a la resistencia a la digestión en el intestino delgado o a la resistencia a la fermentación en el colon. Las propiedades físicas contribuirían a las características físicas de los alimentos (por

ejemplo: textura, capacidad de retención de agua, etc.). Para conservar las propiedades nutricionales de los AR es necesario que estos mantengan la estabilidad durante el procesamiento (Thompson, 2000). Se ha observado que ciertos AR tipo 2, 3 y 4 presentan estabilidad morfológica y estructural a temperaturas entre 35-80 °C (Ratnayake & Jackson, 2008). No todos los AR resultan apropiados para la elaboración de alimentos debido a que algunos pueden ser deteriorados durante el procesamiento tales como los AR tipo 1 y 2 (Lockyer *et al.*, 2017).

Como los AR se encuentran presentes naturalmente en alimentos que contienen almidones se puede fortificar a los alimentos con AR con el fin de obtener un alimento funcional. Actualmente, los alimentos fortificados con AR han adquirido importancia y aceptación por los consumidores siendo su principal propósito aumentar el consumo de FD (Buttriss & Stokes, 2008). El primer alimento fortificado con AR se comercializó durante los años 1990 en Australia (Roberts *et al.*, 2004).

Los AR se han utilizado para la fortificación de alimentos tales como quesos, helados, yogurt, postres lácteos, pastas, panes, copos de maíz, bizcochuelos, entre otros. Debido a que los AR presentan diferentes propiedades fisiológicas y tecnológicas se debe realizar una apropiada selección del tipo de AR a utilizar en la elaboración de un alimento en particular (Homayouni *et al.*, 2014). Pueden ser utilizados para la elaboración de alimentos reducidos en grasas y bajos en calorías tales como aderezos, salsas (Mun & Shin, 2006), productos panificados (Haynes *et al.*, 2000) y para la microencapsulación de probióticos en alimentos lácteos (Vandamme *et al.*, 2016) y de aceite de pescado para aumentar la estabilidad a la oxidación (Nasrin & Anal, 2015).

La cantidad de harina a reemplazar depende del tipo de AR, de la aplicación, de los niveles de fibra que se espera alcanzar y de la función que se desea declarar. Se han reportado reemplazos de harina con AR de entre 10 % hasta 40 % (Ashwar *et al.*, 2016b). Vernaza *et al.* (2011) observaron que el agregado de harina de banana verde en la preparación de fideos produce una masa débil y fideos de menor firmeza debido a la dilución del gluten. Panes fortificados con 40 % de AR desarrollaron mayor volumen y mejor estructura en comparación con las fibras tradicionales (Baghurst *et al.*, 1996). El uso de 15 % de AR en pastas secas no causó un efecto negativo en el manejo de la masa y proceso de extrusión y presentó características similares a la pasta control. En bebidas opacas, los AR pueden reemplazar a las fibras insolubles (Sajilata *et al.*, 2006). Los AR tipo 4 se han empleado en la preparación de alimentos en los cuales se pretende mayor suavidad y fluidez y exposición a elevadas temperaturas y a bajo pH durante el

almacenamiento (Sajilata & Singhal, 2005). En general, los AR pueden ser utilizados en: a) alimentos horneados reemplazando otras fibras dietarias debido a que sus partículas finas y sabor suave hacen posible la formulación de productos con mejor aceptabilidad y palatabilidad, b) alimentos reducidos en grasas, c) en la industria de productos nutraceúticos para la formulación de alimentos para diabéticos y personas con problemas de sobrepeso.

### **2.6.7. Ingesta recomendada de almidón resistente**

Los AR pueden estar presentes naturalmente en los alimentos que tienen almidón. Se observó que la mayoría de los procesos convencionales de elaboración de alimentos disminuye su contenido de AR (Dupuis *et al.*, 2014) y que la mayoría de los productos comerciales tienen menos de 5 % de AR por porción (Alsaffar, 2011). Para conseguir los efectos fisiológicos beneficiosos de los AR, se estima que el 10-20 % de la ingesta diaria de carbohidratos debería estar bajo la forma de AR (Dupuis *et al.*, 2014). Se recomienda la ingesta de aproximadamente 15-20 g por día de AR (Murphy *et al.*, 2008; Ashwar *et al.*, 2016b; CSIRO, 2019). A nivel mundial, la ingesta de AR varía ampliamente encontrándose entre 2,76 a 40 g por día (Sajilata *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008; Ashwar *et al.*, 2016b; Baghurst & Baghurst, 2001; Murphy *et al.*, 2008).

Los almidones nativos, blanqueados y modificados por tratamiento ácido, alcalino, físico y modificados por enzimas hidrolíticas son considerados ingredientes normales de alimentos antes que aditivos (*European Parliament*, 2008 – *Regulation 1333/2008*). Un tipo de almidón modificado químicamente por EC (AR tipo 4), denominado fosfato de di-almidón, es considerado seguro y no alergénico. El mismo fue evaluado en cantidades menores al 15 % (Lockyer *et al.*, 2017). De acuerdo al CFR (2010), al ser seguro no existe limitación en cuanto a la cantidad de su uso cuando son elaborados bajo buenas prácticas de manufactura. No se han informado efectos adversos en humanos asociados al consumo de alimentos con alto contenido de fósforo (*Institute of Medicine of de Nacional Academic (IOM)*, 1997). La Junta del Comité de Expertos de Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS sugiere que los almidones fosfatados son adecuados para su uso en alimentos sin la necesidad de especificar una recomendación de la ingesta diaria (OMS 1974; OMS 1972).

### **2.6.8. Perspectiva del almidón resistente como alimento funcional**

Actualmente existe una creciente demanda e interés por los llamados alimentos funcionales. Los mismos, además de cumplir con sus funciones nutricionales básicas, proveen beneficios fisiológicos y/o reducen el riesgo de enfermedades crónicas. Esto incentiva a la industria de alimentos a la investigación para el desarrollo de nuevas tecnologías y de ingredientes con el objeto de obtener productos con efectos beneficiosos para la salud, seguros y con buenas propiedades organolépticas (Raigond *et al.*, 2015). Dupuis *et al.* (2014) sostienen que, al estar el consumo de AR asociado a efectos beneficiosos para la salud, es necesario el desarrollo de métodos destinados a incrementar su contenido en los almidones utilizados en alimentos. Los AR, al ser alimentos naturales y que aportan escasas calorías, se han convertido en un recurso prometedor debido a sus propiedades beneficiosas para la salud tales como efecto laxante y capacidad para disminuir el colesterol y la glucemia. Debido a que la mayoría de los procesos alimentarios reducen los niveles de AR existe una tendencia a la incorporación de los mismos en los alimentos procesados. Los AR pueden constituir una fuente importante de FD en países en desarrollo donde se consumen importantes cantidades de alimentos procesados (Raigond *et al.*, 2015).

Muchos estudios se avocaron a la producción a AR a partir de diferentes orígenes botánicos empleando diversos métodos y reactivos. Los tratamientos hidrotérmicos resultan muy prometedores ya que sus productos son considerados más saludables debido a que no son modificados químicamente. Actualmente, los mismos presentan un creciente interés debido a sus posibles aplicaciones en la industria de alimentos ya sea solos o combinados con otros tipos de modificaciones. Resulta muy atrayente estudiar el efecto de los tratamientos hidrotérmicos con otras modificaciones físicas o químicas (Zavareze *et al.*, 2011). Son escasos los estudios empleando combinaciones de tratamientos físicos (hidrotérmicos) y químicos para la obtención de AR.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se aspiró, mediante la combinación de tratamientos hidrotérmicos y químicos, a obtener concentraciones adecuadas de AR estable a la ebullición y evaluar sus propiedades fisicoquímicas para asociarlo con un potencial uso como ingrediente funcional en alimentos. Su uso podría permitir la elaboración de alimentos con FD para aumentar su ingesta. Esto es debido a que el consumo de FD se encuentra generalmente por debajo de los valores recomendados.

---

# CAPITULO 3

---

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Materia prima

Se utilizó AN comercial (*Manihot esculenta* Crantz) producido por la Cooperativa Agrícola Mixta de Montecarlo LTDA, Montecarlo, Misiones, Argentina. La composición química se presenta en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Composición química del almidón de mandioca nativo (Cooperativa Agrícola Mixta de Montecarlo LTDA, Montecarlo, Misiones, Argentina).

Componentes	g % base húmeda
Humedad	11,60
Proteína bruta (N x 5,75)	0,75
Grasas	0,10
Fibra alimentaria	0,40*
Cenizas	0,08
Carbohidratos totales (por diferencia)	87,07

Fuente: Fundación para el Desarrollo de la Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT). \* Método 991.43 de la *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC).

#### 3.2. MÉTODOS

##### 3.2.1. Almidón de mandioca modificado por tratamiento hidrotérmico o químico

###### 3.2.1.1. Modificación del almidón por tratamiento de ANN

Para la modificación del almidón por el tratamiento hidrotérmico de ANN se empleó el método de Brumovsky & Thompson (2001) con ligeras modificaciones. Se preparó una suspensión de AN en agua destilada al 30 % en base seca (p/p) en una botella de vidrio de 500 mL con tapa a rosca (Duran *glass bottle*, Schott, Alemania) y se la llevó a estufa de convección natural a  $45$  ó  $50 \pm 1$  °C (Dalvo Instrumentos®, MCZ-2, Argentina) durante 24 ó 48 h. Luego, la muestra se filtró con papel de filtro (Whatman® Nro. 1) en embudo de Büchner, se lavó con agua destilada con aproximadamente el mismo volumen de agua empleado para la suspensión. Posteriormente, el retenido fue secado en estufa de convección natural a  $50 \pm 1$  °C durante 48 horas, molido (molino Chincan®, FW 100, China) y tamizado en un tamizador (Zonytest®, LR2006,

Argentina) con tamiz de malla Nro. 100 de 149  $\mu\text{m}$  de abertura y reservado en bolsas herméticas para ensayos posteriores.

Las experiencias se realizaron a partir de un diseño experimental completo de dos factores a dos niveles. Se evaluó el efecto, en el contenido de FDT, de la temperatura a los niveles de 45 y 50 °C y del tiempo de reacción a los niveles de 24 y 48 h en condiciones de 70 % de humedad. En los almidones resultantes de las experiencias se determinó el contenido de FDT. Se efectuaron 4 experiencias con dos repeticiones.

### **3.2.1.2. Modificación del almidón por el HMT**

Los almidones modificados fueron preparados utilizando el método empleado por Brumovsky *et al.* (2009). Se humedeció inicialmente el AN con agua destilada de manera de lograr un contenido de humedad del 20 % (p/p base húmeda). Se mezcló y colocó el almidón en una botella de vidrio de 500 mL con tapa a rosca (Duran *glass bottle*, Schott, Alemania). La botella con la muestra se mantuvo a temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C) durante 72 horas para permitir una distribución homogénea de la humedad en el interior del gránulo. Luego se realizó el tratamiento térmico colocando la botella en estufa de convección natural a 90 ó 105  $\pm 1$  °C (Dalvo Instrumentos®, BHR/I, Argentina) por períodos de 60 ó 120 minutos y 5 ó 10 h. Luego del tratamiento, la botella de vidrio fue sumergida en un baño de hielo durante 5 min. La muestra fue retirada del interior de las botellas y secada en estufa de convección natural a 50  $\pm 1$  °C (Dalvo Instrumentos®, MCZ-2, Argentina) durante 48 h. La muestra obtenida fue molida (molino Chincan®, FW 100, China), tamizada en un tamizador (Zonytest®, LR2006, Argentina) con tamiz de malla Nro. 100 de 149  $\mu\text{m}$  de abertura y reservada para ensayos posteriores en bolsas herméticas. Se realizaron dos repeticiones de los ensayos.

Las experiencias se realizaron a partir de dos diseños experimentales completos de dos factores a dos niveles. Los factores evaluados fueron temperatura y tiempo de reacción. En el primer diseño los niveles de temperatura fueron 90 ó 105 °C y los niveles de tiempo de reacción fueron 60 ó 120 min. En el segundo diseño se emplearon los mismos los niveles de temperatura del primer diseño (90 ó 105 °C) y se aumentó el tiempo de reacción a 5 ó 10 h. En ambos diseños se mantuvo la humedad al 20 %. En los almidones resultantes de las experiencias se determinó el contenido de FDT. Se efectuaron para cada diseño 4 experiencias con dos repeticiones.

### **3.2.1.3. Modificación del almidón por el OPT**

La modificación del AN se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Pukkahuta *et al.* (2007) con ligeras modificaciones. Se suspendieron 100 g de AN (base seca) en 200 mL de una solución saturada de sulfato de sodio (Cicarelli®, Argentina) preparada con 100 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 200 mL de agua destilada. Se colocó la suspensión en una botella de vidrio de 500 mL con tapa a rosca (Duran *glass bottle*, Schott, Alemania) y se calentó en estufa de convección natural a 90, 105, 110 ó 115 ± 1 °C (Dalvo Instrumentos®, BHR/I, Argentina) durante 60 ó 120 min. Se colocó la botella, luego de retirarla de la estufa, en un baño María invertido y se la enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo la muestra de la botella, se lavó con agua destilada (8 a 10 veces con 500 mL) y se filtró con papel de filtro (Whatman® Nro. 1) en embudo de Büchner. Se testeó la presencia de residuo de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la muestra mediante la precipitación con BaCl<sub>2</sub> al 20 % (Cicarelli®, Argentina) en el filtrado. Luego del secado en estufa de aire a convección natural a 50 ± 1 °C (Dalvo Instrumentos®, MCZ-2, Argentina) durante 48 h, la muestra fue molida (molino Chincan®, FW 100, China), tamizada en un tamizador (Zonytest®, LR2006, Argentina) con tamiz de malla Nro. 100 de 149 µm de abertura y reservada para ensayos posteriores en bolsas herméticas.

Las experiencias se realizaron a partir de dos diseños experimentales completos de dos factores a dos niveles. Los factores evaluados fueron temperatura y tiempo de reacción. En el primer diseño los niveles de temperatura fueron 90 ó 105 °C y los niveles de tiempo de reacción fueron 60 ó 120 min. En el segundo diseño se aumentó la temperatura empleándose los niveles de 110 ó 115 °C y se utilizaron los mismos niveles de tiempo de reacción que en el primer diseño (60 ó 120 min). En ambos diseños se utilizó idéntica cantidad de sólidos (almidón). Se determinó el contenido de FDT en los almidones resultantes de las experiencias. Se efectuaron para cada diseño 4 experiencias con dos repeticiones.

### **3.2.1.4. Modificación del almidón por el tratamiento de EC con EPI**

La modificación del AN por el tratamiento químico de EC con EPI (EC EPI) se realizó en base a la metodología empleada por Gall *et al.* (1975), con algunas modificaciones. Para ello se suspendieron 100 partes de AN en base seca en 150 partes de agua destilada. Se ajustó el pH a 11,0 con una solución de NaOH al 2 % (Biopack®, Argentina). Se agregó una solución alcalina (NaOH al 0,8 %) de EPI (Merck®, Alemania) en concentraciones de 0,15 ó 0,30 % (p/v) en forma lenta con agitación

constante mediante un agitador magnético (agitador magnético a temperatura constante, Arcano®, 78HW-1, Argentina). La reacción se mantuvo durante 4, 8, 12 ó 24 h a  $30 \pm 1$  °C con agitación constante. Luego se detuvo la reacción mediante el ajuste del pH a 6,5 a través del agregado de una solución de HCl 0,5 N (Anhedra®, Argentina). La muestra se filtró con papel de filtro (Whatman® Nro.1) en embudo de Büchner y se lavó dos veces con volúmenes de 350 mL de agua destilada. La misma fue secada en estufa de convección natural a  $50 \pm 1$  °C (Dalvo Instrumentos®, MCZ-2, Argentina) durante 48 h, molida (molino Chincan®, FW 100, China), tamizada en un tamizador (Zonytest®, LR2006, Argentina) con tamiz de malla Nro. 100 de 149  $\mu\text{m}$  de abertura y reservada para ensayos posteriores en bolsas herméticas.

Las experiencias se realizaron a partir de dos diseños experimentales completos de dos factores a dos niveles. Los factores evaluados fueron concentración de EPI y tiempo de reacción. En el primer diseño los niveles de concentración de EPI fueron 0,15 ó 0,30 % y los niveles de tiempo de reacción fueron de 4 u 8 h. En el segundo diseño se mantuvo la concentración de EPI empleándose los mismos niveles que en el primer diseño (0,15 ó 0,30 %) y se aumentaron los niveles de tiempo de reacción a 12 ó 24 h. En ambos diseños permanecieron invariables las condiciones de pH 11,0 y temperatura de reacción de 30 °C. En los almidones resultantes de las experiencias se determinó el contenido de FDT. Se efectuaron para cada diseño 4 experiencias con dos repeticiones.

### **3.2.1.5. Modificación del almidón por el tratamiento de EC con TMFS/TPFS**

La modificación del AN por EC con la mezcla de TMFS/TPFS (EC T/T) se realizó en base a la metodología empleada por Woo & Seib (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se suspendió el AN en agua destilada con el objeto de obtener concentraciones de sólidos (almidón) en el rango de 33,96-41,04 % (p/p). Se agregaron mezclas de TMFS/TPFS (Sigma Aldrich®, Estados Unidos) en relación 99:1 (p/p) a concentraciones en el rango de 7,17-15 % en base al peso seco del almidón. Se ajustó el pH a 11,0 (pHmetro Orion®, A230 con electrodo de vidrio, Estados Unidos) con una solución de NaOH al 2 % (Biopack®, Argentina). Esta se agregó en forma lenta con agitación constante mediante agitador magnético (agitador magnético a temperatura constante, Arcano®, 78HW-1, Argentina). Las suspensiones se mantuvieron en baño de agua con agitación a  $45 \pm 1$  °C durante 3 h (GCA Precision Scientific®, 66722, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Water Bath, Estados Unidos). Luego de ese tiempo se produjeron leves disminuciones del pH entre 10,4-10,9 dependiendo de las

condiciones de reacción. Se detuvo la reacción mediante el ajuste de pH a 6,5 a través del agregado de una solución de HCl 0,5 N (Anhedra®, Argentina). La suspensión se filtró utilizando papel de filtro (Whatman® Nro. 1) en embudo de Büchner y se lavó 5 veces con volúmenes de 500 mL de agua destilada para eliminar posibles residuos de fósforo inorgánico. Luego del secado en estufa de convección natural (Dalvo Instrumentos®, MCZ-2, Argentina) a  $50 \pm 1$  °C durante 48 h, la muestra fue molida (molino Chincan®, FW 100, China), tamizada en un tamizador (Zonytest®, LR2006, Argentina) con tamiz de malla Nro. 100 de 149  $\mu\text{m}$  de abertura y reservada en bolsas herméticas para ensayos posteriores.

Inicialmente, se realizaron 4 experiencias correspondientes a un diseño completo de  $2^2$  de dos factores a dos niveles con el objeto de evaluar el efecto de los factores concentración de TMFS/TPFS a los niveles de 8 ó 12 % y concentración de almidón a los niveles de 35 ó 40 % en la formación de FDT. Posteriormente, se amplió el análisis mediante un diseño central compuesto con tres repeticiones del punto central, efectuándose 11 experiencias en total. Los valores extremos posibles fueron 7,17 y 12,83 % para la mezcla TMFS/TPFS y 33,96 y 41,04 % para el almidón. En función a los resultados obtenidos en el diseño central compuesto se anexaron 2 experiencias. La experiencia 12 (óptima de acuerdo al diseño central compuesto) con el uso de 12,83 % de TMFS/TPFS y 41,04 % de almidón y la experiencia 13 en la que se utilizó igual cantidad de almidón y se incrementó el % de TMFS/TPFS a 15 %. En todas las experiencias se mantuvieron las condiciones en pH 11,0; 45 °C y 3 h de tiempo de reacción.

### **3.2.2. Determinación de AR como FDT en los almidones modificados por tratamiento hidrotérmico o químico**

Se determinó el contenido de AR como FDT en el AN y en los almidones modificados obtenidos, utilizando el método de Prosky o método 985.29 de la AOAC (2012) mediante el kit TDF-100A (Sigma-Aldrich®, Inc.). Las muestras de almidones (1,00 g en base seca) fueron dispersadas en 50 mL de buffer fosfato 0,08 M a pH 6,0 en erlenmeyers de 500 mL (1,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 8,4 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anhidro en un litro de agua destilada) (Anedra®, Argentina), y se les adicionaron, a cada erlenmeyer, 100  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa termoestable (Sigma-Aldrich®, Inc.). Los erlenmeyers fueron cubiertos con papel aluminio y colocados en baño de agua a 95 °C durante 15 min. Los mismos fueron agitados manualmente cada 5 min. Una vez enfriados a temperatura ambiente se

llevaron a pH 7,5 mediante el agregado de ~10 mL de NaOH 0,275 N (Cicarelli®, Argentina). Posteriormente, se adicionaron 100 µL de proteasa (Sigma-Aldrich®, Inc.) (50 g/L en buffer fosfato). Los erlenmeyers fueron cubiertos con papel aluminio y llevados a un baño de agua a  $60 \pm 1$  °C (GCA Precision Scientific®, 66722, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Water Bath, Estados Unidos) por 30 min con agitación constante. Luego, las soluciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH entre 4,0 y 4,6 con HCl 0,325 M (Anedra®, Argentina) y se agregaron 100 µL de amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich®, Inc.). Se cubrieron los erlenmeyers con papel aluminio y se colocaron en baño de agua a  $60 \pm 1$  °C durante 30 min con agitación constante. Posteriormente a la incubación se adicionaron 4 volúmenes de etanol al 95 %, aproximadamente 210 mL (Biopack®, Argentina) para precipitar polisacáridos solubles y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego se filtraron por crisol filtrante de porosidad Nro. 2 con cama de Celite® (0,5 g) (Sigma-Aldrich®, Inc.). El residuo insoluble fue lavado tres veces con volúmenes de 20 mL de alcohol 78 %, dos veces con volúmenes de 10 mL de alcohol 95 % y dos veces con volúmenes de 10 mL de acetona (Cicarelli®, Argentina). Los crisoles con los residuos fueron secados durante toda la noche en estufa de convección natural a  $103 \pm 2$  °C (Dalvo Instrumentos®, BHR/I, Argentina). Se dejaron enfriar en desecador y se registró el peso ( $W_2$ ). Se determinó el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl (AOAC 960.52, 1997) en dos residuos y dos blancos. El contenido de cenizas se cuantificó colocando dos residuos y dos blancos en una mufla a  $525 \pm 5$  °C por 5 h (O.R.L. ® Hornos eléctricos, Apolo, Argentina) luego se dejaron enfriar en desecador y se registró el peso ( $W_3$ ). El contenido de fibra dietaria total (FDT) (%) fue determinado utilizando la ecuación (1):

$$FDT (\%) = \left( \frac{R_M - P_M - A_M - B}{MW} \right) \times 100 \quad (1)$$

donde  $R$  es el peso promedio del residuo ( $W_2 - W_1$ ) (mg),  $A$  es el peso promedio de las cenizas ( $W_3 - W_1$ ) (mg),  $B$  es el peso del blanco ( $R_B - P_B - A_B$ ) (mg),  $P$  es el peso promedio de las proteínas (mg),  $MW$  peso promedio de la muestra (base seca) (mg),  $W_1$  es el peso del crisol + Celite® (crisol + 0,5 g de Celite® secado a  $130 \pm 2$  °C durante 1 h) (mg),  $W_2$  es el peso del crisol + Celite® + residuo (secado a  $130 \pm 2$  °C toda la noche) (mg), y  $W_3$  es el peso del crisol + Celite® + ceniza (incinerado a  $525 \pm 5$  °C durante 5 h) (mg).

A fines comparativos, para hallar el tratamiento que condujo a la mayor cantidad de FDT, se adaptó el método para un alimento esencialmente libre de proteínas y cenizas. Esta modificación de la metodología consistió en no realizar correcciones en el residuo no digerido para proteínas y cenizas (Woo & Seib, 2002, Brumovsky *et al.*, 2009, Brumovsky & Thompson, 2001). La ecuación (2) simplificada para calcular FDT (%) es:

$$FDT (\%) = \left( \frac{R_M - B}{MW} \right) \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.3. Contenido de fósforo y grado de sustitución del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS

**a) Contenido de fósforo.** Se determinó el contenido de fósforo en el AN y en los almidones de mandioca modificados por EC T/T por el método colorimétrico 995.11 de la AOAC (1995). Se pesaron con precisión en un crisol de porcelana 0,5-1,5 g de almidón en base seca y 0,5 g de óxido de zinc (Biopack®, Argentina). Al mismo tiempo se preparó un blanco de reactivos (sin el agregado de almidón). Las muestras se secaron en estufa a  $110 \pm 2$  °C (Dalvo Instrumentos®, BHR/I, Argentina) durante 2 h, luego fueron calcinadas a  $525 \pm 5$  °C por 4 h en mufla (O.R.L.® Hornos eléctricos, Apolo, Argentina). Las muestras calcinadas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de agua destilada y 5 mL de HCl 12 M (Anedra®, Argentina). Se cubrieron con vidrio de reloj y se calentaron hasta ebullición durante 5 min en plancha calefactora (Velp Scientifica®, RC2, Italia). Las muestras fueron filtradas a través de papel de filtro cualitativo (Lab Nerd®, Nro. 101) en un matraz aforado de 100 mL. El vidrio de reloj fue lavado 5 veces con agua destilada caliente y se recolectaron todos los lavados. Luego, se dejaron enfriar las muestras hasta temperatura ambiente y se neutralizaron con KOH al 50 % (p/p) (Biopack®, Argentina) hasta ligera opalescencia. Posteriormente, se agregaron unas gotas de HCl 12 M hasta la desaparición de la opalescencia y se adicionaron 2 gotas extras. Una vez frías las muestras se llevaron a volumen (100 mL) con agua destilada. En matraces aforados de 50 mL, se colocaron alícuotas de 1-10 mL de las soluciones tratadas, se diluyeron a 15 mL con agua destilada y se agregaron 20 mL de solución mezcla de molibdato de sodio/ácido ascórbico (Biopak®, Argentina/Sigma Aldrich® Inc., Estados Unidos), los matraces fueron calentados durante 15 min en un baño de agua a ebullición. Las muestras fueron

enfriadas hasta temperatura ambiente y llevadas a volumen con agua destilada. Se midió la absorbancia a 823 nm dentro de la hora de reacción, en un espectrofotómetro (Spectrum SP 2100, China), empleando una celda de cuarzo con longitud de paso de luz de 1 cm. La curva de calibración se construyó a partir de una solución estándar de fósforo de 1 mg fósforo/mL (1,0967 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 250 mL de agua destilada) (Anedra®, Argentina), preparándose diluciones con contenido de 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 y 0,06 mg de fósforo. Las determinaciones se realizaron por duplicado. La concentración de fósforo fue expresada en g de fósforo por 100 g de muestra de almidón empleando la ecuación (3):

$$Fósforo (\%) = \frac{(V_2/V_1) \times F}{W} \times 100 \quad (3)$$

donde  $V_1$  es el volumen de la solución empleada en la reacción (mL),  $V_2$  es el volumen del matraz conteniendo la muestra calcinada (100 mL),  $F$  es la cantidad de fósforo de la muestra determinada a partir de la curva estándar (mg) y  $W$  es el peso de la muestra (mg).

**b) Grado de sustitución.** El grado de sustitución con fósforo (GS) se determinó mediante la utilización de la ecuación (4), empleada por Wongsagonsup *et al.* (2014) y Gui-Jie *et al.* (2006):

$$GS = \frac{162 F_s}{30,974 (100 - 3,8734 F_s)} \quad (4)$$

donde  $F_s$  es el porcentaje de fósforo del almidón modificado por EC menos el porcentaje de fósforo del AN.

#### **3.2.4. Almidón de mandioca modificado por la combinación dual de tratamientos hidrotérmico-químico o químico-hidrotérmico**

La metodología de modificación del almidón de mandioca, mediante la utilización de dos tratamientos (hidrotérmico-químico o químico-hidrotérmico), consistió en realizar un segundo tratamiento de modificación a los almidones inicialmente modificados por los tratamientos hidrotérmicos de ANN, HMT, OPT o químicos de EC

EPI o de EC T/T. Los almidones modificados por los tratamientos hidrotérmicos fueron modificados por los tratamientos químicos de EC y viceversa (Tabla 3.2).

Los almidones modificados y las condiciones de reacción de cada tratamiento a emplear para la modificación dual fueron seleccionados en función del contenido de AR medido como FDT. Se seleccionaron las experiencias que permitieron la mayor formación de FDT. En el caso del tratamiento de EC T/T se consideró el contenido de fósforo. En la Tabla 3.3 se presentan las experiencias y las condiciones de reacción que fueron seleccionadas para la modificación dual.

Las combinaciones de las experiencias utilizadas para realizar los tratamientos de modificación dual del almidón de mandioca por tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos se presentan en la Tabla 3.4. Las modificaciones fueron realizadas mediante el empleo de las metodologías descritas en el punto 3.2.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

**Tabla 3.2.** Secuencia de tratamientos en la modificación del almidón de mandioca por combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.

<b>1° Tratamiento</b>		<b>2° Tratamiento</b>	
<b>Hidrotérmico</b>	ANN HMT OPT	<b>Químico</b>	EC EPI EC T/T
<b>Químico</b>	EC EPI EC T/T	<b>Hidrotérmico</b>	ANN HMT OPT

**Referencias:** ANN = *annealing*, HMT = *heat moisture treatment*, OPT = *osmotic pressure treatment*, EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1).

**Tabla 3.3.** Experiencias y condiciones de reacción seleccionadas para la modificación del almidón de mandioca por la combinación dual de tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.

Tratamiento hidrotérmico		
Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
4ANN	50	48
4HMT	105	2
6HMT	105	5
4OPT	105	2
Tratamiento químico (EC EPI)		
Código de la experiencia	EPI (%)	Tiempo (h)
5EC EPI	0,15	12
Tratamiento químico (EC T/T)		
Código de la experiencia	T/T (%)	Almidón (%)
6EC T/T	12,83	37,50
8EC T/T	10,00	41,04
12EC T/T	12,00	41,04
13EC T/T	15,00	41,04

**Referencias:** ANN = *annealing*, HMT = *heat moisture treatment*, OPT = *osmotic pressure treatment*, EPI = epíclorhidrina, EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina, T/T = trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1), EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1).

**Tabla 3.4.** Combinaciones de las experiencias en los tratamientos de modificación dual del almidón de mandioca por tratamientos hidrotérmicos-químicos y químicos-hidrotérmicos.

1° Tratamiento		2° Tratamiento	
<b>Hidrotérmico</b>	4ANN	<b>Químico</b>	5EC EPI
	4HMT		6EC T/T
	6HMT		8EC T/T
			12EC T/T
	13EC T/T		
<b>Químico</b>	4OPT	<b>Hidrotérmico</b>	4ANN
	5EC EPI		4HMT
	6EC T/T		6HMT
	8EC T/T		
	12EC T/T		4OPT
	13EC T/T		

**Referencias:** ANN = *annealing*, HMT = *heat moisture treatment*, OPT = *osmotic pressure treatment*, EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1).

#### **3.2.4.1. Determinación de AR como FDT en los almidones modificados por la combinación dual de tratamientos hidrotérmico-químico o químico-hidrotérmico**

Se determinó el contenido de AR como FDT en los almidones obtenidos por la combinación dual de tratamientos. Se utilizaron la metodología descrita en el punto 3.2.2 (método 985.29 de la AOAC, 2012) modificado y la ecuación (2).

#### **3.2.5. Contenido de fósforo y GS del almidón de mandioca modificado por la combinación dual de tratamientos hidrotérmico-EC T/T o viceversa**

Se cuantificó el contenido de fósforo y GS en los almidones seleccionados, modificados por la combinación de tratamientos hidrotérmico-EC T/T o viceversa, con el objetivo de escoger el tratamiento combinado con mayor contenido de FDT que no excediera el límite máximo de fósforo permitido para uso en alimentos. Las determinaciones se realizaron en los almidones modificados 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T. En los mismos, se observó un incremento significativo del contenido de FDT con respecto a la experiencia del tratamiento hidrotérmico o químico correspondiente. Se utilizaron el método 995.11 de la AOAC (1995) y las ecuaciones (3) y (4). Las cuantificaciones se realizaron por duplicado.

#### **3.2.6. Nivel de FDT en el almidón modificado por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T**

Se cuantificaron los niveles de AR como FDT en el almidón obtenido por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T mediante la aplicación descrita en el punto 3.2.2 (método 985.29 de la AOAC, 2012) sin modificaciones y la utilización de la ecuación (1).

#### **3.2.7. Propiedades fisicoquímicas del almidón modificado con mayor contenido de FDT**

Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas del almidón de mandioca modificado obtenido por la combinación de los tratamientos 6HMT-13EC T/T por presentar un mayor contenido de FDT y un valor de fósforo dentro de los límites establecidos por las legislaciones para uso en alimentos.

### 3.2.7.1. Determinación del pH y acidez titulable

El pH y la acidez titulable del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T se determinaron utilizando la metodología descrita por Aristizábal & Sánchez (2007) basada en las técnicas del *International Starch Institute* (1999), ISI 11-1e e ISI 12-1e.

**a) Medida del pH.** Se pesaron 20 g de muestra de almidón en base seca y se mezclaron con 100 mL de agua destilada, previamente hervida durante 15 min para eliminar el CO<sub>2</sub>. Se filtró la muestra en papel de filtro (Whatman® Nro. 1) con embudo de Büchner, se tomó una alícuota del filtrado y se midió el pH (pHmetro Orion®, 230A provisto de un electrodo de vidrio). Las mediciones se realizaron por duplicado.

**b) Acidez titulable.** Se tomaron 50 mL del filtrado y se titularon con NaOH 0,1 N (Biopack®, Argentina) empleando como indicador fenolftaleína (Cicarelli®, Argentina) al 1 % en etanol 95 % (Biopack®, Argentina) hasta pH 8,3. Las determinaciones se realizaron por duplicado. La acidez se expresó como miliequivalentes de ácido láctico por 100 g de muestra seca, utilizando la ecuación (5):

$$Acidez \left( \frac{mEq \text{ ácido láctico}}{g \text{ de muestra}} \right) = \frac{V \times N \times 0,09}{M} \times 100 \quad (5)$$

donde  $V$  es el volumen de NaOH gastado en la titulación (mL),  $N$  es la normalidad de la solución de NaOH,  $M$  es el volumen de la muestra (mL) y 0,09 es un factor de conversión (miliequivalentes de ácido láctico).

### 3.2.7.2. Distribución de tamaños de los gránulos de almidón

Se determinó la distribución del tamaño de los gránulos del AN y del almidón de mandioca modificado (6HMT-13EC T/T) utilizando un microscopio óptico (Olympus Optical® Co. Ltd., Olympus BH, Japón) siguiendo las metodologías descritas por MacMasters (1964), Schoch & Maywald (1956), Sathe & Salunkhe (1981), Singh *et al.* (2005) y Gong *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. Se prepararon suspensiones de almidón al 1 % en base seca (p/p) con agua destilada (100 mg de almidón en 10 mL de agua destilada) en tubos de 15 mL, tipo falcon, con tapa a rosca. Se mezclaron mediante un vórtex (VWR Scientific Products/ IKA®, Mini Vortexer Mixer MV1, Estados Unidos). Las observaciones microscópicas se realizaron inmediatamente y luego de los tratamientos térmicos en baño de agua a 65 y 95 ± 1 °C por 30 min (GCA Precision Scientific®, 66722, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Water Bath, Estados

Unidos). Durante el tratamiento térmico, los tubos fueron mezclados cada 5 min para dispersar la suspensión. Para la observación microscópica directa, se colocó una delgada capa de la suspensión en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Luego de 5 min de reposo, se observó al microscopio. Las mediciones fueron realizadas mediante impresiones fotográficas obtenidas con una cámara digital (Canon®, EOS, Rebel T7i, Japón). Las imágenes fueron capturadas con un objetivo de 40 X y un ocular de (12.5 X M). Las mismas fueron calibradas mediante un micrómetro de objeto siendo el aumento total de (500 X). El tamaño y el volumen medio de los gránulos se determinaron midiendo el diámetro en gránulos simétricos. En los gránulos no simétricos se midió la mayor longitud aproximando su geometría a una esfera (Medina & Salas, 2008). Para cada muestra se midieron los tamaños de 500 gránulos provenientes de diferentes fotografías con el objeto de obtener curvas reproducibles (Schoch & Maywald, 1956).

### **3.2.7.3. Poder de hinchamiento, solubilidad e índice de absorción de agua del almidón**

La determinación del poder de hinchamiento (PH), el porcentaje de solubilidad (% SOL) y el índice de absorción de agua (IAA) del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de tratamientos (6HMT-13EC T/T) se realizó utilizando la metodología empleada por Ačkar *et al.* (2010). Se colocaron suspensiones de almidón al 1 % (p/p) (0,1 g en base seca en 10 mL de agua destilada) en tubos de centrifuga de plástico con tapa a rosca, tipo falcon, de 15 mL y fueron llevadas a un baño de agua con agitación constante a temperaturas de 45, 55, 65, 75 y  $85 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 min (GCA Precision Scientific®, 66722, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Water Bath, Estados Unidos). Luego, se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2200 g durante 30 min (Beckman AccuSpin FR<sup>TM</sup> Refrigerated Centrifuge, 343440, Estados Unidos). El sobrenadante fue secado en estufa de convección natural a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta peso constante (Dalvo Instrumentos®, BHR/I, Argentina). La pasta precipitada y el sobrenadante seco fueron pesados. Se determinó el PH y el % SOL empleando las ecuaciones (6) y (7) utilizadas por Pukkahuta *et al.* (2008) y el IAA mediante el empleo de la ecuación (8) propuesta por Aristizábal & Sánchez (2007). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\% SOL = \frac{A}{S} \times 100 \quad (6)$$

$$PH = \frac{B}{S(100 - \% SOL)} \times 100 \quad (7)$$

$$IAA = \frac{B}{S} \quad (8)$$

donde  $A$  es el peso seco del almidón soluble (mg),  $B$  es el peso de la pasta precipitada (mg), y  $S$  es el peso seco de la muestra (mg).

#### **3.2.7.4. Claridad y estabilidad de las pastas del almidón**

Se determinó la estabilidad y claridad de las pastas del AN y del almidón modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T a 25 y 4 ± 1°C mediante la metodología empleada por Bello-Pérez *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se suspendieron 0,25 g de almidón en base seca en 25 g de agua destilada (1 %, p/p) en tubos de centrífuga de plástico con tapa a rosca, tipo falcon, de 50 mL. Estos se colocaron en baño de agua a 95 °C durante 30 min con agitación constante (GCA Precision Scientific®, 66722, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Water Bath, Estados Unidos). Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se midió el porcentaje de transmitancia (% T) en espectrofotómetro a 650 nm (SP-2100 Spectrum Vis spectrophoto METER, Estados Unidos) empleando agua destilada como blanco. Luego fueron almacenadas a 25 y 4 ± 1°C midiéndose el % T a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 h de almacenamiento. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **3.2.7.5. Propiedades de las pastas del almidón y grado de enlaces cruzados**

**a) Propiedades de las pastas del almidón.** Las propiedades de las pastas del AN y del almidón modificado por la combinación de tratamiento 6HMT-13EC T/T fueron determinadas mediante un visco-amilógrafo Brabender (C.W. Brabender® Instruments Inc., VA-VE, Alemania) provisto de un agitador estándar de 7 pines, utilizándose un cartucho de sensibilidad de 700 cmg y una pesa de 250 g. Durante la realización del ensayo, una suspensión de almidón en agua se sometió a calentamientos y enfriamientos controlados. Se registró en forma continua, mediante un gráfico, la viscosidad de la

suspensión. El amilograma indicó, en forma sencilla, el proceso de gelatinización del almidón. Se prepararon 500 mL de una suspensión de almidón al 5 % en base seca en agua destilada y se ajustó el pH entre 5,5 y 6,0 (pHmetro, Orion modelo 230A provisto de un electrodo de vidrio, Estados Unidos) con HCl 0,1 N (Anedra®, Argentina) o NaOH 0,1 N (Biopack®, Argentina) manteniendo la suspensión en constante agitación con ayuda de un agitador magnético (agitador magnético a temperatura constante, Arcano®, 78HW-1, Argentina). Se vertió la suspensión en el tazón del equipo y se ajustaron los parámetros del ensayo a velocidad de agitación de 75 rpm, rango de medición de la celda de carga 700 cmg y velocidad de calentamiento de 1,5 °C/min. La suspensión se calentó desde 50 °C hasta 95 °C a una velocidad uniforme de 1,5 °C/min bajo agitación constante (75 rpm). Al alcanzar los 95 °C la muestra se mantuvo a esa temperatura por 30 minutos en agitación constante (primer período de mantenimiento). Luego se enfrió hasta 50 °C a una velocidad de 1,5 °C/min, y se mantuvo a esa temperatura (50 °C) durante 30 min con agitación constante (segundo período de mantenimiento). Se evaluaron los siguientes puntos significativos de la curva del amilograma (Mazurs *et al.*, 1957 citado por Deffenbaugh & Walker, 1989; Leelavathi *et al.*, 1987):

**A:** Temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización)

**B:** Pico de máxima viscosidad

**C:** Viscosidad al comienzo del primer periodo de mantenimiento (a 95 °C)

**D:** Viscosidad al comienzo del periodo de enfriamiento (a 95 °C)

**E:** Viscosidad al final del periodo de enfriamiento (a 50 °C)

**F:** Viscosidad al final del segundo periodo de mantenimiento (a 50 °C)

**B – D** = Estabilidad de la pasta durante la cocción (*Breakdown*)

**D – E** = Retrogradación (*Setback*)

**b) Grado de enlaces cruzados.** Se estimó el grado de enlaces cruzados (GEC %) a partir de los datos aportados por el amilógrafo Brabender de acuerdo al método descrito por Chatakanonda *et al.* (2000a), mediante el empleo de la ecuación (9):

$$GEC \% = \frac{B_{AN} - B_{AEC}}{B_{AN}} \times 100 \quad (9)$$

donde  $B_{AN}$  es el pico de viscosidad del almidón nativo en unidades Brabender (UB) y  $B_{AEC}$  es el pico de viscosidad del almidón con EC (UB).

### 3.2.7.6. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido

El análisis térmico fue realizado mediante el uso de un DSC (modelo DSC-Q2000, TA Instruments, Estados Unidos). El mismo fue calibrado inicialmente en fábrica con indio (temperatura de fusión 156,6 °C). Se preparó una suspensión de cada muestra (AN y 6HMT-EC T/T), en exceso de agua (mayor a 66 %, p/p), utilizando agua destilada en una relación 1:3 (33 %, p/p de almidón). Cada suspensión fue transferida aleatoriamente a una cápsula de aluminio (TZero, TA Instruments, Estados Unidos) la cual fue cerrada herméticamente. Una cápsula sellada y vacía fue usada como referencia. Antes de las mediciones, cada cápsula fue equilibrada a temperatura ambiente (~25 °C) durante 1 h. Las muestras fueron tratadas térmicamente utilizando una rampa de temperatura desde 25 hasta 110 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las temperaturas de transición fueron registradas en un gráfico de flujo de calor versus temperatura. Se determinaron las temperaturas de gelatinización inicial ( $T_i$ ), pico ( $T_p$ ), final ( $T_f$ ), rango de temperatura ( $T_f - T_i$ ) y la entalpía de gelatinización ( $\Delta H$ ). Cada determinación fue realizada por duplicado.

### 3.2.7.7. Comportamiento reológico dinámico

Se realizó un ensayo dinámico para caracterizar el comportamiento viscoelástico de las pastas del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

**Elaboración de las pastas de almidón.** Se prepararon suspensiones del AN y del almidón de mandioca modificado 6HMT-13EC T/T en agua destilada con una concentración del 5 % (p/p) siguiendo el procedimiento planteado por Osundahunsi *et al.* (2011). Las suspensiones fueron tratadas térmicamente a  $85 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 min utilizando un baño termostatzado (LKB 2219 Multitemp II, Bromme, Suecia). Se agitó moderadamente cada suspensión durante los primeros 10 min de calentamiento, con el objetivo de evitar la sedimentación y/o aglomeración del almidón en suspensión. Se evitó, al mismo tiempo, la incorporación de burbujas que pudieran quedar retenidas en las muestras e interfirieran en las determinaciones reológicas. Al finalizar el tratamiento térmico, las pastas de almidón obtenidas fueron almacenadas a temperatura ambiente (~25 °C) durante 30 min para su posterior análisis.

**Reometría dinámica.** Se determinaron las propiedades reológicas a 25 °C de las pastas de almidón utilizando un reómetro con tensión controlada (RheoStress 80, Haake Inc. Instruments, Alemania) y una geometría cono-plato (2° de ángulo y 35 mm de diámetro). Se realizaron barridos de frecuencia en el rango de 0,1 a 10 rads/s en el período de viscoelasticidad lineal (donde la estructura no sufre daño), utilizando una tensión controlada de 3 Pa. Cada pasta fue colocada en el plato inferior del reómetro durante 3 min, permitiendo que la muestra se relaje y se equilibre a la temperatura de medición. Se determinaron los módulos elástico ( $G'$ ), viscoso ( $G''$ ) y el ángulo de fase ( $\delta$ ). Cada determinación fue realizada por duplicado dentro de los primeros 30 min luego de finalizado el período de almacenamiento a temperatura ambiente, con el objetivo de minimizar la posibilidad de desestabilización (retrogradación, sedimentación, etc.) de las pastas de almidón obtenidas por tratamiento térmico. La dependencia de los módulos  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia (velocidad angular  $\omega$ ) fue evaluada aplicando el modelo de Ley de Potencia (Wongsagonsup *et al.*, 2014) mediante las ecuaciones (10) y (11):

$$G' = A\omega^B \quad (10)$$

$$G'' = C\omega^D \quad (11)$$

donde  $A$  y  $C$  son constantes que corresponden a los módulos  $G'$  y  $G''$  a una frecuencia de 1 rads/s, y  $B$  y  $D$  son pendientes.

Si bien el protocolo inicial contemplaba que el barrido de frecuencias llegue hasta los 100 rads/s, se priorizó que las determinaciones se realizaran en un tiempo corto (menos de 5 min) con el objetivo de evitar o disminuir la probabilidad de desestabilización de las pastas durante las determinaciones. Por eso se realizaron hasta los 10 rads/s, abarcando dos décadas en escala logarítmica.

### 3.2.7.8. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico *Statgraphics Plus Centurion XVI*. Se realizaron análisis de: diseño factorial, superficie de respuesta, varianza (ANOVA), regresión y correlación. Para comparar las medias se usó el test de Student y pruebas de hipótesis.

---

# CAPITULO 4

---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DETERMINACIÓN DE AR COMO FDT EN LOS ALMIDONES MODIFICADOS POR TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO Ó QUÍMICO

#### 4.1.1. Almidón modificado por el tratamiento ANN

En la Tabla 4.1 se presentan los valores de FDT del almidón modificado por ANN obtenido en las experiencias del diseño factorial completo  $2^2$ .

**Tabla 4.1.** Valores de FDT del almidón modificado por ANN en las experiencias del diseño factorial completo  $2^2$ .

Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
1ANN	45	24	2,45 ± 0,20 <sup>a</sup>
2ANN	50	24	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
3ANN	45	48	2,54 ± 0,08 <sup>a</sup>
4ANN	50	48	2,66 ± 0,08 <sup>a</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, ANN = *annealing*, 70 % de humedad (p/p). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis factorial mostró que en las condiciones estudiadas la temperatura, el tiempo de reacción y sus interacciones no tuvieron una influencia estadísticamente significativa en el contenido FDT (%) en el almidón modificado por ANN para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 1a). Los valores de FDT del almidón modificado no presentaron variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al AN (Anexo 1b).

Resultados similares fueron reportado por Brumovsky & Thompson (2001) al evaluar el contenido de AR estable a la ebullición (detectado como FDT por el método 991.43 de la AOAC) en el almidón de maíz de alta amilosa modificado por ANN a temperaturas de 50 y 60 °C, 30 % sólidos, durante 24 h. Estos investigadores además informaron que el aumento de la temperatura de ANN a 70 °C condujo a un incremento significativo en el contenido de AR estable a la ebullición. En los almidones de maíz, arveja y lenteja modificados por ANN (30 % sólidos a 15 y 10 °C por debajo de la temperatura de gelatinización durante 24 h) se observó un incremento en el contenido de AR luego de la gelatinización, medidos por el método de Englyst *et al.* (1992), (Chung *et al.*, 2009). Sugiriéndose que ello es reflejo del aumento de las interacciones entre las moléculas de amilosa-amilosa o de amilosa-amilopectina y de la perfección de

cristalitos preexistentes. Además, indicaron que el incremento en el contenido de AR termoestable se debería a la termoestabilidad de las interacciones amilosa-amilosa luego de la gelatinización las cuales limitan el acceso de las enzimas.

La no variación de FDT en las muestras del presente trabajo, en las condiciones evaluadas, podría ser atribuida a la probable formación de poros o fisuras en la superficie del gránulo (O'Brien & Wang, 2008; Wang *et al.*, 1997) lo cual permite una mayor accesibilidad de las enzimas. Además, los cambios causados por ANN en la región amorfa y cristalina las tornan más ordenadas y facilitan la actividad enzimática en la región amorfa (Tester & Debon, 2000; da Rosa Zavareze & Días, 2011). Se ha observado que aunque ANN incrementa la cristalinidad del almidón de mandioca, este se torna más sensible a la acción de la  $\alpha$ -amilasa que el almidón nativo (Serrano & Franco, 2005).

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la experiencia 4ANN para ser utilizada en los tratamientos combinados. En esta experiencia se empleó la mayor temperatura y el mayor tiempo de reacción. Una temperatura elevada en ANN (mayor a la temperatura de transición vítrea pero menor a la temperatura de gelatinización) acelera la velocidad de hidratación e incrementa la movilidad de las moléculas aumentando el orden en la región amorfa. Las condiciones de la experiencia 4ANN, al causar mayores cambios en la estructura del almidón, podrían tener un impacto positivo en la formación de FDT al combinarse con tratamientos químicos.

#### **4.1.2. Almidón modificado por el HMT**

En la Tabla 4.2 se presentan los valores de FDT del almidón modificado por el HMT obtenido en las experiencias del primer diseño factorial completo 2<sup>2</sup>.

El análisis del primer diseño factorial mostró que, en las condiciones estudiadas, la temperatura, el tiempo de reacción y sus interacciones no tuvieron una influencia estadísticamente significativa en el contenido FDT (%) en el almidón modificado por el HMT para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 2a). Se observó (Anexo 2b) que las experiencias 3HMT y 4HMT presentaron un aumento significativo en los valores de FDT con respecto al AN de 7,8 % y 9,4 %, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre las experiencias con la excepción de la experiencia 4HMT en la cual el contenido de FDT fue significativamente mayor a la experiencia 1HMT.

**Tabla 4.2.** Valores de FDT del almidón modificado por el HMT en las experiencias del primer diseño factorial completo 2<sup>2</sup>.

Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
1HMT	90	60	2,62 ± 0,07 <sup>ab</sup>
2HMT	105	60	2,68 ± 0,02 <sup>abc</sup>
3HMT	90	120	2,75 ± 0,09 <sup>bc</sup>
4HMT	105	120	2,79 ± 0,20 <sup>c</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, HMT = *heat moisture treatment*, 20% de humedad (p/p). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los incrementos obtenidos fueron menores a los reportados en la bibliografía para el almidón de mandioca y otros almidones. Brumovsky *et al.* (2009), reportaron incrementos de AR estable a la ebullición (método 991.43 de la AOAC) de 18,2 %; 223 %; 60 % y 181,8 % en almidones de mandioca, maíz, trigo y papa respectivamente modificados por el HMT. Estos valores fueron hallados en las experiencias en las cuales se empleó la mayor temperatura (120 °C) y tiempo de reacción (60 min). Se observó que el almidón de mandioca presentó un descenso del contenido de AR con el incremento de la temperatura de 100 a 120 °C. Brumovsky & Thompsom (2001) también informaron un incremento en la formación de AR estable a la ebullición (método 991.43 de la AOAC) en el almidón de maíz de alto contenido de amilosa modificado por el HMT. Chung *et al.* (2009) observaron un incremento del contenido de AR con respecto al AN (método de Englyst *et al.* 1992) de 11,2 % y 10,4 %, luego de la gelatinización, de almidones de arveja y lenteja modificados por el HMT, respectivamente. Esto se observó para la mayor temperatura utilizada (120 °C) y tiempo de reacción de 2 h. Estos autores sugieren que algunas interacciones formadas durante la modificación por el HMT podrían soportar la gelatinización restringiendo la actuación de las enzimas.

En base a los hallazgos descriptos y con el objeto de obtener mayores niveles de FDT se realizó el segundo diseño factorial empleando tiempos de reacción más prolongados. En estas condiciones puede esperarse un resultado positivo debido a que se observó que el tiempo fue el factor que causó mayor efecto en la formación de FDT. Esto puede apreciarse en el diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales en el Anexo 2a. Los resultados de FDT para el segundo diseño factorial se observan en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Valores de FDT del almidón modificado por el HMT en las experiencias del segundo diseño factorial completo 2<sup>2</sup>.

Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
5HMT	90	5	2,69 ± 0,07 <sup>bc</sup>
6HMT	105	5	2,75 ± 0,06 <sup>c</sup>
7HMT	90	10	2,63 ± 0,05 <sup>ab</sup>
8HMT	105	10	2,71 ± 0,10 <sup>bc</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, HMT = *heat moisture treatment*, 20% de humedad (p/p). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Nuevamente, el análisis del segundo diseño factorial puso en evidencia la falta de influencia de los factores en las condiciones estudiadas en la formación de FDT a partir del AN (Anexo 2c). Se observó (Anexo 2d) que las experiencias 5HMT, 6HMT y 8HMT causaron un aumento significativo en los valores de FDT con respecto al AN de 5,5 %, 7,8 % y 6,3 %, respectivamente. Los mismos no presentaron diferencias significativas. No se evaluaron mayores temperaturas debido al descenso en el contenido de FDT con el aumento de la temperatura de 100 °C a 120 °C (Brumosvsky *et al.*, 2009).

Con el objeto de seleccionar la experiencia del HMT individual para el empleo de los tratamientos combinados se analizaron las 8 experiencias (Anexo 2e). Se seleccionaron las experiencias 4HMT del primer diseño factorial y 6HMT del segundo diseño factorial por presentar un mayor incremento del contenido de FDT con respecto al AN y por consistir en tratamientos en los cuales se emplearon una temperatura más alta (por debajo de 120 °C). El HMT podría favorecer la formación de FDT en los tratamientos combinados. Se ha reportado que el empleo del HMT, al causar alteraciones estructurales en las regiones cristalinas y amorfas del gránulo de almidón, sensibilizan a las modificaciones químicas o enzimáticas por lo que se usan como pre-tratamiento (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). La extensión de la modificación por el HMT depende de las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo y humedad, entre otros. Todavía, existe escasa información sobre los mecanismos moleculares implicados en ella (da Rosa Zavareze & Días, 2011).

### 4.1.3. Almidón modificado por el OPT

Los valores de FDT del almidón modificado por el OPT obtenido en las experiencias del primer diseño factorial completo  $2^2$  se observan en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4.** Valores de FDT del almidón modificado por el OPT en las experiencias del primer diseño factorial completo  $2^2$ .

Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>ab</sup>
1OPT	90	60	2,58 ± 0,06 <sup>ab</sup>
2OPT	105	60	2,68 ± 0,18 <sup>b</sup>
3OPT	90	120	2,52 ± 0,09 <sup>a</sup>
4OPT	105	120	2,87 ± 0,07 <sup>c</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, OPT = *osmotic pressure treatment*, 100 g de almidón en 200 mL de solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 g). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis del primer diseño factorial mostró que, en las condiciones estudiadas, la temperatura influyó significativamente en la producción de FDT a partir del AN con un nivel de confianza del 95 % (Anexo 3a). El aumento en la temperatura causó un incremento en la formación de FDT. Se observó que la experiencia 4OPT presentó un valor significativamente mayor de FDT que el AN y que las restantes experiencias realizadas representando un incremento de 12,5 %. Estas últimas no presentaron diferencias significativas con respecto al AN.

Con el objeto de obtener mayores niveles de FDT se realizó el segundo diseño factorial en el cual se incrementó la temperatura por ser el factor que mostró un efecto positivo en la formación de FDT. Los resultados de FDT del segundo diseño factorial se observan en la Tabla 4.5.

El análisis del segundo diseño factorial mostró que, en las condiciones estudiadas, ninguno de los factores individuales estudiados ni sus interacciones presentaron un efecto estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 3c). Se observó (Anexo 3d) que la experiencia 6OPT presentó un aumento significativo en el valor de FDT con respecto al AN del 7,5 % aunque no presentó diferencias significativas con las restantes experiencias.

Se seleccionó la experiencia del OPT individual para el empleo de los tratamientos combinados (Anexo 3e). Se observó que las experiencias 4OPT y 6OPT fueron significativamente diferentes en el contenido de FDT en comparación con el AN

pero no presentaron diferencias significativas entre sí. Se seleccionó la experiencia 4OPT, del primer diseño factorial, por realizarse a una menor temperatura con el propósito de prevenir cambios debido a la posible gelatinización que pudiera ocurrir durante el tratamiento. En experiencias previas, se observó que la reacción a 120 °C condujo a la gelatinización del AN.

**Tabla 4.5.** Valores de FDT del almidón modificado por el OPT en las experiencias del segundo diseño factorial completo 2<sup>2</sup>.

Código de la experiencia	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
5OPT	110	60	2,63 ± 0,08 <sup>ab</sup>
6OPT	115	60	2,74 ± 0,26 <sup>b</sup>
7OPT	110	120	2,61 ± 0,06 <sup>ab</sup>
8OPT	115	120	2,71 ± 0,05 <sup>ab</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, OPT = *osmotic pressure treatment*, 100 g de almidón en 200 mL de solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 g). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas (p < 0,05).

#### 4.1.4. Almidón modificado por el tratamiento de EC con EPI

Los resultados del contenido de FDT del almidón modificado por el tratamiento químico de EC con EPI del primer diseño factorial completo 2<sup>2</sup> se presentan en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Valores de FDT del almidón modificado por EC con EPI en las experiencias del primer diseño factorial completo 2<sup>2</sup>.

Código de la experiencia	Concentración EPI (%)	Tiempo (h)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
1EC EPI	0,15	4	2,62 ± 0,15 <sup>a</sup>
2EC EPI	0,30	4	2,68 ± 0,17 <sup>a</sup>
3EC EPI	0,15	8	2,70 ± 0,20 <sup>a</sup>
4EC EPI	0,30	8	2,73 ± 0,23 <sup>a</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, EPI = epíclorhidrina, EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina a pH = 11,0 y 30 °C. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas (p < 0,05).

El análisis del primer diseño factorial (Anexo 4a) mostró que el empleo de concentraciones de EPI, dentro de los valores establecidos para uso alimentario, (0,15 % ó 0,30 %) y tiempo de reacción de 4 u 8 horas no influyó significativamente en la

producción de FDT para un nivel de confianza del 95 %. Los valores de FDT hallados en las experiencias no presentaron variaciones significativas con respecto al AN ni entre ellas como se observa en la Tabla 4.6 (Anexo 4b).

Resultados similares fueron presentados por Woo & Seib (2002) en almidón de trigo modificado con 0,3 % de EPI, tiempo de reacción de 1 h a pH 11,5 y 25 °C. Sin embargo, estos autores encontraron que al usar concentraciones de EPI mayores a lo permitido en alimentos (1 y 2 %), se incrementaron los niveles de FDT a 53 % y 76 %, respectivamente. Ačkar *et al.* (2010) observaron que el empleo de concentraciones de EPI de 0,1 y 0,3 % incrementó la digestibilidad del almidón de trigo (variedad Golubica) comparado con el AN. Sin embargo, las concentraciones de 0,5 % produjeron una ligera disminución en su digestibilidad. En la variedad Spranjka, las concentraciones de 0,3 % y 0,5 % causaron un incremento del contenido de AR (método 2002.02 de la AOAC). Jyothi *et al.* (2006), en coincidencia con los anteriores autores, reportaron que al modificar el almidón de mandioca con bajas concentraciones de EPI (0,25 %) a pH 10,5; 45 °C durante 2 h, se produjo un aumento en la digestibilidad *in vitro* por  $\alpha$ -amilasa, en comparación con el AN. Además, al aumentar la concentración de EPI de 0,25 % a 1 %, observaron una gradual disminución de la digestibilidad. La degradación enzimática por la  $\alpha$ -amilasa de los almidones modificados por EC es influenciada por las características estructurales del *hydrogel network* (Hamdi & Ponchel, 1999). A diferencia de otros agentes formadores de EC (TMFS y  $\text{POCl}_3$ ), EPI no es un eficiente agente formador de EC. En la bibliografía, se ha reportado que la EPI es poco soluble en agua y es un agente de baja actividad. Además, los EC por EPI no se distribuyen homogéneamente y predominan en la región no cristalina (Shiftan *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007). De acuerdo a Jane *et al.* (1992), las moléculas de amilosas se unen por EC a las moléculas de amilopectinas. El uso de EPI a bajos niveles, en el rango permitido para la obtención de almidones modificados de grado alimenticio, puede resultar en cambios estructurales que no tienen un efecto significativo en la digestibilidad *in vitro* de los almidones según indican Wurzburg (1986a) y Ačkar *et al.* (2010).

En base a lo mencionado anteriormente y para mejorar los niveles de FDT se realizó el segundo diseño factorial empleando tiempos de reacción más prolongados. Se pretendió obtener un resultado positivo con la hipótesis de que el mayor tiempo podría favorecer la actuación del reactivo para generar cambios más importantes en la estructura del almidón. En la Tabla 4.7 se muestran los valores de FDT obtenido en el

segundo diseño factorial completo  $2^2$  del almidón de mandioca modificado por EC con EPI.

**Tabla 4.7.** Valores de FDT del almidón modificado por EC con EPI en las experiencias del segundo diseño factorial completo  $2^2$ .

Código de la experiencia	Concentración EPI (%)	Tiempo (h)	FDT (%)
AN	-	-	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
5EC EPI	0,15	12	2,54 ± 0,03 <sup>a</sup>
6EC EPI	0,30	12	2,56 ± 0,09 <sup>a</sup>
7EC EPI	0,15	24	2,60 ± 0,03 <sup>a</sup>
8EC EPI	0,30	24	2,53 ± 0,06 <sup>a</sup>

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, EPI = epíclorhidrina, EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina a pH = 11,0 y 30 °C. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de 4 determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis del segundo diseño factorial mostró que el aumento del tiempo no favoreció la formación de FDT. Se observó que ninguno de los factores individuales estudiados ni sus interacciones presentaron un efecto estadísticamente significativo en la formación de FDT para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 4c). Los resultados (Anexo 4d) indicaron que las experiencias no presentaron variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de FDT comparado con al AN ni entre sí.

Se analizaron las 8 experiencias con el objeto de seleccionar la experiencia del tratamiento individual de EC con EPI para el empleo de los tratamientos combinados (Anexo 4e). Se observó que las experiencias 4EC EPI y 8EC EPI presentan diferencias significativas en el contenido de FDT. No se evidenciaron incrementos significativos del contenido de FDT en los almidones modificados con respecto al AN. Se seleccionó la condición 5EC EPI debido a la menor concentración de reactivo y un tiempo intermedio de reacción entre los tiempos evaluados.

#### 4.1.5. Almidón modificado por el tratamiento de EC con TMFS/TPFS

El análisis del diseño factorial completo  $2^2$  (Anexo 5a) mostró que la concentración de TMFS/TPFS y de almidón tienen una influencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la formación de FDT. Se observó que un aumento de estos factores produce un incremento significativo en la formación de FDT en los almidones modificados. Estos hallazgos fueron corroborados por los resultados obtenidos mediante

el diseño central compuesto cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.8. En la Figura 4.1 y en el Anexo 5b se muestran y detallan los análisis, respectivamente.

**Tabla 4.8.** Valores de FDT del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS, en las 11 experiencias correspondientes al diseño central compuesto.

Código de la experiencia	TMFS /TPFS (%)	AN (%)	FDT (%)
1EC T/T	8,00	35,00	2,05 ± 0,15 <sup>ab</sup>
2EC T/T	12,00	35,00	1,45 ± 0,03 <sup>a</sup>
3EC T/T	8,00	40,00	7,23 ± 2,79 <sup>a</sup>
4EC T/T	12,00	40,00	22,89 ± 1,17 <sup>c</sup>
5EC T/T	7,17	37,50	2,58 ± 0,01 <sup>ab</sup>
6EC T/T	12,83	37,50	32,89 ± 0,08 <sup>f</sup>
7EC T/T	10,00	33,96	4,24 ± 0,90 <sup>bc</sup>
8EC T/T	10,00	41,04	25,53 ± 0,30 <sup>g</sup>
9EC T/T	10,00	37,50	5,34 ± 1,45 <sup>cd</sup>
10EC T/T	10,00	37,50	4,98 ± 0,24 <sup>c</sup>
11EC T/T	10,00	37,50	5,40 ± 0,06 <sup>cd</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, EC = enlaces cruzados, TMFS/TPFS = trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1), FDT = fibra dietaria total (Método de Prosky - Método 985.29 de la *Association of Official Analytical Chemists* sin correcciones en el residuo por proteínas y cenizas). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de dos determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A continuación se presenta la ecuación del modelo ajustado:

$$AR = 88,79 - 45,97 [TMFS/TPFS] - 38,40 AN + 1,07 [TMFS/TPFS]^2 + 0,75 [TMFS/TPFS] AN + 0,45 AN^2 \quad (12)$$

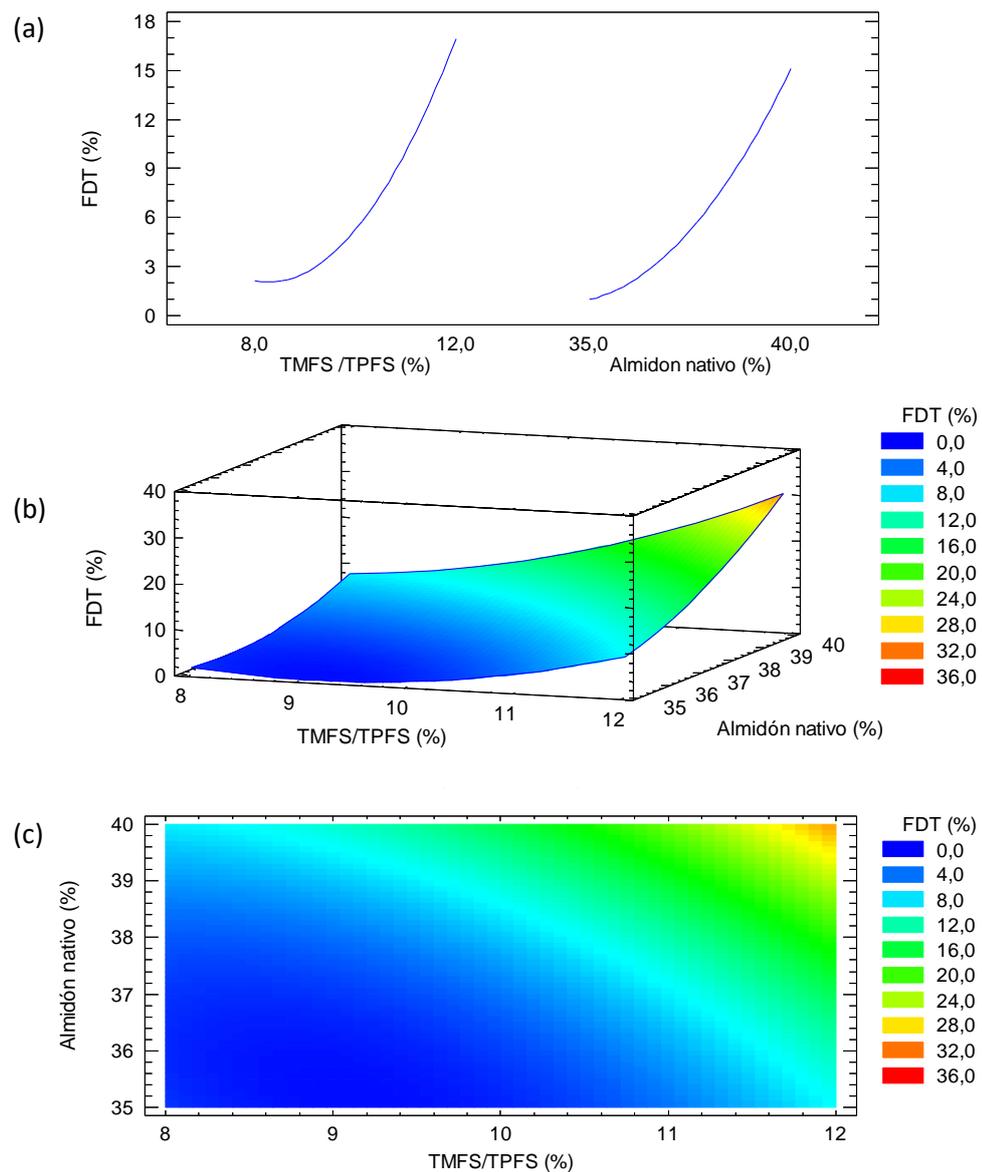
Para optimizar la respuesta y obtener un valor teórico de 47,38 % de FDT de acuerdo al diseño de superficie de respuesta en las condiciones empleadas se deberían utilizar los valores máximos de concentración de cada factor. Esto es:

$$TMFS/TPFS = 12,83 \%$$

$$AN = 41,04 \%$$

Song *et al.* (2011), coincidiendo con los resultados de este trabajo, observaron un aumento en los niveles de FDT (método 991.43 de la AOAC) de 24,12 % a 38,32 % al aumentar la concentración del almidón de arroz de 35 % a 40 % manteniendo las demás condiciones constantes (12 % de TMFS/TPFS, pH 11,8 a 45 °C y 3 h de reacción).

Además, Chung *et al.* (2004) reportaron un incremento de 24,54 % a 81,58 % en el contenido de AR medido como FDT (método 991.43 de la AOAC) en el almidón de maíz al aumentar la concentración de TMFS/TPFS de 4 % a 12 %, respectivamente, a 45 °C y pH 11,0 durante 3 h. Por su parte, Shi *et al.* (2013) observaron, en condiciones de reacción similares a las anteriores, un aumento de la formación de AR (método de Englyst *et al.*, 1992) en almidón de arveja de 23 % a 64 % al aumentar las cantidades de TMFS/TPFS de 0,2 a 12 %, respectivamente.



**Figura 4.1.** (a) Gráfica de efectos principales, (b) superficie de respuesta estimada, (c) contorno de la superficie de respuesta estimada del % de trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (TMFS/TPFS) y del % de almidón de mandioca nativo en la formación de fibra dietaria total (FDT).

Aunque el análisis de superficie respuesta indicó que el aumento en los factores estudiados (% de TMFS/TPFS y % de almidón) produce un incremento en el contenido de FDT en los almidones modificados, el aumento de estos factores no puede efectuarse deliberadamente. En experiencias previas, se constató que el uso de concentraciones del AN mayores a 41,04 % conduce a la formación de una pasta, en lugar de una suspensión, de difícil homogeneización con tendencia a gelatinizar en el transcurso del ajuste del pH (alcalinización) durante la reacción. Además, el uso de la mezcla de TMFS/TPFS no debe incrementar el contenido de fósforo en el almidón a valores que excedan lo estipulado para un almidón de grado alimenticio.

Los almidones modificados por la mezcla de TMFS/TPFS presentan diferentes proporciones de monofosfato de monoalmidón (cíclicos o acíclicos), difosfato de monoalmidón y monofosfatos de dialmidón dependiendo del pH de la reacción. Se ha reportado que el contenido de monofosfatos de dialmidón, que son aquellos almidones en los que un único grupo fosfato esterifica a dos grupos hidroxilos del almidón (EC), presenta una correlación positiva con los niveles de fibra dietaria total y AR tipo 4 (Sang *et al.*, 2007; Woo & Seib, 2002).

Para la obtención de AR o FDT, mediante la reacción de formación de EC con la mezcla de TMFS/TPFS, generalmente se utiliza temperatura no muy alta (45 °C) y pH alcalino entre 10-12,5 con una relación TMFS/TPFS de 99:1. Se emplean bajas concentraciones de TPFS por su menor efecto en la formación de AR que TMFS (Woo & Seib, 2002). A pH menores a 9,5 predominan las reacciones de fosforilación por TPFS mientras que a pH más altos predominan las reacciones de EC por TMFS (Lim & Seib, 1993; Chatakanonda *et al.*, 2000b). Sang *et al.* (2010) observaron, al realizar reacciones de EC con la mezcla de TMFS/TPFS en almidón de trigo (pH entre 9 y 12), que el contenido de fósforo disminuyó con el incremento del pH desde valores de 0,37 % a 0,29 %. Además, se produjo una ligera disminución del contenido de FDT de 88,8 % a 86,5 %. Los autores sugieren que la reacción de EC a pH 12 puede conducir a un menor contenido de fósforo total sin afectar su digestión. La disminución del contenido de fósforo indicaría que a pH 12 se remueve una parte de los fosfatos unidos al almidón (Sang *et al.*, 2010). Generalmente se utiliza una concentración de TMFS/TPFS de 12 % debido a que con ello se alcanzaría aproximadamente la formación de un 99 % de EC (Koo *et al.*, 2010).

La fosforilación, empleando únicamente TMFS, no se recomienda debido a que se torna difícil de controlar la reacción a pH mayores a 9 y porque el nivel máximo de

fósforo permitido por las legislaciones para uso alimentario (CAA, 2018; CRF, 2008) es menor (0,04 %). Esto es válido cuando se utiliza TMFS como único reactivo en lugar de una mezcla de TMFS/TPFS (0,4 %) (Lim & Seib, 1993).

En almidones modificados con 12 % de TMFS/TPFS se han reportado valores del contenido de fósforo muy próximos al límite máximo permitido. Se observaron valores de fósforo de 0,37 % y 0,32 en trigo (Sang *et al.*, 2010; Woo & Seib, 2002), 0,37 % y 0,33 % en maíz (Chung *et al.*, 2004; Woo & Seib, 2002), 0,38 en arveja (Shi *et al.*, 2013), 0,32 % en papa (Woo & Seib, 2002), 0,32 % en trigo céreo y 0,34 en maíz céreo (Woo & Seib, 2002).

El empleo de TMFS/TPFS en concentraciones mayores podría incrementar el contenido de fósforo a valores superiores al límite máximo. Además, se haría un uso excesivo de reactivo debido a que, en la mayoría de los almidones, una concentración de 12 % de TMFS/TPFS es suficiente para producir EC en casi la totalidad de sus moléculas (Koo *et al.*, 2010).

Actualmente, son escasos los reportes de almidón de mandioca modificado con la mezcla de TMFS/TPFS en concentraciones del 12 %. Se desconoce el contenido de fósforo y niveles de FDT. Por lo expuesto y considerando los resultados obtenidos en el diseño central compuesto, se anexaron 2 experiencias. La experiencia 12EC T/T se basó en condiciones óptimas y la experiencia 13EC T/T se efectuó empleando una mayor concentración de TMFS/TPFS e igual concentración de almidón. En la Tabla 4.9 se observan los valores de FDT obtenidos en las últimas experiencias.

**Tabla 4.9.** Valores de FDT del almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS, en las experiencias 12 y 13EC T/T.

Código de la experiencia	TMFS /TPFS (%)	AN (%)	FDT (%)
12EC T/T	12,00	41,04	28,67 ± 0,88 <sup>a</sup>
13EC T/T	15,00	41,04	35,90 ± 0,05 <sup>b</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, EC = enlaces cruzados, TMFS/TPFS = trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1), FDT = fibra dietaria total (Método de Prosky - Método 985.29 de la *Association of Official Analytical Chemists* sin correcciones en el residuo por proteínas y cenizas). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de dos determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se observó que el contenido de FDT, en la experiencia realizada en las condiciones óptimas (28,67 %) fue inferior al teórico de acuerdo al diseño estadístico (47,38 %). En la experiencia 13EC T/T se obtuvo un nivel de FDT significativamente

mayor ( $p > 0,05$ ) (35,90 %) que en la experiencia realizada en las condiciones óptimas y al mayor valor de FDT obtenido en el diseño central compuesto de 32,89 % correspondiente a la experiencia 6EC T/T (Anexo 5c).

En las condiciones estudiadas, las experiencias que permitieron una mayor formación de FDT fueron las experiencias 6, 8, 12 y 13EC T/T. Las mismas se seleccionaron para cuantificar el contenido de fósforo a fin de verificar que no excedieran el límite máximo permitido.

#### 4.2. CONTENIDO DE FÓSFORO Y GS DEL ALMIDÓN DE MANDIOCA MODIFICADO POR EC CON TMFS/TPFS

Con el objeto de seleccionar la experiencia del tratamiento de EC con TMFS/TPFS para ser utilizado en los tratamientos combinados (tratamiento hidrotérmico-químico y viceversa), se cuantificó el contenido de fósforo y determinó el GS en el AN y en los almidones modificados en las experiencias en las que se detectó un mayor % de FDT (6, 8, 12 y 13EC T/T). Los valores se presentan en la Tabla 4.10. La ecuación de la recta de la curva estándar de fósforo fue  $Y = 0,0269167 + 16,144X$  con  $R^2 = 99,97$  %, en la que  $Y$  = absorbancia y  $X$  = fósforo (mg) (Anexo 6a).

**Tabla 4.10.** Contenido de fósforo y grado de sustitución en el AN y en el almidón de mandioca modificado en las experiencias 6, 8, 12 y 13EC T/T.

Muestra	Fósforo % (g/100g)	Grado de sustitución ( $\times 10^{-4}$ )
AN	$0,007 \pm 0,001^a$	$0,00 \pm 0,00^a$
6EC T/T	$0,152 \pm 0,006^b$	$76,00 \pm 3,37^b$
8EC T/T	$0,159 \pm 0,003^b$	$79,97 \pm 1,50^b$
12EC T/T	$0,249 \pm 0,004^c$	$120,31 \pm 0,00^c$
13EC T/T	$0,315 \pm 0,014^d$	$163,04 \pm 7,57^d$

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo; EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1); 6EC T/T = 12,83 % T/T y 37,5 % de almidón; 8EC T/T = 10 % T/T y 41,04 % de almidón; 12EC T/T = 12,83% T/T y 41,04 % de almidón; 13EC T/T = 15 % T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desvío estándar de dos determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En los tubérculos y raíces, el fósforo se encuentra principalmente unido por enlaces covalentes al almidón en la forma de fosfatos monoésteres (Aristizábal & Sánchez, 2007; Hizukuri *et al.*, 1970; Kasemsuwan & Jane, 1996). El almidón de mandioca presenta menor cantidad de fósforo en comparación con almidones de otros orígenes botánicos (Kasemsuwan & Jane, 1996). De acuerdo a diversos investigadores,

los valores de fósforo en el almidón de mandioca varían en el rango de 0,0026-0,021 % (Zhu, 2015; Asaoka *et al.*, 1991). El contenido endógeno de fósforo del AN se encontró dentro del rango reportado por diferentes investigadores. El valor de fósforo hallado fue de 0,007 % coincidiendo con el valor informado por Wongsagonsup *et al.* (2014) y próximo al reportado por Hoover (2001) y Soni *et al.* (1985) de 0,008 % y 0,0075 %, respectivamente. Se ha informado que las variaciones en la composición química de los almidones dependen de la genética de la planta, de la edad de la planta, de la estación del año, del estado (fresco o seco) de la materia prima para la extracción del almidón (Eke *et al.*, 2007; Abera & Rakshit, 2003), entre otras. Sin embargo, en el almidón de mandioca se ha observado que el contenido de fósforo no se ve afectado por la edad del cultivo a la que se realiza la cosecha (Moorthy & Ramanujan, 1986) o por la variedad (Asaoka *et al.*, 1991).

Las condiciones de las experiencias del tratamiento de EC con TMFS/TPFS aplicadas produjeron un incremento significativo ( $p > 0,05$ ; Anexo 6c) del contenido de fósforo y GS en los almidones modificados con respecto al AN como se observa en la Tabla 4.10. Considerando el pH al que se efectuaron las experiencias, el aumento del contenido de fósforo se debería principalmente a la formación de monofosfato de dialmidón (Chatakanonda *et al.*, 2000a). En las experiencias en las cuales el % de almidón fue el mismo (8, 12 y 13 EC T/T), el contenido de fósforo y GS aumentaron conforme se incrementó el % de TMFS/TPFS. Las experiencias 6 y 8 EC T/T no presentaron diferencias significativas entre sí. En este trabajo, el contenido de fósforo y el GS superaron los valores máximos reportados por Wongsagonsup *et al.* (2014) de 0,033 % y  $13,37 \times 10^{-4}$ , respectivamente. Esto sucede en el almidón de mandioca modificado por TMFS/TPFS (99:1) en concentraciones entre 0,25-6,0 % y 41,67 % de almidón. Los investigadores, coincidiendo con los resultados del presente estudio, observaron un aumento en el contenido de fósforo y en el GS con el aumento de la concentración de TMF/TPFS.

En todas las experiencias realizadas en este trabajo el contenido de fósforo no superó el nivel máximo permitido por las legislaciones (CAA, 2018 y CFR, 2010) de 0,4 %, por lo que se seleccionaron las experiencias 6, 8, 12 y 13 EC T/T para ser utilizadas en los tratamientos combinados.

### **4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AR COMO FDT EN LOS ALMIDONES MODIFICADOS POR LA COMBINACIÓN DUAL DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICO-QUÍMICO O VICEVERSA**

#### **4.3.1. Almidón modificado por la combinación dual del tratamiento hidrotérmico: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico de EC con EPI y viceversa**

Para la modificación por tratamientos combinados de EC con EPI-hidrotérmico y viceversa, se seleccionó el almidón modificado en la experiencia 5 de los tratamientos de EC EPI, por utilizarse menor concentración de reactivo y emplearse un tiempo intermedio de reacción con respecto a los demás tratamientos. El almidón obtenido por el tratamiento 5EC EPI fue sometido a un segundo tratamiento de tipo hidrotérmico. Oportunamente, los almidones seleccionados de las experiencias de los tratamientos hidrotérmicos 4ANN, 4HMT, 6HMT y 4OPT fueron modificados por EC con EPI utilizando las condiciones de reacción de la experiencia 5EC EPI.

En la Tabla 4.11 se presentan los valores obtenidos de FDT de las experiencias de los tratamientos combinados (EC con EPI-hidrotérmicos y viceversa), del AN, del almidón modificado por la experiencia del tratamiento hidrotérmico seleccionado y del almidón modificado por la experiencia 5EC EPI. Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 7a.

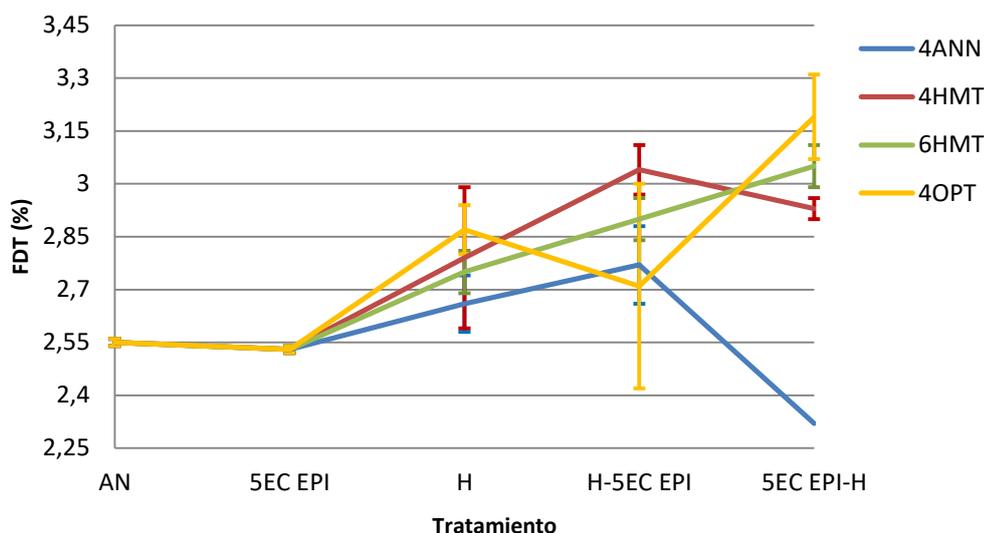
Se observan en las Figuras 4.2 y 4.3 que la secuencia de combinación de tratamiento hidrotérmico-químico (H-Q) causó un efecto sinérgico en el tratamiento 4HMT-5EC EPI. Se observó un incremento significativo del contenido de FDT en el tratamiento 4HMT-5EC EPI comparado con los valores de FDT del AN y de los tratamientos individuales (tratamiento químico o hidrotérmico). Las variaciones observadas en los tratamientos 4ANN-EC EPI, 6HMT-5EC EPI y 4OPT-5EC EPI no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4.11). Cuando el almidón modificado por EC con EPI fue modificado por los tratamientos hidrotérmicos, secuencia de combinación químico-hidrotérmico (Q-H), se observó un incremento significativo ( $p > 0,05$ ) del contenido de FDT en 5EC EPI-6HMT y 5EC EPI-4OPT comparados con sus correspondientes experiencias de los tratamientos hidrotérmicos o químico, con el AN y en la última combinación con su tratamiento inverso (Tabla 4.11). No se observó un incremento significativo en los tratamientos 5EC EPI-4ANN y 5EC EPI-4HMT. Los niveles más altos de FDT se obtuvieron en los tratamientos 4HMT-5EC EPI, 5EC EPI-6HMT y 5EC EPI-4OPT. Los mismos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. El tratamiento 4HMT-5EC EPI exhibió un aumento de FDT de

19,22 %; 8,96 %; 20,16 % y 3,62 % con respecto al AN, 4HMT, 5EC EPI y 5EC EPI-4HMT, respectivamente. El tratamiento 5EC EPI-6HMT presentó un incremento de FDT de 19,61 %; 10,91 %, 20,55 %, 5,17 % con respecto a los valores obtenidos en el AN, 6HMT, 5EC EPI y 6HMT-5EC EPI, respectivamente. En 5EC EPI-4OPT se observó un incremento de 25,10 %; 11,15 %; 26,9 % y 15,05 % con respecto al AN y a los almidones modificados por 4OPT, 5EC EPI y 4OPT-5EC EPI, respectivamente.

**Tabla 4.11.** FDT en el AN, en el almidón modificado por las experiencias 4ANN, 4HMT, 6HMT, 4OPT y 5EC EPI y por la combinación de la experiencia 5EC EPI con las experiencias de los tratamientos hidrotérmicos y viceversa.

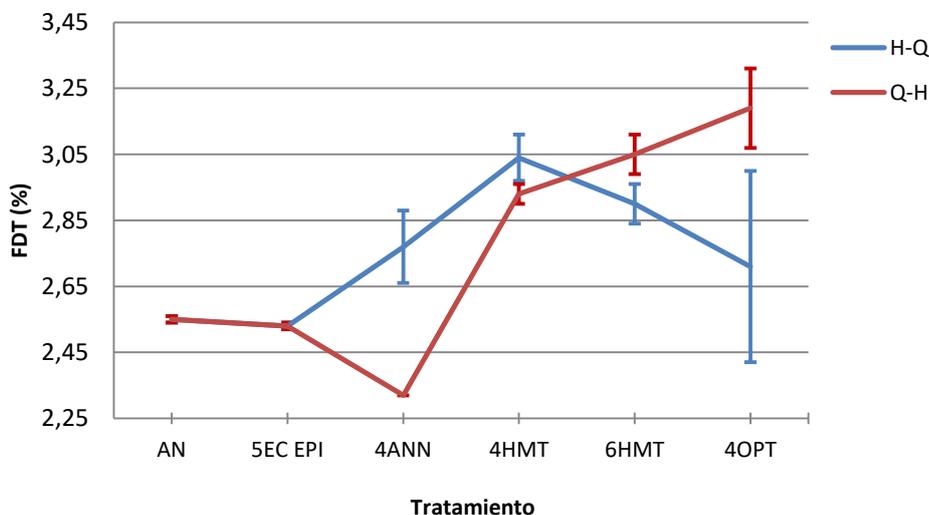
Tratamiento	Muestra	FDT (%)
-	AN	2,55 ± 0,01 <sup>abc</sup>
H	4ANN	2,66 ± 0,08 <sup>bcd</sup>
H	4HMT	2,79 ± 0,20 <sup>de</sup>
H	6HMT	2,75 ± 0,06 <sup>de</sup>
H	4OPT	2,87 ± 0,07 <sup>ef</sup>
Q	5EC EPI	2,55 ± 0,01 <sup>ab</sup>
H-Q	4ANN-5EC EPI	2,77 ± 0,11 <sup>cde</sup>
H-Q	4HMT-5EC EPI	3,04 ± 0,07 <sup>fg</sup>
H-Q	6HMT-5EC EPI	2,90 ± 0,06 <sup>ef</sup>
H-Q	4OPT-5EC EPI	2,71 ± 0,29 <sup>bcd</sup>
Q-H	5EC EPI-4ANN	2,32 ± 0,00 <sup>a</sup>
Q-H	5EC EPI-4HMT	2,93 ± 0,03 <sup>ef</sup>
Q-H	5EC EPI-6HMT	3,05 ± 0,06 <sup>fg</sup>
Q-H	5EC EPI-4OPT	3,19 ± 0,12 <sup>g</sup>

**Referencias:** H = hidrotérmico, Q = químico, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, 4ANN = *annealing* preparado a partir de una solución acuosa al 30 % (p/p) a 50 °C y tiempo de reacción de 48 h, 4HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 4OPT = *osmotic pressure treatment* preparado a partir de una suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 5EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina al 0,15%, tiempo de reacción de 12 h a 30 °C y pH 11,0. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar. Valores con diferentes supra índices presentan diferencias significativas (p < 0,05).



**Figura 4.2.** Valores de FDT del AN y de los almidones modificados por tratamiento hidrotérmico, por 5EC EPI y por sus combinaciones.

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón de mandioca nativo, H = tratamiento hidrotérmico, 4ANN = *annealing*, solución acuosa al 30 % (p/p) a 50 °C y tiempo de reacción de 48 h, 4HMT = *heat moisture treatment*, almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 6HMT = *heat moisture treatment*, almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 4OPT = *osmotic pressure treatment*, suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 5EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina al 0,15%, tiempo de reacción de 12 h a 30 °C y pH 11,0. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar.



**Figura 4.3.** FDT de la secuencia de combinación de tratamientos H-Q y Q-H del almidón de mandioca modificado con el tratamiento químico de 5EC EPI.

**Referencias:** FDT = fibra dietaria total, AN = almidón nativo de mandioca, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, 4ANN = *annealing*, solución acuosa al 30 % (p/p) a 50 °C y tiempo de reacción de 48 h, 4HMT = *heat moisture treatment*, almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 6HMT = *heat moisture treatment*, almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 4OPT = *osmotic pressure treatment*, suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 5EC EPI = enlaces cruzados con epíclorhidrina al 0,15%, tiempo de reacción de 12 h a 30 °C y pH 11,0. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar.

#### 4.3.2. Almidón modificado por la combinación dual del tratamiento hidrotérmico: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS y viceversa

Para la modificación por los tratamientos combinados hidrotérmico-EC con TMFS/TPFS y viceversa se seleccionaron los almidones modificados obtenidos en las experiencias 6, 8, 12 y 13EC T/T. Esto se debió a la formación de mayores niveles de FDT sin exceder el límite máximo de fósforo permitido para uso en alimentos. A estas muestras, se aplicaron el segundo tratamiento hidrotérmico (4ANN, 4HMT, 6HMT y 4OPT). Para modificar los almidones obtenidos en las experiencias de los tratamientos hidrotérmicos seleccionados 4ANN, 4HMT, 6HMT y 4OPT por el tratamiento de EC con TMFS/TPFS se aplicaron las condiciones de reacción correspondientes a las experiencias de 6, 8, 12 y 13EC T/T. En las Tablas 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15 se presentan los valores obtenidos de FDT para los tratamientos combinados.

**Tabla 4.12.** FDT en el AN, en el almidón de mandioca modificado por 4ANN, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.

Tratamiento	Muestra	FDT (%)
-	AN	2,55 ± 0,01 <sup>a*</sup>
H	4ANN	2,66 ± 0,08 <sup>a*</sup>
Q	6EC T/T	32,89 ± 0,08 <sup>i</sup>
Q	8EC T/T	25,53 ± 0,30 <sup>g</sup>
Q	12EC T/T	28,67 ± 0,88 <sup>h</sup>
Q	13EC T/T	35,90 ± 0,05 <sup>j</sup>
H-Q	4ANN-6 EC T/T	20,01 ± 2,69 <sup>d</sup>
H-Q	4ANN-8 EC T/T	19,05 ± 3,09 <sup>cd</sup>
H-Q	4ANN-12 EC T/T	21,17 ± 0,98 <sup>def</sup>
H-Q	4ANN-13 EC T/T	23,04 ± 0,66 <sup>efg</sup>
Q-H	6EC T/T-4ANN	13,28 ± 0,47 <sup>b</sup>
Q-H	8EC T/T-4ANN	16,84 ± 0,75 <sup>c</sup>
Q-H	12EC T/T-4ANN	20,08 ± 0,57 <sup>de</sup>
Q-H	13EC T/T-4ANN	22,84 ± 1,00 <sup>f</sup>

**Referencias:** H = hidrotérmico, Q = químico, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, AN = almidón de mandioca nativo, FDT = fibra dietaria total, 4ANN = *annealing* preparado a partir de una suspensión acuosa al 30 % (p/p) a 50 °C y tiempo de reacción de 48 h, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar. \* Valor promedio de cuatro determinaciones. Valores con diferentes supra índices presentan diferencias significativas (p < 0,05).

**Tabla 4.13.** FDT en el AN, en el almidón modificado por 4HMT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.

Tratamiento	Muestra	FDT (%)
-	AN	2,55 ± 0,01 <sup>a*</sup>
H	4HMT	2,79 ± 0,20 <sup>a*</sup>
Q	6EC T/T	32,89 ± 0,08 <sup>g</sup>
Q	8EC T/T	25,53 ± 0,30 <sup>e</sup>
Q	12EC T/T	28,67 ± 0,88 <sup>f</sup>
Q	13EC T/T	35,90 ± 0,05 <sup>h</sup>
H-Q	4HMT-6 EC T/T	18,85 ± 4,43 <sup>cd</sup>
H-Q	4HMT-8 EC T/T	13,04 ± 0,30 <sup>b</sup>
H-Q	4HMT-12 EC T/T	18,83 ± 0,41 <sup>cd</sup>
H-Q	4HMT-13 EC T/T	24,34 ± 1,05 <sup>e</sup>
Q-H	6 EC T/T-4HMT	17,13 ± 2,37 <sup>c</sup>
Q-H	8 EC T/T-4HMT	20,48 ± 1,49 <sup>d</sup>
Q-H	12 EC T/T-4HMT	19,28 ± 0,98 <sup>cd</sup>
Q-H	13 EC T/T-4HMT	24,87 ± 1,03 <sup>e</sup>

**Referencias:** H = hidrotérmico, Q = químico, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, AN = almidón de mandioca nativo, FDT = fibra dietaria total, 4HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar. \*Valor promedio de cuatro determinaciones. Valores con diferentes supra índices presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.14.** FDT en el AN, en el almidón modificado por 6HMT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.

Tratamiento	Muestra	FDT (%)
-	AN	2,55 ± 0,01 <sup>a*</sup>
H	6HMT	2,75 ± 0,06 <sup>a*</sup>
Q	6EC T/T	32,89 ± 0,08 <sup>e</sup>
Q	8EC T/T	25,53 ± 0,30 <sup>c</sup>
Q	12EC T/T	28,67 ± 0,88 <sup>d</sup>
Q	13EC T/T	35,90 ± 0,05 <sup>fg</sup>
H-Q	6HMT-6EC T/T	28,03 ± 2,84 <sup>d</sup>
H-Q	6HMT-8EC T/T	29,71 ± 1,43 <sup>d</sup>
H-Q	6HMT-12EC T/T	34,27 ± 1,20 <sup>ef</sup>
H-Q	6HMT-13EC T/T	41,44 ± 0,03 <sup>h</sup>
Q-H	6EC T/T-6HMT	27,78 ± 1,08 <sup>cd</sup>
Q-H	8EC T/T-6HMT	15,38 ± 1,79 <sup>b</sup>
Q-H	12EC T/T-6HMT	29,92 ± 0,40 <sup>d</sup>
Q-H	13EC T/T-6HMT	36,79 ± 1,27 <sup>g</sup>

**Referencias:** H = hidrotérmico, Q = químico, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, AN = almidón de mandioca nativo, FDT = fibra dietaria total, 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a

105 °C y tiempo de reacción de 5 h, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones  $\pm$  desvío estándar. \* Valor promedio de cuatro determinaciones. Valores con diferentes supra índices presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.15.** FDT en el AN, en el almidón modificado por 4OPT, modificado por 6, 8, 12 y 13EC T/T y modificado por la combinación dual de tratamientos.

Tratamiento	Muestra	FDT (%)
-	AN	2,55 $\pm$ 0,01 <sup>a*</sup>
H	4OPT	2,87 $\pm$ 0,07 <sup>a*</sup>
Q	6EC T/T	32,89 $\pm$ 0,08 <sup>h</sup>
Q	8EC T/T	25,53 $\pm$ 0,30 <sup>f</sup>
Q	12EC T/T	28,67 $\pm$ 0,88 <sup>g</sup>
Q	13EC T/T	35,90 $\pm$ 0,05 <sup>i</sup>
H-Q	4OPT-6 EC T/T	20,82 $\pm$ 2,88 <sup>cd</sup>
H-Q	4OPT-8 EC T/T	18,45 $\pm$ 2,02 <sup>b</sup>
H-Q	4OPT-12 EC T/T	19,34 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup>
H-Q	4OPT-13 EC T/T	23,28 $\pm$ 0,64 <sup>e</sup>
Q-H	6EC T/T-4OPT	21,07 $\pm$ 0,52 <sup>cde</sup>
Q-H	8EC T/T-4OPT	21,95 $\pm$ 1,12 <sup>de</sup>
Q-H	12EC T/T-4OPT	22,04 $\pm$ 0,87 <sup>de</sup>
Q-H	13EC T/T-4OPT	22,94 $\pm$ 1,42 <sup>de</sup>

**Referencias:** H = hidrotérmico, Q = químico, H-Q = hidrotérmico-químico, Q-H = químico-hidrotérmico, AN = almidón de mandioca nativo, FDT = fibra dietaria total, 4OPT= *osmotic pressure treatment* preparado a partir de una suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, EC-T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones  $\pm$  desvío estándar. \* Valor promedio de cuatro determinaciones. Valores con diferentes supra índices presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis estadístico de los resultados se muestra en los Anexos 8a, b, c y d. Se observó que la combinación del tratamiento H-Q de la experiencia 6HMT con las experiencias 8, 12 y 13EC T/T (Figura 4.4) causaron un efecto positivo de tipo sinérgico en la formación de FDT en el almidón de mandioca. Se observó un aumento significativo en relación al almidón modificado por el tratamiento individual conforme aumentó la concentración de reactivo de 10 % a 15 % manteniéndose la concentración de almidón (41,04 %). En términos de porcentajes, los incrementos de FDT correspondieron a un 16,37 %, 19,53 % y 15,50 % con respecto a los tratamientos 8, 12 y 13EC T/T, respectivamente.

Por un lado, la secuencia de combinación de los tratamientos Q-H, 12 y 13EC T/T-6HMT no produjeron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de FDT con respecto al correspondiente tratamiento químico. Sin embargo, se detectó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del contenido de FDT (comparado con el valor de FDT del almidón modificado por el correspondiente tratamiento químico) en las combinaciones 6EC T/T-6HMT y 8EC T/T-6HMT. La combinación del tratamiento 6HMT con el tratamiento 6EC T/T, independientemente de la secuencia de aplicación, presentó cantidades de FDT significativamente menores al tratamiento químico.

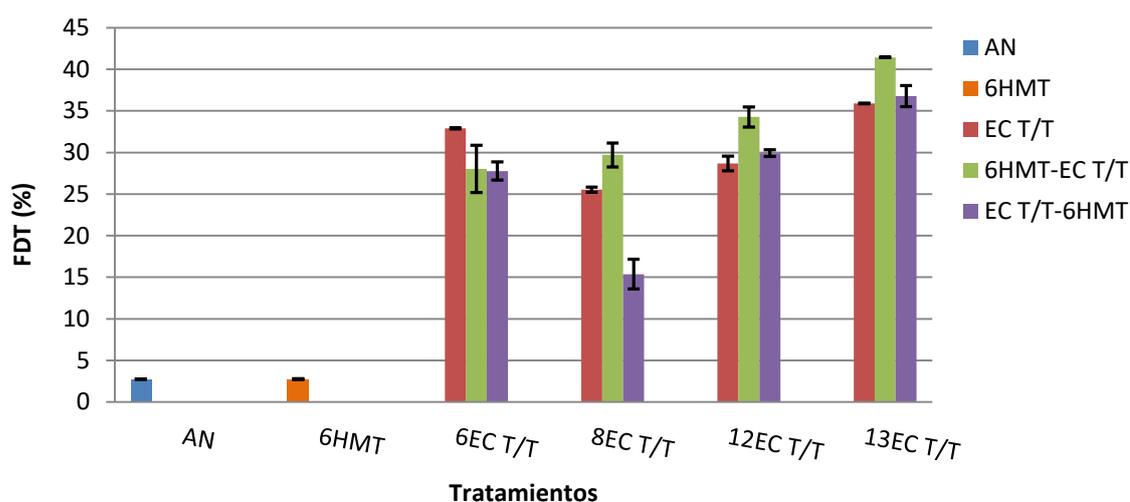
Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron, en general, que la secuencia de aplicación de tratamientos H-Q (en las condiciones de reacción empleadas) favoreció la formación de FDT en los almidones tratados.

En los tratamientos duales, se observó que la concentración de almidón utilizada para la reacción de EC con TMFS/TPFS fue un factor importante en los niveles de FDT alcanzado. Cuanto mayor fue la cantidad de almidón empleada en la reacción de EC T/T mayor fue la cantidad de FDT detectada en los almidones modificados. En las combinaciones de 6HMT-6EC T/T y 6HMT-12EC T/T, la única variable que afectó significativamente la FDT fue la cantidad de almidón utilizada para la reacción de EC. En la primera experiencia se utilizó menor cantidad de almidón (37,50 %) que en la segunda (41,04 %). En la segunda experiencia (6HMT-12EC T/T) se detectaron mayores niveles de FDT. Este efecto también fue reportado por Song *et al.* (2011) en el almidón de arroz modificado por la combinación del tratamiento hidrotérmico-químico de ANN-EC T/T.

La combinación de los tratamientos hidrotérmicos 4ANN, 4HMT y 4OPT con los tratamientos 6, 8, 12 y 13EC T/T, independientemente de la secuencia de aplicación, no causaron un efecto positivo en la formación de FDT con respecto al tratamiento químico (Figuras 4.5 (a), (b) y (c)). En todos los casos, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de FDT con respecto al tratamiento químico. En la mayoría de las experiencias, la secuencia de aplicación de los tratamientos no tuvo una influencia significativa en la magnitud del descenso. Las condiciones excepcionales fueron 6EC T/T-4ANN, 4HMT-8EC T/T, 4OPT-8EC T/T y 4OPT-12EC T/T en las cuales las disminuciones del contenido de FDT fueron más importantes. En las mismas, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con relación a la inversa de los correspondientes tratamientos.

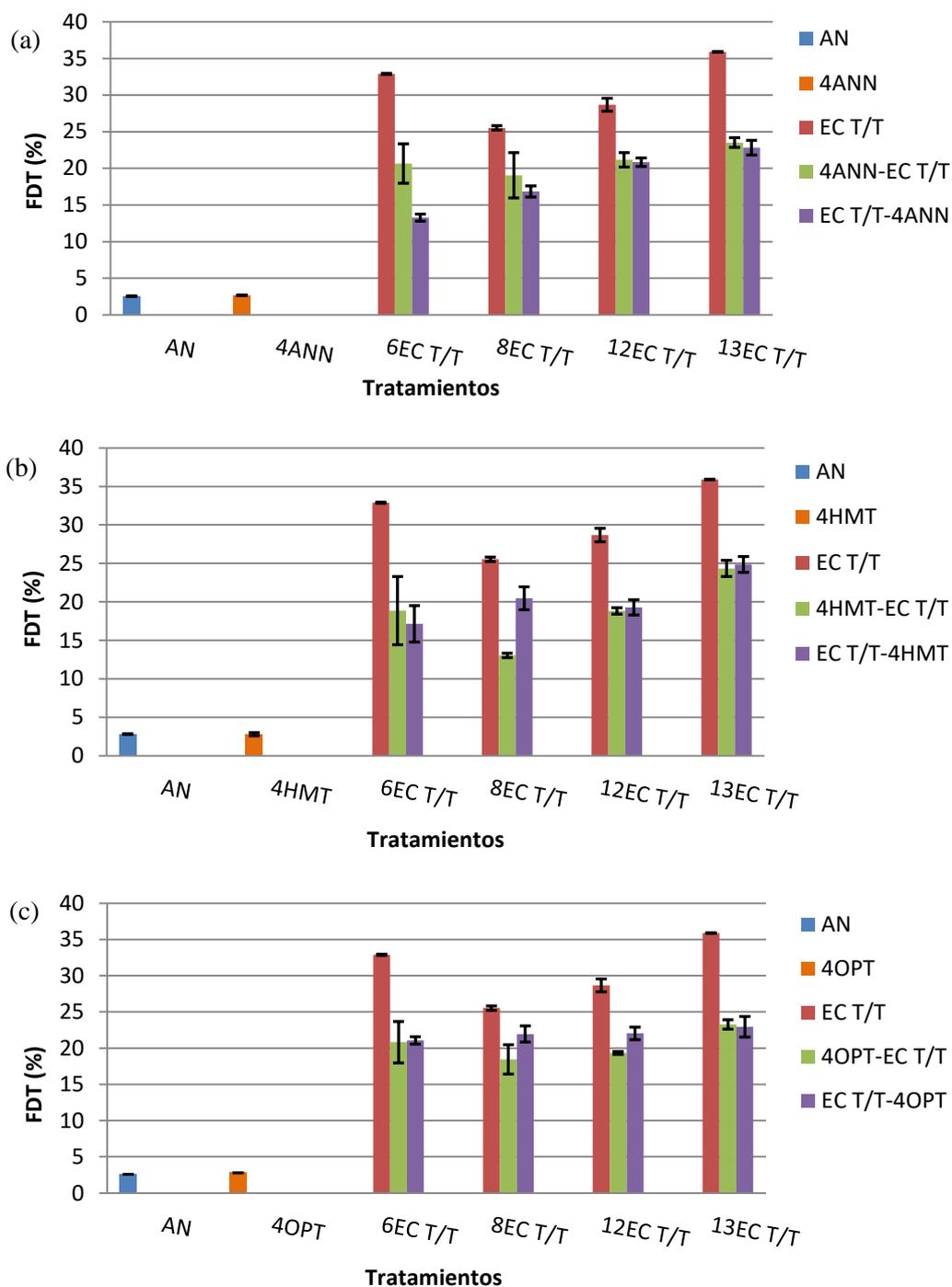
A diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, se observó en la bibliografía que la combinación de ANN (50 % de almidón a 50 °C durante 12 h) con la modificación con EC con TMFS/TPFS (12 % de TMFS/TPFS a 45 °C, pH 11,8 durante 3 h) condujo a un incremento en el contenido de AR en el almidón de arroz (medido por el método 991.43 de la AOAC) comparado con los tratamientos individuales (Song *et al.*, 2011). En el trabajo, se sugiere que el efecto observado se debería al reordenamiento y acercamiento entre las moléculas de amilopectina y a la creación de una membrana (por los EC) tipo barrera en el gránulo de almidón de arroz que dificultarían la acción de las enzimas posterior al tratamiento de ANN.

La combinación 6HMT-13EC T/T, en la que se utilizó la mayor cantidad de reactivo (15 % de TMFS/TPFS) y de almidón (41,04 %), condujo a la mayor formación de FDT (41,44 %) presentando diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 % con respecto a todos los tratamientos (Anexo 8e) (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Comparación de valores de FDT del AN y de los almidones de mandioca modificados por el tratamiento hidrotérmico 6HMT, los tratamientos 6, 8, 12 y 13EC T/T y sus combinaciones.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 4OPT= *osmotic pressure treatment* preparado a partir de una suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, EC-T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar.



**Figura 4.5.** Comparación de valores de FDT del AN y de los almidones de mandioca modificados por los tratamientos (a) 4ANN, (b) 4HMT, (c) 4OPT, por los tratamientos 6, 8, 12, 13EC T/T y sus combinaciones.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 4ANN = *annealing* preparado a partir de una suspensión acuosa al 30 % (p/p) a 50 °C y tiempo de reacción de 48 h, 4HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, 4OPT = *osmotic pressure treatment* preparado a partir de una suspensión de 100 g de almidón en 200 mL de una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 105 °C y tiempo de reacción de 2 h, EC-T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) a 45 °C, pH 11,0 y tiempo de reacción de 3 h, 6EC T/T = 12,83 % de T/T y 37,50 % de almidón, 8EC T/T = 10,00 % de T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % de T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15,00 % de T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones ± desvío estándar.

#### 4.4. CONTENIDO DE FÓSFORO Y GS DEL ALMIDÓN MODIFICADO POR LA COMBINACIÓN DUAL DE TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICO-EC CON TMFS/TPFS Y VICEVERSA

En la Tabla 4.16 se observan los valores de fósforo y grado de sustitución de los almidones seleccionados de la combinación dual 6HMT-EC con TMFS/TPFS que presentaron mayor contenido de FDT que el almidón modificado por el correspondiente tratamiento químico. La ecuación de la recta de la curva estándar de fósforo fue  $Y = 0,0252381 + 15,6667X$  con  $R^2 = 99,95 \%$ , en la que  $Y =$  absorbancia y  $X =$  fósforo (mg) (Anexo 9a).

El contenido de fósforo, en todos los tratamientos se encontró por debajo del límite máximo permitido para un almidón modificado con la mezcla TMFS/TPFS de grado alimenticio.

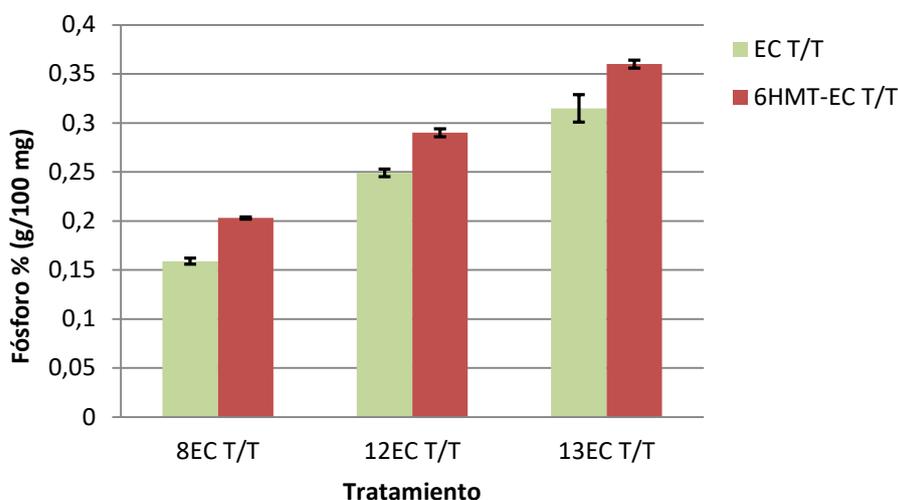
**Tabla 4.16.** Contenido de fósforo y grado de sustitución en el almidón de mandioca modificado por los tratamientos combinados 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T.

Muestra (tratamiento Q-H)	Fósforo % (g/100g)	Grado de sustitución ( $\times 10^{-4}$ )
6HMT-8EC T/T	0,203 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	103,05 $\pm$ 0,375 <sup>a</sup>
6HMT-12EC T/T	0,290 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	149,66 $\pm$ 2,270 <sup>b</sup>
6HMT-13EC T/T	0,360 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	187,19 $\pm$ 2,284 <sup>c</sup>

**Referencias:** Q-H = químico-hidrotérmico, 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1), 8EC T/T = 10 % T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15 % T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desvío estándar de dos determinaciones. Valores con diferentes supra índices en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En estos tratamientos la única variante fue la concentración (%) de TMFS/TPFS utilizado. En todos los casos la concentración de almidón empleada fue de 41,04 %. Se observó que el contenido de fósforo y GS de los almidones modificados por la combinación de tratamientos, siguieron la misma tendencia de los almidones modificados por los tratamientos de EC con TMFS/TPFS. Estos presentaron un incremento significativo del contenido de fósforo y GS con el aumento de la concentración de TMFS/TPFS (Anexo 9b y c). La combinación 6HMT-EC T/T produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del contenido de fósforo con respecto al correspondiente tratamiento químico (Figura 4.6) (Anexo 9b). El incremento porcentual

de fósforo para los tratamientos 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T fue de 27,67 %, 16,47 % y 14,29 %, respectivamente.



**Figura 4.6.** Contenido de fósforo de los almidones de mandioca modificados por los tratamientos 8, 12 y 13EC T/T y por las combinaciones 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T y 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1), 8EC T/T = 10 % T/T y 41,04 % de almidón, 12EC T/T = 12,83 % T/T y 41,04 % de almidón, 13EC T/T = 15 % T/T y 41,04 % de almidón. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desvío estándar de dos determinaciones.

La aplicación del HMT produce, en el interior del gránulo, un reordenamiento estructural por disrupción de la estructura cristalina y disociación de la doble hélice en la región amorfa sin que se produzca una alteración de la estructura granular (Gunaratne & Hoover, 2002). La modificación por EC induce a la formación de uniones intra e inter moleculares estabilizando y reforzando la estructura del gránulo (Acquarone & Rao, 2003). La formación de AR y FDT mediante EC, por el uso de TMFS/TPFS, va acompañado de un elevado contenido de fósforo debido a la formación principalmente de fosfatos de dialmidón fosfatados (Sang *et al.*, 2007). En este trabajo, en coincidencia con otros investigadores (Sang *et al.*, 2007; Woo & Seib 2002), se encontró una correlación positiva entre la concentración de TMFS/TPFS, el contenido de fósforo y la FDT para una misma concentración de almidón (Anexo 9d). Los resultados de este trabajo podrían indicar que la cantidad de almidón utilizado en la reacción y el tratamiento de 6HMT previo al de EC con TMFS/TPFS contribuyeron a la formación de un mayor número de EC por ésteres de fosfatos.

Coincidiendo con los resultados del presente trabajo, el aumento en el contenido de fósforo en el almidón modificado por HMT-EC con TMFS/TPFS, en comparación al contenido de fósforo en el almidón modificado por EC con TMFS/TPFS, también fue reportado por Park *et al.* (2018). Estos autores sugieren que el HMT facilita el ingreso del reactivo al gránulo de almidón. Además, observaron tal efecto en el almidón de maíz céreo modificado con una concentración de TMFS/TPFS de 10 % y mismas condiciones de reacción que en el presente trabajo. Cabe destacar que el HMT fue realizado con 30 % de humedad a 120 °C durante tiempos de 1, 3 y 5 h.

La menor formación de FDT en la mayoría de las experiencias en la que se aplicó el HMT como segundo tratamiento podría explicarse por un mayor poder de hinchamiento del gránulo de almidón y sensibilidad a las enzimas digestivas. Chung *et al.* (2008) proponen que dicho efecto se produciría por disminución del empaquetamiento en el interior del gránulo al producirse un descenso en el número de EC, generados por el reactivo, entre las moléculas. Park *et al.* (2018) observaron que cuando el HMT se realiza posteriormente a la modificación por EC con TMFS/TPFS se produce una disminución del contenido de fósforo en comparación con el correspondiente tratamiento de EC. Esto sugiere que el HMT causaría la degradación de un determinado número de los enlaces covalentes con fósforo generado por el reactivo en la molécula de almidón.

El mayor contenido de FDT obtenido por 6HMT-13EC T/T, en comparación con 4HMT-13EC T/T, podría estar asociado a un mayor tiempo de reacción. Se ha reportado que el tiempo de modificación empleado en el HMT afecta el contenido de fósforo en la modificación dual. Es decir, cuanto mayor es el tiempo de modificación por el HMT, previo al tratamiento de EC con TMFS/TPFS, mayor es el contenido de fósforo (Park *et al.*, 2018). Además, se demostró que el aumento de fósforo en el almidón modificado por EC con TMFS/TPFS acompaña al incremento de FDT (Woo & Seib, 2002).

Los resultados de FDT obtenidos en este trabajo difieren de los reportados por Park *et al.* (2018). Estos investigadores observaron un aumento en el contenido de AR determinado por el método de Englyst *et al.* (1992), en el almidón céreo de maíz, con la secuencia de tratamientos EC T/T-HMT. Esto se debería a las fuertes interacciones de fósforos residuales y a la producción de una estructura térmicamente estable del almidón luego de la aplicación del tratamiento.

Estos hallazgos ponen en evidencia que las propiedades químicas y funcionales logradas en los almidones modificados dependen de numerosos factores: el origen

botánico, extensión de la sustitución, distribución de la sustitución entre otras (Singh *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el almidón modificado por el tratamiento 6HMT-13EC T/T fue seleccionado para la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas debido a la presencia de un mayor contenido de FDT entre las muestras tratadas.

#### **4.5. FDT EN EL ALMIDÓN MODIFICADO POR EL TRATAMIENTO DUAL 6HMT-13EC T/T**

El contenido de FDT, obtenido por método 985.29 de la AOAC (2012) sin modificaciones, en el almidón modificado por el tratamiento 6HMT-13EC T/T fue de  $39,4 \pm 1,27$  % (promedio  $\pm$  desvío estándar de dos determinaciones). Este valor no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al obtenido mediante el método original con modificaciones (Anexo 10a).

Actualmente, no existen reportes de niveles FDT en almidón de mandioca modificado por el empleo de la combinación de dichos tratamientos. Se ha informado un contenido de AR de 27,8 % medido por el método de Englyst *et al.* (1999) en el almidón de mandioca modificado por esterificación con OSA al 3 % (Han & BeMiller, 2007). Brumovsky *et al.* (2009) obtuvieron valores muy bajos de FDT (0,8-1,3 %) en el almidón de mandioca modificado por el HMT utilizando el método 991.43 de la AOAC para FDT. Se ha informado una digestibilidad del 74,4 % (25,6 % de resistencia) del almidón de mandioca modificado por EC con EPI al 0,25 % determinado por el método de Singh *et al.* (1982) modificado (Jyothi *et al.*, 2006).

En el almidón de arroz modificado por el empleo de la combinación ANN-EC con TMFS/TPFS se observó un contenido de AR de 69,37 % evaluado por el método 991.43 de la AOAC (Song *et al.*, 2011). Park *et al.* (2018) reportaron que la combinación de EC con TMFS/TPFS-HMT utilizado para modificar del almidón céreo de maíz condujo a niveles de AR entre 28,7-41,5 % en el almidón crudo y entre 23,3-25 % en el almidón gelatinizado determinado por el método de Englyst *et al.* (1992).

Conforme a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede inferir que la modificación dual 6HMT-13EC T/T del AN resultó efectiva para la formación de FDT causando una disminución importante de la digestibilidad *in vitro*.

## 4.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN MODIFICADO CON MAYOR CONTENIDO DE FDT

### 4.6.1. Determinación del pH y acidez titulable

Los resultados del pH y acidez titulable del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T se presentan en la Tabla 4.17 (Anexo 11a y b).

**Tabla 4.17.** Valores del pH y acidez titulable del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

Muestra	pH	Acidez titulable (meq ácido láctico/g de almidón)
AN	6,42 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,3×10 <sup>-3</sup> ± 0,2×10 <sup>-3a</sup>
6HMT-13EC T/T	7,55 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,9×10 <sup>-3</sup> ± 0,6×10 <sup>-3a</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de dos determinaciones. Los valores con diferentes supra índices en una misma columnas presentan diferencia significativas ( $p < 0,05$ ).

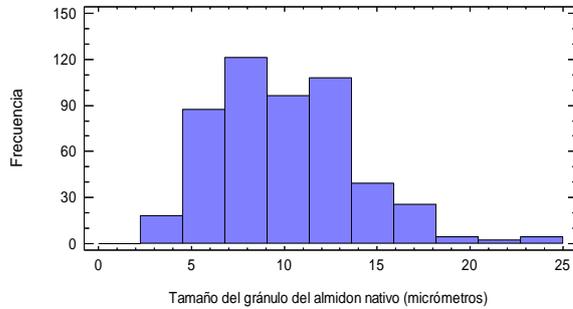
El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una muestra y la acidez titulable es una medida de la cantidad de ácido presente. Los valores de referencia para el AN, de acuerdo a Aristizábal & Sánchez (2007), son: acidez titulable =  $2,2 \times 10^{-3}$ - $5 \times 10^{-3}$  meq de ácido láctico/g de almidón y pH = 6,0-6,5.

Los resultados de pH y acidez titulable para el AN y la acidez titulable del almidón modificado se encuentran dentro de los valores de referencia. El valor de pH del AN se halló próximo a los valores informados por Kumoro *et al* (2010) y Gutiérrez *et al.* (2014) de 6,56 y 6,8, respectivamente. El almidón de mandioca, clasificado como de calidad grado 1 por el *Thai Industrial Standard Institute* (1978), debe presentar pH de 4,5-7,0 (Sriroth *et al.*, 2000). Esto permite inferir que el AN cumpliría con este requisito.

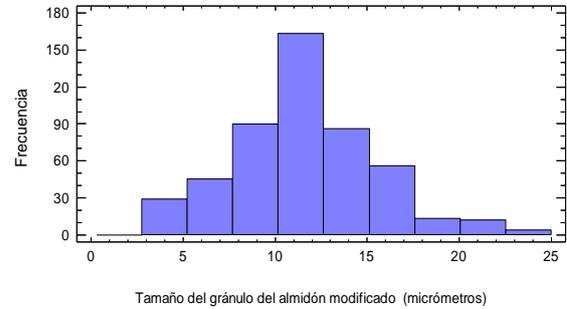
La combinación de tratamientos aplicados al AN causó un ligero incremento del pH tendiendo a la neutralidad. Este resultado coincide con Gutiérrez *et al.* (2014) quienes también observaron un ligero aumento del pH del almidón de mandioca modificado con TMFS (pH = 7,13).

#### 4.6.2. Distribución del tamaño de los gránulos de almidón

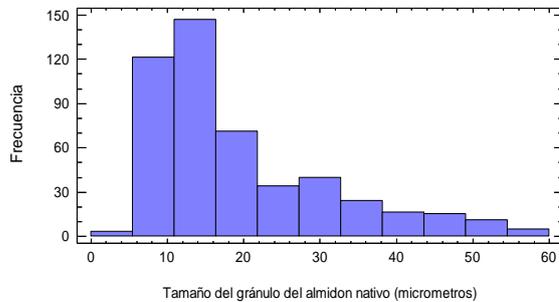
La distribución del tamaño de los gránulos del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C obtenidas mediante microscopía óptica se presenta en histogramas de frecuencia (Figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11).



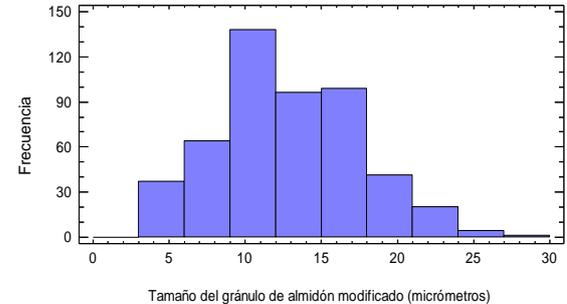
**Figura 4.7.** Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca nativo a 25 °C.



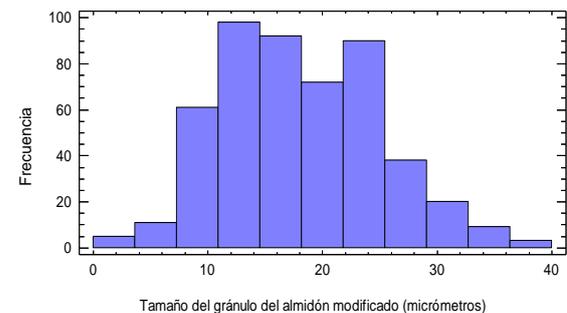
**Figura 4.8.** Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 25 °C.



**Figura 4.9.** Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca nativo a 65 °C.



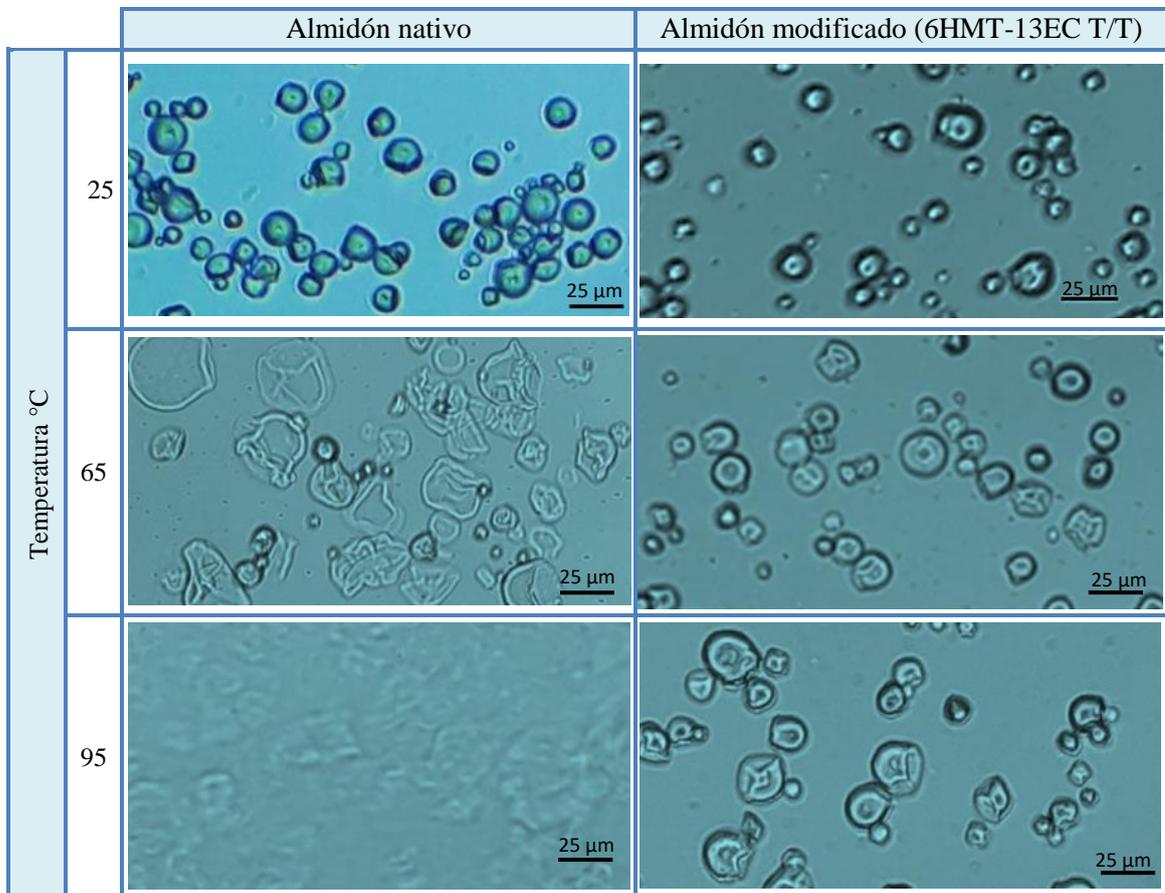
**Figura 4.10.** Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 65 °C.



**Figura 4.11.** Distribución de tamaños de gránulos del almidón de mandioca modificado a 95 °C.

Se observó una distribución bimodal del tamaño de los gránulos del AN a 25 °C. El AN a 25 °C puede tener una distribución de tamaño de gránulo unimodal o bimodal presentándose esta última en cultivos de más de 16 meses (Sriroth *et al.*, 1999; Sívoli *et al.*, 2012). El almidón modificado a 25 °C presentó una distribución unimodal tornándose bimodal con el calentamiento a 95 °C. Chatakanonda *et al.* (2000b) reportaron similares resultados en la distribución del tamaño del gránulo de arroz

modificado con TMFS/TPFS durante el calentamiento. En la Figura 4.12 se observan fotomicrografías de los gránulos del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C.



**Figura 4.12.** Fotomicrografías al microscopio óptico de los gránulos del almidón de mandioca nativo y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C (aumento 500 X).

**Referencias:** 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón).

Se utilizó la clasificación propuesta por Lindeboom *et al.* (2004) debido a que no existe en la bibliografía una categorización precisa del tamaño de los gránulos de almidón. Se agrupó la distribución del tamaño de los gránulos en cuatro categorías: muy pequeños (< 5 µm), pequeños (5-10 µm), medianos (10-20 µm) y grandes (> 25 µm). En la Tabla 4.18 se observan los valores de los tamaños, la distribución porcentual y el volumen promedio de los gránulos del AN y del almidón modificado por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C.

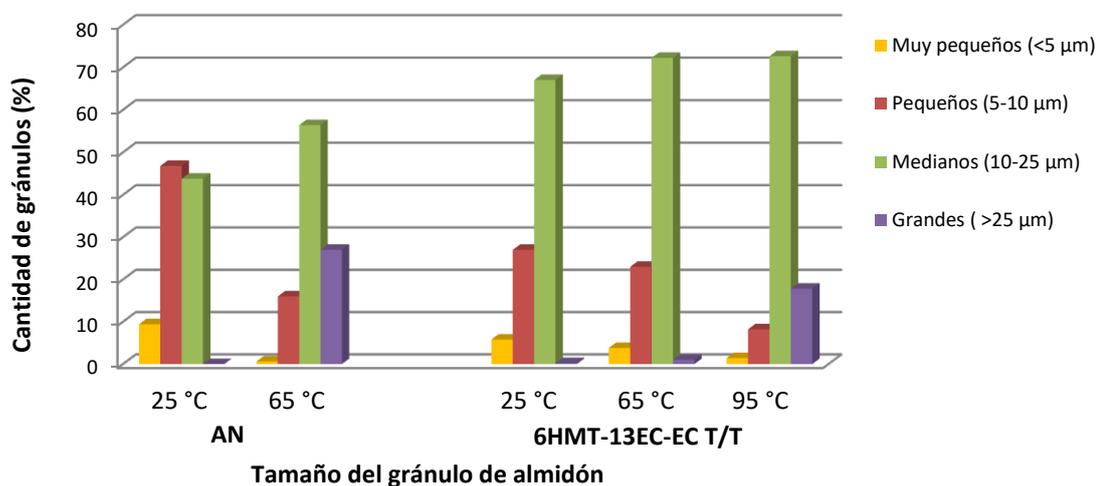
**Tabla 4.18.** Tamaños, distribución porcentual, medias, medianas, rango y volumen promedio de los gránulos del almidón de mandioca nativo y del almidón de mandioca modificado por el tratamiento dual 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C.

Muestra	AN		6HMT-13EC T/T		
	25 °C	65 °C	25 °C	65 °C	95 °C
<b>Muy pequeños</b> < 5 µm (%)	9,40	0,60	5,80	3,80	1,40
<b>Pequeños</b> 5-10 µm (%)	46,80	16,00	27,00	23,00	8,20
<b>Medianos</b> 10-25 µm (%)	43,80	56,40	67,00	72,20	72,60
<b>Grandes</b> > 25 µm (%)	0,00	27,00	0,20	1,00	17,8
<b><math>\bar{X} \pm DE</math></b> (µm)	10,06 ± 3,82	20,82 ± 14,21	11,70 ± 3,79	13,22 ± 4,67	18,62 ± 6,87
<b>Mediana</b> (µm)	9,60	15,6	12,00	13,3	18,00
<b>Rango</b> (µm)	3,60 - 24,00	3,60 - 79,20	3,60 - 27,60	3,60 - 27,60	3,60 - 40,80
<b>Volumen</b> $\bar{X}$ (µm <sup>3</sup> )	533,08	4725,42	838,60	1209,74	3380,16

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón),  $\bar{X} \pm DE$  = promedio ± desvío estándar de 500 mediciones.

En el AN a 25 °C, se observó un mayor porcentaje de gránulos de tamaño pequeño (mediana: 9,60 µm, media: 10,06 µm). El valor de la media coincidió con los valores hallados por Defloor *et al.* (1998), Anggraini *et al.* (2009) y Safo-Kantanka & Owusu-Nipah (1992) para el gránulo de almidón de mandioca de diferentes genotipos en el rango de 9,5-12,7 µm, 7,7-10,8 µm y 9,96-11,21 µm, respectivamente. El valor medio hallado en este trabajo fue menor a los valores reportado por Medina & Salas (2008), Gutiérrez *et al.* (2014), Mishra & Rai (2006), Hernández-Medina *et al.* (2008) y Sriroth *et al.* (1999). En ellos, las medias fueron de 10,38; 11,4; 15; 16,50 y 15 µm, respectivamente. El tamaño del gránulo del AN presentó un rango de 3,6-24 µm. Este valor se encontró dentro del rango esperado de 2-32 µm reportado por diversos investigadores (Zhu, 2015). En la Figura 4.13 se presenta la distribución porcentual de los tamaños de los gránulos de almidón en las categorías de muy pequeños, pequeños, medianos y grandes. Con el tratamiento térmico se observó que en el AN y en el almidón modificado se produjo una disminución de la cantidad de gránulos de las categorías muy pequeños (< 5 µm) y pequeños (5-10 µm) y un incremento de la cantidad de gránulos de la categoría medianos (10-25 µm) y grandes (> 25 µm). De

acuerdo a Van Hung & Morita (2005a) y Majzooobi *et al.* (2009), los gránulos de mayor tamaño son principalmente afectados por los agentes formadores de EC. En el presente trabajo, en concordancia con los autores antes mencionados, se observó (en el almidón modificado) que el mayor porcentaje de incremento de tamaño resultó a expensas de los gránulos de las categorías medianos y grandes.



**Figura 4.13.** Distribución porcentual de los gránulos de AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T a 25 °C, 65 °C y 95 °C en las categorías de muy pequeños, pequeños, medianos y grandes.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón).

El tamaño, su distribución y la morfología del gránulo de almidón son propiedades funcionales importantes de los almidones. El tamaño del gránulo de almidón depende de varios factores como el origen botánico, condiciones de crecimiento y edad del cultivo al momento de la cosecha. Las sequías, durante la etapa inicial del crecimiento, causan disminución del tamaño del gránulo. Estos permanen pequeños a lo largo de todo su crecimiento sin poder recuperarse aún con un adecuado suministro de lluvia en la etapas tardías (Santisopasri *et al.*, 2001). El menor tamaño de los gránulos de almidón durante la época de sequía se atribuye a un mayor porcentaje de gránulos pequeños (Defloor *et al.*, 1998). Teerawanichpan *et al.* (2008) observaron que el inicio del cultivo de la mandioca en la estación húmeda conduce a la formación de gránulos de almidón de mayor tamaño que en el inicio en la estación seca. La edad de la cosecha del cultivo influye en el tamaño del gránulo produciéndose un aumento durante los seis primeros meses del cultivo (Moorthy & Ramanujam, 1986, Teerawanichpan *et al.*, 2008). En esa etapa, el almidón es sintetizado sugiriéndose una relación entre el

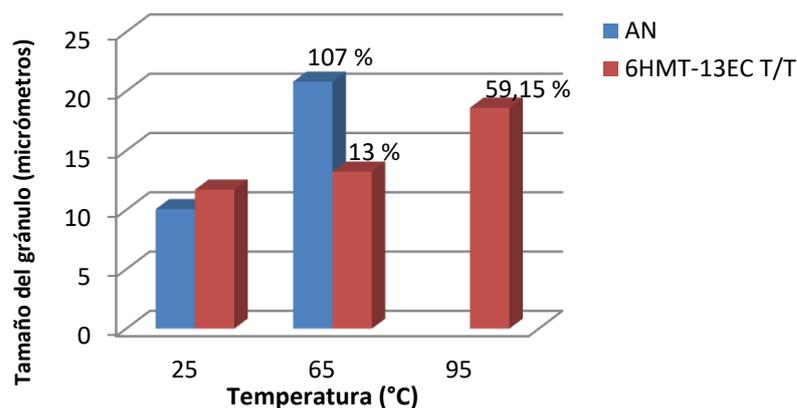
tamaño del gránulo y el metabolismo de la planta (Asaoka *et al.*, 1993). El tamaño de los gránulos de almidón varía a través de las estaciones del año debido a posibles diferencias en las condiciones ambientales durante el periodo de crecimiento relacionadas con las lluvias (Asaoka *et al.*, 1992).

El tratamiento de modificación, al que fue sometido el AN, produjo un aumento en el tamaño medio del gránulo de almidón. El tamaño del gránulo del almidón modificado a 25 °C presentó un rango de 3,6-27,60  $\mu\text{m}$ , una media de 11,70  $\mu\text{m}$  y una mediana de 12,00  $\mu\text{m}$  siendo estas últimas significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) a la media y a la mediana del AN a 25 °C (Anexo 12a y b). Carmona-García *et al.* (2009), en concordancia a los resultados del presente trabajo, también observaron un incremento en los valores del tamaño del gránulo de almidón de banana modificado por EC con TMFS/TPFS. El valor de la media del tamaño del gránulo de almidón modificado por 6HMT-13EC T/T se halló cercano al valor de la media reportado para el gránulo de almidón de mandioca modificado con EC con TMFS por Gutiérrez *et al.* (2014) de  $12,1 \pm 1,3 \mu\text{m}$ . Estos últimos autores también evidenciaron un incremento del tamaño del gránulo con respecto al almidón nativo (11,4  $\mu\text{m}$ ). Por otro lado, Gunaratne & Hoover (2002) y Andrade *et al.* (2014) no observaron cambios en el tamaño o en la forma de los gránulos de almidón de mandioca modificado con el HMT. El tratamiento fue realizado por los primeros autores con un 30 % de humedad a 100 °C durante 10 h y por los segundos autores a 10, 20 y 30 % de humedad a 120 °C durante 60 min. Similares observaciones fueron hechas en almidón de papa, *taro*, *new cocoyam*, *true yam*, maíz, trigo, *finger millet*, arroz, *canna* y *yam bean* (Gunaratne & Hoover, 2002; Hoover & Manuel, 1996a; Hoover & Vasanthan, 1994; Adebawale *et al.*, 2005; Khunae *et al.*, 2007; Watcharatewinkul *et al.*, 2009; Adebawale *et al.*, 2009). En arroz de bajo contenido de amilosa se evidenció una distensión de la superficie granular al realizar el tratamiento en presencia de un 25 % de humedad (da Rosa Zavareze *et al.*, 2010). Singh *et al.* (2011) reportaron una disminución del tamaño del gránulo de almidón de sorgo con el HMT evidenciándose principalmente el efecto con el tratamiento a 40 % de humedad.

Los resultados hallados en este trabajo indicarían que el cambio de tamaño del gránulo del almidón de mandioca modificado estaría asociado principalmente al tratamiento de EC aplicado. Se ha informado por diferentes investigadores que los tratamientos de EC con TMFS, o con mezclas de TMFS/TPFS, causan modificaciones en la estructura y superficie de los gránulos del almidón de maíz, banana, papa, trigo y

avena. En estas muestras se observó rugosidad y zonas negras en la superficie (Koo *et al.*, 2010; Carmona-García *et al.*, 2009) y un incremento del área de superficie y porosidad (Fortuna *et al.*, 1998). Esto último mejoraría la absorción de agua fría (Sitohy *et al.*, 2000). Las zonas negras podrían tratarse de ligeras fragmentaciones y formación de profundas ranuras en los gránulos de almidón (Singh *et al.*, 2007). Estudios en almidón de maíz, papa y arroz, fosforados con fosfato mono y disódico, mostraron que el tamaño del gránulo del almidón aumenta con el grado de sustitución por los grupos (Sitohy & Ramadan, 2001). El mayor efecto se observó en las muestras de almidón de arroz y maíz. Este resultado se debería probablemente a que la sustitución en el interior de los gránulos modificados genera fuerzas de repulsión incrementando los espacios intra e inter moleculares y permite una mayor absorción de moléculas de agua (Sitohy & Ramadan, 2001).

El tratamiento térmico a 65 °C condujo a un mayor incremento del tamaño medio de los gránulos del AN (107 %) en contraste con el incremento observado en el almidón modificado a la misma temperatura (13 %) (Figura 4.14). A 95 °C, los gránulos del AN se desintegraron imposibilitando la medición del tamaño mientras que los gránulos del almidón modificado conservaron su morfología. El aumento del tamaño medio del almidón modificado a 95 °C fue de 59,15 % con respecto al almidón modificado a 25 °C. Este aumento resultó menor al incremento producido en el tamaño de los gránulos del AN a 65 °C (Figura 4.14). El tratamiento restringió el aumento del tamaño del gránulo de almidón permitiéndole conservar su integridad a altas temperaturas. Similares resultados fueron reportados por Wongsagonsup *et al.* (2014) y Chatakanonda *et al.* (2000b) en almidón de mandioca y arroz (modificados por EC con TMFS/TPFS), respectivamente. Chatakanonda *et al.* (2000b) reportaron un retardo en la temperatura de inicio del incremento de tamaño de los gránulos de almidón y un menor aumento con respecto al almidón nativo. La integridad de los gránulos se incrementa con el aumento de la concentración de TMFS/TPFS utilizado en la modificación química (Wongsagonsup *et al.*, 2014). La mayor la cantidad de grupos fosfatos unidos prevendrían la formación de puentes de hidrogeno limitando la inclusión de moléculas de agua (Sitohy & Ramadan, 2001). La introducción de grupos fosfato, mediante enlaces covalentes, restringiría la movilidad molecular en los gránulos limitando su hinchamiento al reducir las interacciones con las moléculas de agua (Majzoobi *et al.*, 2009).



**Figura 4.14.** Incremento porcentual del tamaño medio de los gránulos del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T a 65 °C y 95 °C con respecto a los tamaños a 25 °C.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón).

#### 4.6.3. Poder de hinchamiento, solubilidad e índice de absorción de agua del almidón

Los resultados del PH, % SOL e IAA se observan en las Tablas 4.19, 4.20 y 4.21 y en las Figuras 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 y 4.19, respectivamente.

En el AN se observó que el PH, % SOL e IAA aumentaron con el incremento de la temperatura presentándose un pronunciado aumento a partir de 55 °C. Esto podría deberse a que con el aumento de la temperatura se produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares en la región amorfa de los gránulos de almidón. Esto permite la absorción de agua en forma progresiva resultando en un continuo hinchamiento del gránulo (Mishra & Rai, 2006) y un rápido aumento de la solubilización por sobre la temperatura de gelatinización (Park *et al.*, 2018). La baja solubilidad a temperaturas inferiores a 55 °C puede ser atribuida a la estructura cristalina de los gránulos de almidón y a los puentes de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilo entre las moléculas (Eliasson, 2017).

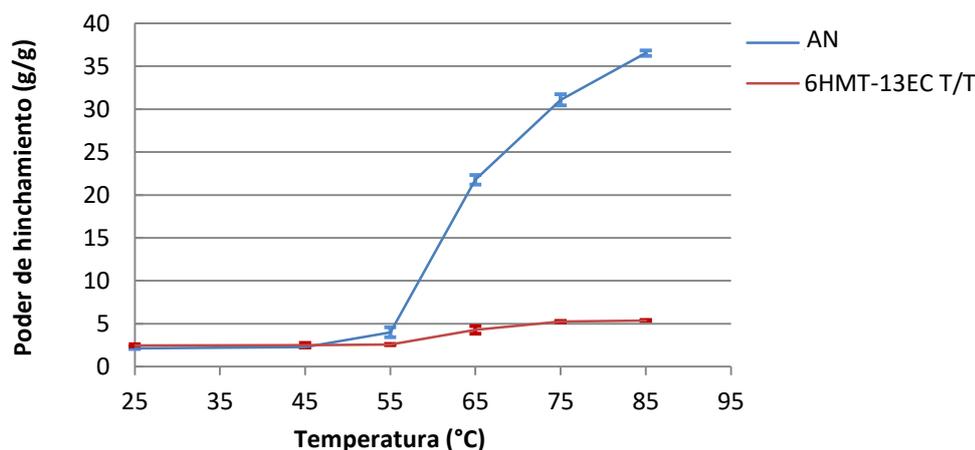
El almidón modificado presentó valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ), con escasa variación del PH, % SOL e IAA, en casi todo el rango de temperatura, comparado con el AN (Anexo 13a, b y c) evidenciando una fuerte interacción entre las moléculas en el interior del gránulo. En el almidón modificado se detectó un ligero incremento del PH e IAA a una temperatura mayor a 55 °C alcanzando un valor medio de 4,30 g/g a 65 °C en ambas determinaciones y valores medios de 5,38 y 5,31 g/g a 85 °C, respectivamente. Estos valores son significativamente menores ( $p < 0,05$ ) a los

valores hallados en el AN (Anexo 13a y b). El AN a 85 °C presentó un PH de 36,53 g/g y un IAA de 29,85 g/g. El almidón modificado no presentó variaciones en el % SOL hasta los 75 °C. Luego, se detectó un ligero incremento con un valor medio máximo de 1,33 % a 85 °C mientras que en el AN el valor medio máximo fue de 18,60 % a 85 °C. En las pruebas de múltiple rangos se observó que a temperaturas mayores a 45 °C los valores del PH e IAA del almidón modificado son significativamente menores a los valores del AN con un nivel de confianza del 95 %. Mientras que los valores del % SOL resultaron ser significativamente menores en todo el rango de temperatura estudiado.

**Tabla 4.19.** Poder de hinchamiento a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

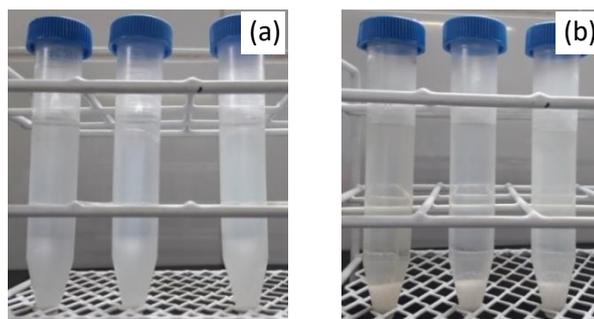
Poder de hinchamiento (g/g)		
Temperatura (°C)	Muestra	
	AN	6HMT-13EC T/T
25	2,11 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,13 <sup>b</sup>
45	2,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,27 <sup>a</sup>
55	4,01 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,59 ± 0,07 <sup>b</sup>
65	21,76 ± 0,55 <sup>a</sup>	4,31 ± 0,44 <sup>b</sup>
75	31,09 ± 0,64 <sup>a</sup>	5,26 ± 0,07 <sup>b</sup>
85	36,53 ± 0,32 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,06 <sup>b</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo; 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones. Los valores con diferentes supra índices en una misma fila presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.15.** Poder de hinchamiento a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media de tres determinaciones ± desvío estándar.

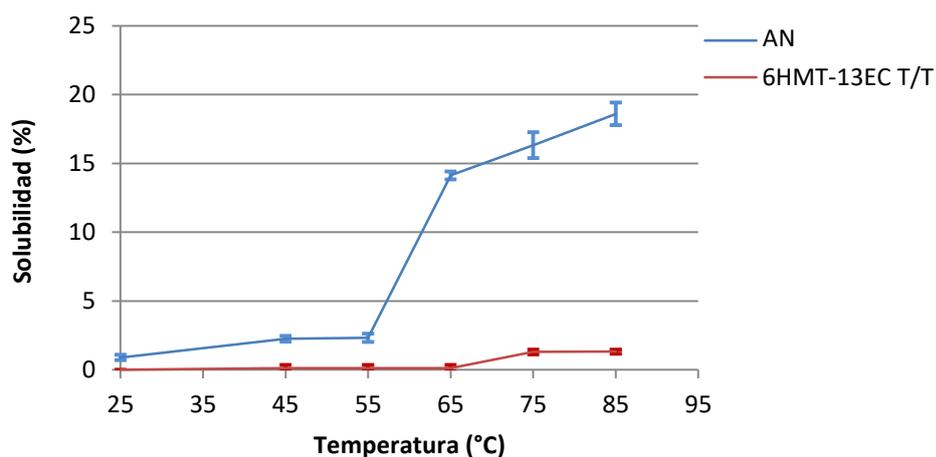


**Figura 4.16.** Tubos con la pasta de almidón luego del centrifugado a 65 °C: (a) AN y (b) almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Tabla 4.20.** Solubilidad a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

Solubilidad (%)			
Temperatura (°C)	Muestra	AN	6HMT-13ECT/T
25		0,90 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
45		2,27 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,23 <sup>b</sup>
55		2,33 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,23 <sup>b</sup>
65		14,13 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,23 <sup>b</sup>
75		16,33 ± 0,93 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,17 <sup>b</sup>
85		18,60 ± 0,82 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,15 <sup>b</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones. Los valores con diferentes supra índices en una misma fila presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



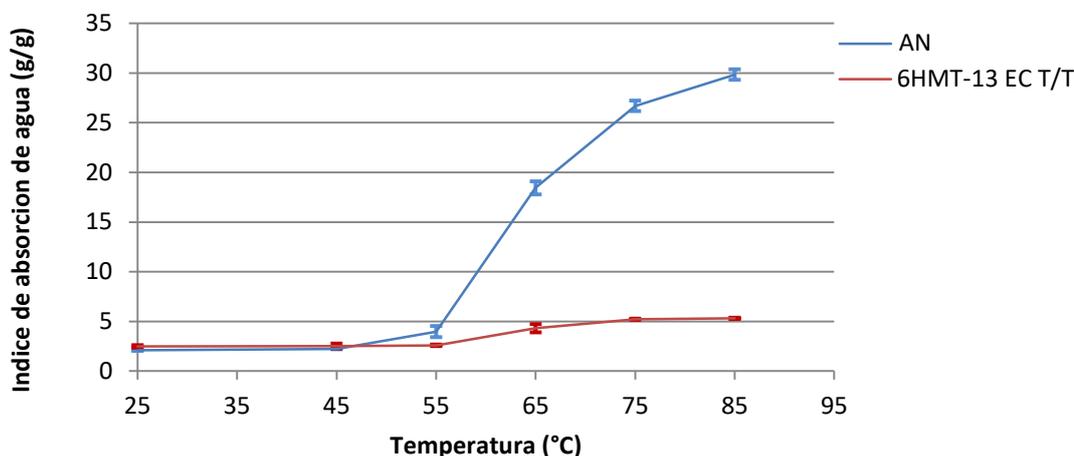
**Figura 4.17.** Solubilidad a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo; 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones.

**Tabla 4.21.** Índice de absorción de agua a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

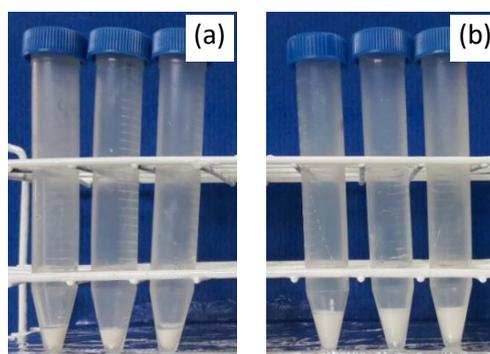
Índice de absorción de agua (g/g)		
Temperatura (°C) \ Muestra	AN	6HMT-13ECT/T
25	2,08 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,13 <sup>b</sup>
45	2,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,27 <sup>a</sup>
55	3,97 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,08 <sup>b</sup>
65	18,44 ± 0,65 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,42 <sup>b</sup>
75	26,70 ± 0,52 <sup>a</sup>	5,21 ± 0,07 <sup>b</sup>
85	29,85 ± 0,52 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,07 <sup>b</sup>

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones. Los valores con diferentes supra índices en una misma fila presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.18.** Índice de absorción de agua a diferentes temperaturas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones.



**Figura 4.19.** Tubos con la pasta de almidón modificado por la combinación de 6HMT 13EC T/T luego del centrifugado: (a) 25 °C y (b) 85 °C.

El PH o capacidad de hinchamiento granular del AN presenta un valor intermedio entre los valores del almidón de papa y de los almidones de cereales (Moorthy, 2002). Se han informado para el AN un amplio rango de valores del PH y del % SOL (solubilización de componentes del almidón) a temperaturas entre 45-95 °C, reportándose valores del PH entre 2,3-77 g/g y del % SOL entre 1,16-36,84 % (Zhu, 2015; Osundahunsi *et al.*, 2011; Moorthy, 2002). Osundahunsi *et al.* (2011) reportaron valores del % SOL cercanos al 50 % a 95 °C para el almidón de mandioca de la variedad “dulce”.

Se observó que PH del AN se incrementó de 2,12 a 36,53 g/g en el rango de temperatura de 25 a 85 °C, respectivamente. Estos valores se hallan dentro del rango esperado. El aumento fue ligeramente mayor al incremento reportado por Osundahunsi *et al.* (2011). Estos observaron valores de 2,3 a 24,3 g/g y 2,3 a 29,3 g/g en el rango de temperatura de 45 a 95 °C para las variedades de mandioca dulce y de mandioca amarga, respectivamente. Por otro lado, los valores hallados en este trabajo fueron inferiores a los valores reportados por Babić *et al.* (2007) de 2,2 a 49,7 g/g para el rango de temperatura de 55 a 85°C, respectivamente, y por Hernández-Medina *et al.* (2008) de 58,83 g/g a 90 °C.

El % SOL del AN se incrementó de 0,9 a 18,60 % en el rango de temperatura de 25 a 85 °C, encontrándose dentro del rango reportado por diferentes investigadores. El valor obtenido en este trabajo a 85 °C se halló próximo a los valores reportados por Mishra & Rai (2006) (14,36 % a 70 °C), Jyothi *et al.* (2006) (20,2 % a 90 °C) y Asaoka *et al.* (1992) (18,40-19,9 % a 80 °C). Estos últimos, evaluados en diferentes cultivares y meses del año. Sin embargo, resultaron ser inferiores al % SOL reportado por Jyothi *et al.* (2010), Babić *et al.* (2007), Osundahunsi *et al.* (2011), Hernández-Medina *et al.* (2008) y Abraham (1993), cuyos valores a 85 °C se hallaron en el rango de 22,3-45 %. Además, Sriroth *et al.* (1999) reportaron a 95 °C un rango de valores más altos del % SOL entre 45-77 % en almidones de mandioca de diferentes cultivares cosechadas a diferentes tiempos.

El IAA del AN se incrementó con el aumento de la temperatura de 25 a 85 °C arrojando valores de 2,8 a 29,85 g/g, respectivamente. El valor a 85 °C fue mayor al reportado por Hernández-Medina *et al.* (2008) (27,18 g/g a 90 °C). El aumento de IAA es esperado debido a que durante el calentamiento la absorción de agua se incrementa al producirse la ruptura de la estructura semicristalina. Esto permite la asociación de agua

a los grupos hidroxilos libres de las moléculas de amilosa y amilopectina, y produce un aumento del hinchamiento del gránulo y de la solubilidad (Singh *et al.*, 2003).

Las diferencias en los valores hallados en el presente trabajo en el AN, con respecto a los valores reportados por otros investigadores, podrían deberse a variaciones en el contenido de amilopectina en los almidones. Tester & Morrison (1990) observaron que el PH de los almidones es una propiedad que depende del contenido de amilopectina. Moorthy & Ramanujam (1986) indicaron que las fuerzas asociativas entre las moléculas de almidón tienen un efecto muy importante en el hinchamiento y la solubilidad. Estos investigadores reportaron diferentes valores del PH y del % SOL del almidón de mandioca dependiendo de la edad fisiológica y de la variedad del cultivo, sugiriendo que las mayores variaciones con la edad se producirían en almidones que presentan fuerzas asociativas más débiles. Otros factores que influyen en el PH y % SOL son la longitud de la cadena, la distribución del peso molecular, el grado y la longitud de las ramificaciones y la conformación (Rickard *et al.*, 1991; Moorthy, 2002). Singh *et al.* (2003) indicaron que las variaciones en la organización del gránulo y el contenido de lípidos y amilosa causarían las diferencias en el PH y en la solubilidad observadas en almidones de variedades provenientes de diferentes cultivares. La solubilidad del almidón de mandioca se ve influenciada además por el PH. El almidón de mandioca presenta una solubilidad más alta que los almidones provenientes de otros tubérculos. Esto podría en parte deberse a que posee un mayor poder de hinchamiento durante la gelatinización (Moorthy, 2002). El PH y la solubilidad proveen evidencia de la magnitud de la interacción entre las cadenas de almidón en los dominios de la región amorfa y cristalina. La extensión de la interacción es influenciada por la relación amilosa/amilopectina y por las características de la amilosa y de la amilopectina en términos del peso molecular, de la distribución, del grado y de la longitud de las ramificaciones y conformación (Hoover, 2001).

La significativa disminución del PH, del % SOL y del IAA en el almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T con respecto al AN puede ser atribuida a los cambios internos en los gránulos del almidón promovidos por ambos tratamientos aplicados.

Según Park *et al.* (2018) la combinación de HMT-EC T/T o EC T/T-HMT tienen un efecto sinérgico causando una mayor disminución en el PH que la producida por los tratamientos individuales. Estos investigadores reportaron que con el aumento de la temperatura a 70 °C se produjo un incremento importante del PH del almidón nativo

(maíz ceroso) mientras que en los almidones modificados el incremento fue menor, presentando el siguiente orden: nativo > EC T/T ó HMT > HMT-EC T/T ó EC T/T-HMT.

Se ha observado que el HMT causa reducción del PH y reducción o aumento de la solubilidad de almidones de diferentes orígenes botánicos (da Rosa Zavareze & Días, 2011). Lorenz & Kulp (1982) reportaron disminución del PH y del % SOL y aumento del IAA del almidón de mandioca modificado con el HMT (16 h, 100 °C y 18-17 % de humedad). Gunaratne & Hoover (2002) reportaron disminución del PH en el almidón de mandioca modificado con el HMT en otras condiciones: 100 °C, 10 h y 30 % de humedad. Jyothi *et al.* (2010) observaron reducción del volumen de hinchamiento (mL/g) en el almidón de mandioca mientras que el % SOL fluctuó en función de las condiciones del tratamiento, presentando en general un aumento.

Diversos factores pueden causar la reducción del PH en los almidones modificados con el HMT. Entre ellos se encuentran: disrupción de la zona cristalina, incremento de la cristalinidad, interacciones entre las moléculas de amilosa-amilosa y amilosa-amilopectina, interacción de las moléculas en las regiones amorfas y cristalinas y formación de complejos amilosa-lípidos en determinados almidones (Tester & Morrison, 1990; Hoover & Vasanthan, 1994; Gunaratne & Hoover, 2002).

La absorción de agua e hinchamiento del gránulo favorecen la solubilidad del almidón al promover la liberación de las moléculas de amilosa de las asociaciones amilosa-amilopectina (Conde-Petit *et al.*, 2001; Alcázar-Alay & Meireles, 2015).

El fortalecimiento de los puentes intramoleculares, observado en los almidones modificados por el HMT, causan una disminución de la hidratación por reducción de los grupos hidroxilos libres disponibles para la hidratación. Como consecuencia de esto, se produce una disminución del ingreso de agua en el interior del gránulo (Chung *et al.*, 2010) y una eventual disminución del PH. La reducción del PH y de la solubilidad, luego de la modificación con el HMT, ha sido atribuida al reordenamiento interno en los gránulos de almidón y a la interacción de las cadenas en la región amorfa y cristalina, siendo más importante en la región amorfa, a la formación de complejos amilosa-lípidos (Hoover & Manuel, 1996a; Hoover & Manuel, 1996b; Hoover & Vasanthan, 1994) y a la adicional interacción entre las moléculas de amilosa-amilosa y de amilosa-amilopectina con incremento de la cristalinidad (Hoover & Vasanthan, 1994; Chung *et al.*, 2009). Con el HMT se ha observado que la doble hélice de las cadenas laterales de la amilopectina se encuentra más organizada originando un aumento en la cristalinidad

(Osundahunsi *et al.*, 2011; da Rosa Zavareze & Días, 2011). Durante el HMT, el agua actúa como un plastificante promoviendo la interacción entre las moléculas de amilosa-amilosa y amilosa con las regiones lineales de la amilopectina (Gunaratne & Hoover 2002; Hoover & Vasanthan 1994). Esto causa un aumento de la densidad del gránulo reduciendo el hinchamiento y solubilidad (Jyothi *et al.*, 2010). Abraham (1993) indica que la disminución de la capacidad de absorción de agua en los almidones modificados por el HMT puede ser atribuida a la formación de una cubierta dura en la superficie del gránulo dificultando la penetración del agua hacia su interior.

La modificación química con EC disminuye el PH y la solubilidad de almidones de diferentes orígenes botánicos (Singh *et al.*, 2007). Se encontró una relación lineal entre el PH y la concentración del agente formador de EC. El PH disminuye al aumentar la concentración del reactivo (Mirmoghtadaie *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010). Similares resultados a los obtenidos en este trabajo fueron reportados en almidón de mandioca y de maíz modificado con la mezcla de TMFS/TPFS (Wongsagonsup *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2010), en almidón de avena (Mirmoghtadaie *et al.*, 2009), cebada (Inagaki & Seib, 1992), papa, *true yam*, *gourd yam*, taro, lotus, batata (Gunaratne & Corke, 2007) modificados con  $\text{POCl}_3$  y en almidón de papa (Kaur *et al.*, 2006) modificado con EPI y  $\text{POCl}_3$ . Los EC fortalecen las uniones entre las cadenas permitiéndole resistir el hinchamiento (Singh *et al.*, 2007). La reducción del PH podría estar relacionada a la formación de puentes intermoleculares por fósforos residuales (Chung *et al.*, 2004; Janzen, 1969; Wurzburg, 1986a). Los EC refuerzan la estructura de los gránulos y restringen la movilidad de las cadenas de almidón en la región amorfa limitando la absorción de agua (Gunaratne & Corke, 2007). La inhibición del hinchamiento de los gránulos de almidones modificados por EC, luego de la gelatinización y enfriamiento, conduce a la formación de una pasta y no de un gel (Chatakanonda *et al.*, 2000b).

Park *et al.* (2018), coincidiendo con este trabajo, no observaron cambios en el % SOL del almidón ceroso modificado por la combinación de HMT-EC con TMFS/TPFS en el rango de temperatura de 50-70 °C presentando valores bajos a diferencia del almidón nativo el que presentó un incremento importante a 70 °C. También a 70 °C observaron menor % SOL del almidón modificado por EC con TMFS/TPFS y por la combinación EC con TMFS/TPFS-HMT esto último con el empleo de 10 % y 12 % de TMFS/TPFS. Koo *et al.* (2010) reportaron resultados similares a lo hallado en este trabajo al evaluar la solubilidad del almidón de maíz

modificado con diferentes concentraciones de la mezcla de TMFS/TPFS a diversas temperaturas (50-90 °C). Wongsagonsup *et al.* (2014) observaron disminución de la solubilidad del almidón de mandioca modificado con la mezcla de TMFS/TPFS a concentraciones mayores de 1,5 %. Los almidones modificados con EC presentan una menor solubilidad que sus correspondientes almidones nativos, la que disminuye al aumentar la concentración del reactivo. A altas concentraciones la formación de EC puede casi impedir el hinchamiento del gránulo en agua hirviente (Wurzburg, 1986a). La disminución de la solubilidad puede ser atribuida al aumento de la densidad de los EC en el interior de los gránulos lo que permitiría una menor desintegración de los mismos durante el calentamiento (Kaur *et al.*, 2006).

El valor del IAA del almidón modificado presentó una reducción importante (5,31 g/g a 85 °C) coincidiendo con Kaur *et al.* (2006). Estos autores observaron una disminución del IAA en almidón de papa con el aumento de la concentración de EPI y POCl<sub>3</sub>. A bajas concentraciones de estos agentes formadores de EC no detectaron cambios en el IAA.

#### **4.6.4. Claridad y estabilidad de las pastas del almidón**

La Tabla 4.22 y la Figura 4.20 muestran los valores de transmitancia (% T) medidos a 650 nm, a 25 °C y a 4 °C entre 0-192 h, de las pastas del AN y del almidón modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

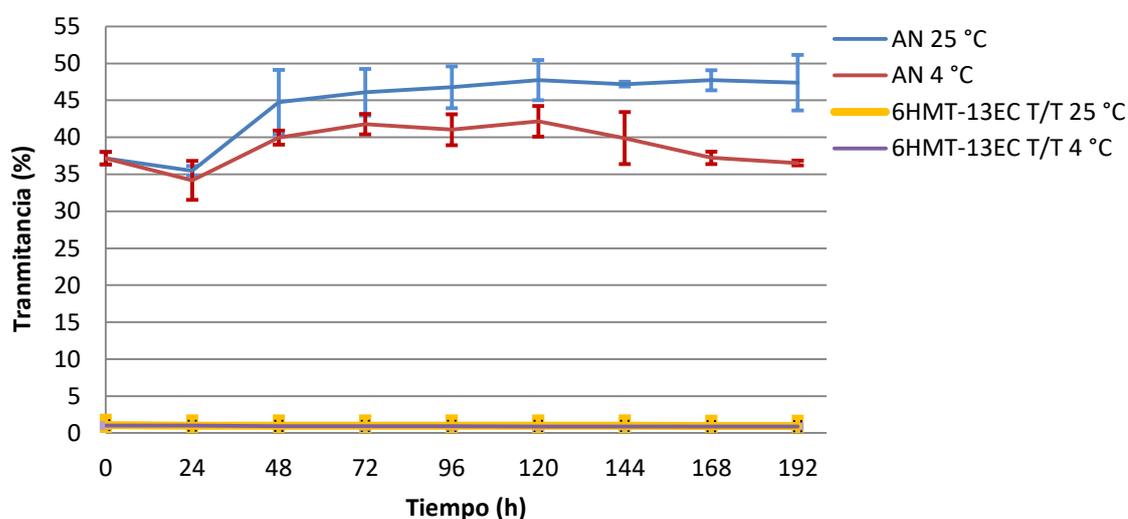
En el AN, luego de una inicial disminución del % T a las 24 h de almacenamiento a 25 °C y 4 °C, se detectó un incremento en el % T. Luego del incremento observado a las 48 h de almacenamiento a 25 °C, el % T, no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) hasta las 192 h (8 días) de almacenamiento (Anexo 14a). El incremento del % T de la pasta de AN, luego de las 24 h de almacenamiento, fue significativamente menor a 4 °C (Anexo 14b). Durante el transcurso del almacenamiento a 4 °C, se observó una tendencia a retornar a los valores del % T al tiempo inicial.

La claridad de las pastas, expresada como transmitancia de la luz, es una medida del hinchamiento del gránulo (Ačkar *et al.*, 2010). Este parámetro determina la transparencia de la pasta, relacionada con el estado de dispersión de los solutos y con la tendencia a la retrogradación de los almidones (Aristizábal & Sánchez, 2007). La claridad de las pastas de los almidones es una propiedad que depende de las fuerzas asociativas en el interior del gránulo.

**Tabla 4.22.** Valores de transmitancia (% T) (650 nm) de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación 6HMT-13EC T/T a 25 °C y a 4 °C medidas entre 0-192 h.

Muestra	% Transmitancia (650 nm)			
	AN		6HMT-13EC T/T	
	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C
<b>0</b>	37,17 ± 0,84 <sup>a</sup>	37,19 ± 0,84 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>24</b>	35,47 ± 0,64 <sup>a</sup>	34,17 ± 2,64 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>48</b>	44,77 ± 4,35 <sup>a</sup>	39,97 ± 0,95 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>72</b>	46,10 ± 3,15 <sup>a</sup>	41,77 ± 1,39 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>96</b>	46,77 ± 2,84 <sup>a</sup>	41,03 ± 2,08 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>120</b>	47,73 ± 2,73 <sup>a</sup>	42,17 ± 2,08 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>144</b>	47,19 ± 0,34 <sup>a</sup>	39,90 ± 3,50 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,00 <sup>c</sup>
<b>168</b>	47,73 ± 1,37 <sup>a</sup>	37,23 ± 0,83 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,00 <sup>c</sup>
<b>192</b>	47,40 ± 3,76 <sup>a</sup>	36,53 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,00 <sup>c</sup>

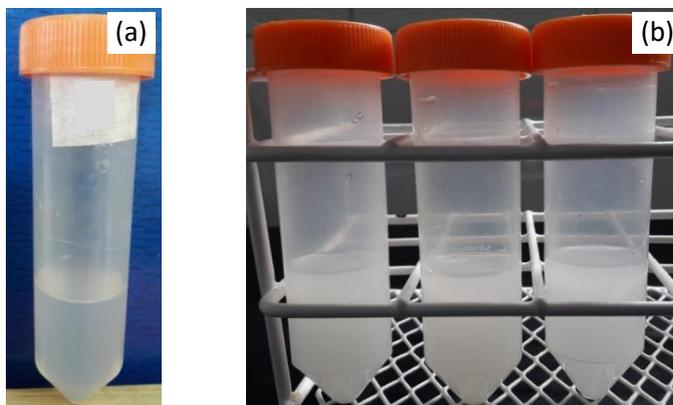
**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones. Los valores con diferentes supra índices en una misma fila presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.20.** Transmitancia (650 nm) de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T a 25 °C y a 4 °C medidas entre 0-192 h.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo; 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón). Los valores corresponden a la media ± desvío estándar de tres determinaciones.

En la Figura 4.21 se observan los tubos con la pasta de almidón de AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T luego del tratamiento térmico.



**Figura 4.21.** Tubos con: (a) pasta de almidón de AN y (b) pasta de almidón de mandioca modificado por combinación de 6HMT-13EC T/T luego del tratamiento térmico y enfriado a 25 °C.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T (6HMT = 20 % humedad, 105 °C, 5 h y 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón).

En comparación con la claridad de las pastas de los cereales, el almidón de mandioca presenta una mayor claridad debido a que sus fuerzas asociativas son más débiles (Moorthy, 2002). En la bibliografía se encuentra que el almidón de mandioca presenta escasa y lenta retrogradación durante el almacenamiento (Swinkels, 1985) tendiendo a retornar, luego de los 7 días de almacenamiento a su valor inicial (Kumoro *et al.*, 2010).

Los valores del % T menores, observados a 4 °C en el AN, pueden estar relacionados a la mayor velocidad de asociación de las moléculas de amilosa y a la formación de cristales menos perfectos que a 25 °C (Bello-Pérez *et al.*, 2002).

El % T de la pasta del almidón modificado por la combinación 6HMT-13EC T/T fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) al % T de la pasta del AN (Anexo 14c). La claridad de la pasta no presentó variaciones significativas durante el transcurso del almacenamiento a 25 °C y 4 °C. El % T no disminuyó con el tiempo evidenciando una ausencia de retrogradación del almidón modificado (Morikawa & Nishinari, 2000a). Esto demuestra una estabilización del gránulo por el tratamiento de EC. Se ha reportado que el uso de la mezcla de TMFS/TPFS causa supresión de la retrogradación. Esto puede ser atribuido a la disminución de la movilidad molecular por la presencia de los

grupos fosfatos (Chung *et al.*, 2004; Chatakanonda *et al.*, 2000a). El valor del % T de la pasta del AN a 25 °C, hallado en este trabajo de 37,17 %, resultó próximo al valor reportado por Wongsagonsup *et al.* (2014) (35,65 %) y dentro del rango reportado por Sánchez *et al.* (2009) (12,5-96,6 %). Estos últimos autores evaluaron más de 4000 genotipos de almidón de mandioca provenientes de diferentes países. Gutiérrez *et al.* (2014), coincidiendo con los resultados de este trabajo, observaron un incremento en el % T en las pastas de almidón de mandioca nativo durante el almacenamiento a 25 °C y 4 °C. Además, informaron valores significativamente menores del % T de la pasta de almidón de mandioca modificado con TMFS. Anggraini *et al.* (2009), en contraste a estos resultados, reportaron un incremento de la opacidad (disminución del % T) de siete genotipos de almidón de mandioca estudiados durante el almacenamiento por 6 días a 4 °C mediante la medición de la absorbancia a 655 nm.

Las diferencias observadas entre la claridad de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado pueden ser atribuidas a la suma de los efectos causados por la combinación del tratamiento hidrotérmico con el tratamiento de EC aplicado al AN.

Park *et al.* (2018) reportaron que el almidón de maíz ceroso modificado por EC con TMFS/TPFS y por combinación de EC con TMFS/TPFS-HMT o HMT-EC con TMFS/TPFS presentaron un menor % T en comparación con el almidón nativo o modificado por el HMT. El HMT reduce la claridad de las pastas del almidón por aumento en las fuerzas asociativas entre las moléculas en el gránulo (Moorthy, 2002). Jyothi *et al.* (2010) observaron una disminución importante del % T en el almidón de mandioca modificado por el HMT, sugiriendo que podría deberse al ligero efecto de pardeamiento que se produce durante el tratamiento. También reportaron una disminución del % T con el aumento del tiempo del tratamiento. Abraham (1993) observó una disminución del % T del almidón de mandioca modificado por el HMT, atribuyendo este efecto a la formación de una capa dura en la superficie del gránulo.

Se observó una disminución en la claridad de las pastas de almidones con alto GEC. Esto puede ser debido a cambios en la estructura interna del gránulo (Morikawa & Nishinari, 2000a), a una incompleta gelatinización, a una disminución del hinchamiento y a una mayor densidad en los gránulos causando refracción en lugar de transmisión de la luz y disminución de la claridad (Jyothi *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2006; Wongsagonsup *et al.*, 2014 y Koo *et al.*, 2010).

La morfología del gránulo de almidón modificado permaneció casi intacta luego del calentamiento a 95 °C. Esto causó una disminución de la claridad de la pasta

coincidiendo con los hallazgos de diversos investigadores (Kaur *et al.*, 2006; Morikawa & Nishinari, 2000a; Morikawa & Nishinari, 2000b; Wongsagonsup *et al.*, 2014; Jyothi *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2018). La morfología del gránulo se constató mediante microscopía óptica.

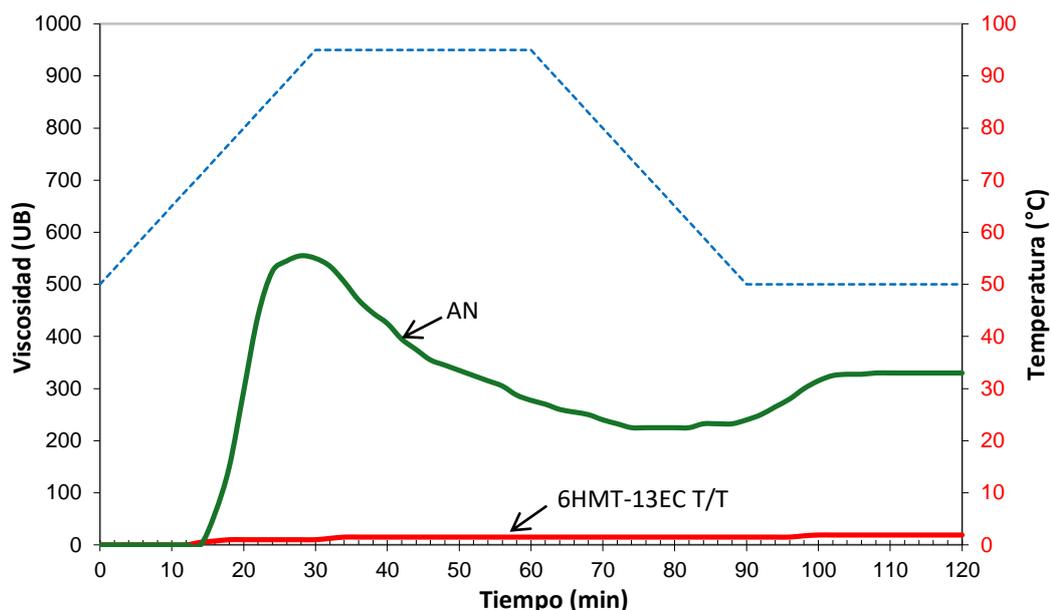
Wongsagonsup *et al.* (2014) y Koo *et al.* (2010) observaron una disminución importante del % T en la pasta de almidón de mandioca y de maíz, respectivamente. Estos almidones fueron modificados con la mezcla de TMFS/TPFS. Se informaron valores próximos a los del presente trabajo de 1,9 % para el almidón de mandioca modificado con 6 % de la mezcla de reactivos y 1,01-0,83 % para el almidón de maíz modificado con 5-12 % de la mezcla de reactivos.

#### **4.6.5. Propiedades de las pastas del almidón y GEC**

El conocimiento de las propiedades de las pastas de los almidones es de gran utilidad. Permite comprender las características físicas de los mismos y establecer su potencial uso. Estas propiedades son de especial interés no solo para la industria sino también para el área de la química de los alimentos, debido a que influyen en la calidad y en las características de los alimentos (Leelavathi *et al.*, 1987).

Los amilogramas, correspondientes al AN y al almidón de mandioca modificado por la combinación de tratamiento 6HMT-13EC T/T, se presentan en la Figura 4.22 y los puntos significativos de los mismos y grado de EC se observan en la Tabla 4.23.

Las condiciones empleadas en la realización de los amilogramas pueden influir en los valores de las propiedades de las pastas de almidón. Estas condiciones son el contenido de sólidos (Caesar & Moore, 1935), los tiempos de calentamiento, de mantenimiento y de enfriamiento utilizados en los ensayos y la diversidad genética (Zhu, 2015). Las propiedades de la pasta del AN se encontraron dentro del rango esperado.



**Figura 4.22.** Amilogramas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón. Valores promedios de dos determinaciones.

**Tabla 4.23.** Propiedades de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

Muestra	AN	6HMT-13EC T/T
<b>A (°C)</b>	61,25 ± 1,60 <sup>a</sup>	71,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>B (UB)</b>	555 ± 7,07 <sup>a</sup>	20,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>C (UB)</b>	425 ± 7,07 <sup>a</sup>	11,50 ± 1,50 <sup>b</sup>
<b>D (UB)</b>	245 ± 7,07 <sup>a</sup>	15,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>E (UB)</b>	315 ± 7,07 <sup>a</sup>	15,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>F (UB)</b>	330 ± 0,00 <sup>a</sup>	19,50 ± 0,50 <sup>b</sup>
<b>B-D (UB)</b>	310 ± 14,14 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>D-E (UB)</b>	70 ± 14,14 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>GEC (%)</b>	-	96,40 ± 0,03

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón. A = temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización), B = pico de máxima viscosidad, C = viscosidad al comienzo del primer periodo de mantenimiento a 95 °C, D = viscosidad al comienzo del periodo de enfriamiento a 95 °C, E = viscosidad al final del periodo de enfriamiento a 50 °C, F = viscosidad al final del segundo periodo de mantenimiento a 50 °C, B-D = estabilidad de la pasta durante la cocción (*Breakdown*), D-E = retrogradación (*Setback*), GEC % = porcentaje estimado del grado de enlaces cruzados. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Durante el amilograma, a medida que la temperatura aumenta, los gránulos absorben agua, se hinchan y la viscosidad comienza a aumentar hasta que se alcanza el pico de viscosidad (Swinkels, 1985). El pico de viscosidad (parámetro B) indica la máxima viscosidad obtenida por el almidón durante la gelatinización y es considerado un punto de equilibrio entre el hinchamiento y la ruptura del gránulo (Majzoobi *et al.*, 2012). Los almidones con valores altos de B tienen un alto poder de hinchamiento. La forma de la curva refleja la habilidad de los gránulos para hincharse libremente antes de la desintegración (Singh *et al.*, 2007). El almidón de mandioca presenta un pico de viscosidad más bajo (500-1000 UB) que el almidón de papa (1000-5000 UB) y más alto que los almidones de trigo (200-500 UB) y maíz (300-1000 UB) (Swinkels, 1985). En general, los almidones con alto poder de hinchamiento son menos resistentes a la desintegración física durante la cocción exhibiendo una disminución significativa de la viscosidad luego de alcanzar el máximo valor (Adebowale & Lawal, 2003). Esto se observa en la curva correspondiente al AN en la Figura 4.22. Los resultados de los parámetros significativos de las propiedades de las pastas del AN se encontraron próximos a los valores reportados por Asaoka *et al.* (1993) para almidón de mandioca en diferentes meses del año y luego de la poda de la planta. Los rangos de valores, reportados por estos autores, para los parámetros fueron: A = 60,7-62 °C, B = 660-714 (UB), C = 315-375 (UB), E = 400-440 (UB), B-D = 420-475 (UB) y D-E = 160-205 (UB). El menor valor B y consecuentemente B-D obtenido en este trabajo podría estar relacionado con el tamaño del gránulo del almidón. Se observó que cuanto menor es el tamaño del gránulo de almidón menor es el pico de viscosidad. Esto se debería a una desintegración más rápida de los gránulos luego del hinchamiento (Asaoka *et al.*, 1993). El tamaño promedio del gránulo del AN encontrado en el presente trabajo (10,06  $\mu\text{m}$ ) fue inferior al menor valor reportado por Asaoka *et al.* (1993) (promedio de rango = 11,05  $\mu\text{m}$ ).

Los resultados de este trabajo mostraron que el tratamiento aplicado afectó significativamente a las propiedades de las pastas del almidón evaluadas con el viscoamilógrafo Brabender. En general, el tratamiento produjo una disminución drástica ( $p < 0,05$ ) de los parámetros característicos del amilograma con respecto al AN, a excepción del parámetro A en el que se observó un aumento (Tabla 21, Anexo 15a y b). Estos cambios se deberían a un efecto sinérgico entre los tratamientos aplicados. Ambos tratamientos producen una disminución en los parámetros característicos de las pastas. La combinación de ambos tratamientos tuvo un efecto sinérgico en estas propiedades en

el almidón de maíz (Park *et al.*, 2018) por lo que se podría esperar el mismo efecto en el almidón de mandioca.

Las propiedades de las pastas cocidas de almidones céreos, de almidones de tubérculos y de raíces experimentan cambios importantes con los tratamientos de EC (Wurzburg, 1986a).

La reacción de EC conduce a la formación de enlaces intra e inter moleculares que estabilizan la estructura del gránulo (Acquarone & Rao, 2003). Como se observa en la Tabla 4.23, el almidón modificado presentó un alto GEC (96,40 %) contribuyendo a su estabilidad. La Tabla 4.23 muestra que el tratamiento produjo un incremento significativo de la temperatura de empastamiento del almidón modificado con respecto al AN. En el almidón de arroz, se observó que cuanto mayor es el GEC mayor es la temperatura de empastamiento y menor la viscosidad de la pasta (Chatakanonda *et al.*, 2000a).

La aplicación del tratamiento hizo disminuir drásticamente la curva de viscosidad del almidón modificado comparado con el AN. Esta no presentó variaciones significativas a lo largo de las etapas del amilograma (Figura 4.22). Resultados similares fueron publicados por Wongsagonsup *et al.* (2014) y Park *et al.* (2018). Estos autores observaron que el uso de TMFS/TPFS en altas concentraciones causa una disminución significativa de los parámetros de las pastas de almidón de mandioca (2 y 6 %) y de maíz céreo (5, 10 y 12 %) en comparación con su correspondiente almidón nativo. En contraste, el empleo de menores concentraciones de TMFS/TPFS (0,25 % y 0,5 %) causan un aumento de las propiedades de las pastas (Wongsagonsup *et al.*, 2014) debido a la capacidad de los gránulos de hincharse sin desintegrarse.

La reacción de EC produce reducción de PH de los gránulos (Singh *et al.*, 2007), debido a que las cadenas en la región amorfa tienen menor movilidad, y menor interacción con las moléculas de agua (Gunaratne & Corke, 2007). Consecuentemente, cuanto mayor es el GEC menor es el volumen del gránulo, lo cual reduce el contacto entre ellos causando una disminución de los valores de viscosidad (Hirsch & Kokini, 2002).

La curva de viscosidad del almidón modificado fue similar a una línea recta (Figura 4.22). Similares resultados fueron reportados por Shi *et al.* (2013), para el almidón de arveja modificado con cantidades de 0,2-12 % de TMFS/TPFS, y por Wongsagonsup *et al.* (2014) en almidón de mandioca modificado con cantidades de 4-6 % de TMFS/TPFS.

La ausencia del pico de viscosidad en el amilograma confirma un exceso de EC (Chung *et al.*, 2004; Wongsagonsup *et al.*, 2014). El bajo valor de B en el almidón modificado y la escasa variación de los restantes parámetros indicarían que los EC generados inhibieron el hinchamiento sin ocasionar la ruptura del gránulo. Estos fenómenos se produjeron en condiciones de alta temperatura y fuerzas de cizalla durante las etapas del amilograma, previniendo la pérdida de viscosidad (Park *et al.*, 2018, Chung *et al.*, 2004; Deetae *et al.*, 2008; Wurzburg, 1986a).

El incremento de la viscosidad durante el periodo de enfriamiento (parámetro E-D) indicaría la tendencia a retrogradar de la pasta de almidón o a la re-asociación de la amilosa cuando la temperatura de la pasta disminuye (Luo *et al.*, 2009). Las sutiles variaciones en la curva de las pastas del almidón modificado muestran una ausencia de retrogradación. Este efecto, estaría asociado al GEC, el cual limita el hinchamiento del gránulo y evita la formación de una verdadera pasta manteniendo al almidón en suspensión durante todo el proceso.

El fortalecimiento de los puentes en el interior del gránulo de almidón que se producen por el tratamiento con TMFS/TPFS permite que los gránulos soporten tratamientos térmicos más intensos antes de su desintegración y de la formación de la pasta (Eliasson, 1985). Éste efecto causó que la viscosidad, del almidón modificado, permaneciera sin variación durante la cocción.

La modificación del almidón por el HMT también produce importantes cambios en las pastas de los almidones (da Rosa Zavareze & Días, 2011; Watcharatewinkul *et al.*, 2009; Chung, 2012; Andrade *et al.*, 2013). En coincidencia con el presente trabajo, Andrade *et al.* (2013) observaron un incremento en la temperatura de empastamiento y una disminución en el pico de viscosidad en el almidón de mandioca modificado por el HMT (10 % y 20 % de humedad, a 120 °C y 60 min). En el almidón de *canna* se observó una disminución de la estabilidad de la pasta durante la cocción (*breakdown*) y de la viscosidad final (Watcharatewinkul *et al.*, 2009). Estos cambios se deberían a la asociación entre las cadenas en la región amorfa del gránulo y a cambios en la cristalinidad producidos por el HMT. Además, en forma similar al presente trabajo, la disminución del PH produce una reducción en el pico de viscosidad. A medida que se produce el refuerzo de las uniones intramoleculares se requiere mayor calor para desintegrar los gránulos y formar una pasta. El HMT contribuiría a la ausencia de retrogradación observada en el presente trabajo. De acuerdo con Chung *et al.* (2009), el HMT induce interacciones adicionales entre las moléculas de amilosa-amilosa y de

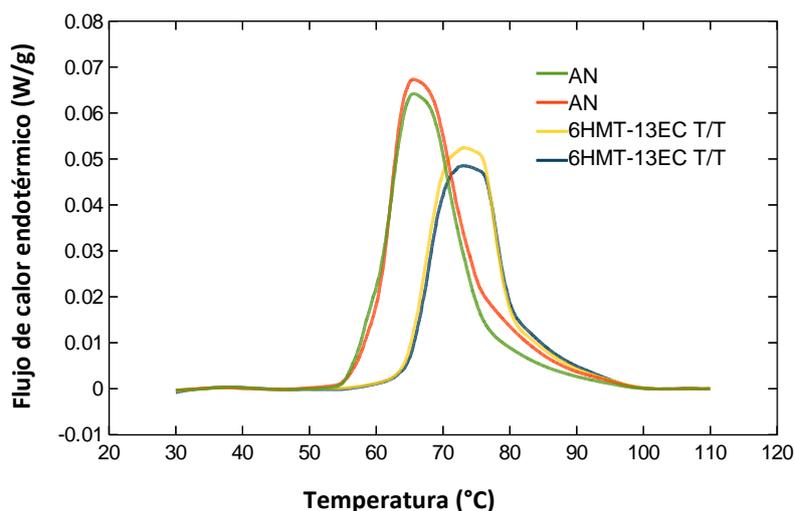
amilosa-amilopectina. Esto contribuye a reducir la lixiviación de la amilosa y la retrogradación. La reducción de la retrogradación estaría asociada a la presencia de gránulos intactos. Se ha informado que la intensidad de los cambios depende de las condiciones del tratamiento (HMT). Es decir, cuanto mayor es el contenido de humedad (18 %-27 %) durante el mismo mayor es el efecto (Olayinka *et al.*, 2008). Andrade *et al.* (2013) observaron una disminución de la temperatura de empastamiento al aumentar el contenido de humedad a 30 %. Además, se observó que el aumento del tiempo de 1 a 5 h (30 % de humedad a 120 °C) redujo el pico de viscosidad del almidón de mandioca modificado por el HMT (Park *et al.*, 2018). Por lo tanto, es válido suponer que las condiciones de reacción del HMT utilizadas en este trabajo (20 % de humedad, 5 h) afectaron a las propiedades de las pastas.

El aumento en la temperatura de empastamiento, el bajo o casi nulo pico de viscosidad, la resistencia a la desintegración física y la ausencia de retrogradación se encuentran acordes con los hallazgos en este trabajo de valores bajos de PH, de % SOL y de IAA de los gránulos del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Los resultados mostraron que el tratamiento combinado de 6HMT-13EC T/T contribuyó a estabilizar el gránulo de almidón mejorando la tolerancia a la alta temperatura y las tensiones de corte (Wongsagon-sup *et al.*, 2014). Por un lado, el tratamiento 6HMT favoreció la reorganización del gránulo, por disrupción de la estructura cristalina, y disociación de la estructura en doble hélice en la región amorfa. Esta última, seguida de una interacción entre las moléculas y reestructuración de los cristales (Gunaratne & Hoover, 2002). Por otro lado, el tratamiento 13EC T/T (a través de los EC) generaron fuerzas covalentes adicionales que contribuyeron a recuperar la cristalinidad y a aumentar la resistencia física de los gránulos (Juansang *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2018).

#### **4.6.6. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido**

Las endotermas obtenidas para las muestras AN y 6HMT-13EC T/T se muestran en la Figura 4.23. Las temperaturas de gelatinización ( $T_i$ ,  $T_p$ ,  $T_f$  y  $T_f-T_i$ ) y entalpías ( $\Delta H$ ) relacionadas con la gelatinización se presentan en la Tabla 4.24.



**Figura 4.23.** Endotermas de suspensiones del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T obtenidas por calorimetría diferencial de barrido.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón.

**Tabla 4.24.** Temperaturas y entalpías de gelatinización del AN y del almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

Muestra	$T_i$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$T_f - T_i$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
AN	$58,66 \pm 0,46^a$	$65,58 \pm 0,06^a$	$77,55 \pm 0,65^a$	$18,90 \pm 0,19^a$	$5,49 \pm 0,39^a$
6HMT-13EC T/T	$64,55 \pm 0,31^b$	$73,10 \pm 0,01^b$	$81,57 \pm 0,37^b$	$17,06 \pm 0,06^b$	$4,14 \pm 0,16^b$

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h; 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón;  $T_i$  = temperatura de gelatinización inicial,  $T_f$  = temperatura de gelatinización final;  $T_p$  = temperatura de gelatinización pico,  $T_f - T_i$  = rango de gelatinización;  $\Delta H$  = entalpía de gelatinización. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de dos determinaciones. Valores en la misma columna con diferentes superíndices (a-b) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En cada ensayo se observó la presencia de un solo pico endotérmico indicando que, en exceso de contenido de agua, se facilitó la hidratación e hinchamiento de las regiones amorfas del gránulo. Esto produjo un aumento en la movilidad de las cadenas con el calentamiento (Maurice *et al.*, 1985) y permitió que los cristalitas fundan en forma cooperativa (Donovan, 1979). La  $T_i$  de gelatinización corresponde a la temperatura a la que se produce la hidratación e hinchamiento de las regiones amorfas en el gránulo de almidón (Maurice *et al.*, 1985). La  $T_p$  ocurre cuando las regiones amorfas se hinchan y se rompen los cristalitas (disociación de las dobles hélices propias

de las zonas cristalinas) facilitando la fusión (Biliaderis *et al.*, 1980). La  $T_f$  se presenta cuando se produce la verdadera fusión de los cristalitos no afectados por la región amorfa (Maurice *et al.*, 1985). La  $\Delta H$  está principalmente relacionada con la pérdida de las dobles hélices de la amilopectina (orden molecular) que lleva al deterioro de la cristalinidad durante la gelatinización (Cooke & Gidley, 1992). La longitud de las dobles hélices afecta a la  $\Delta H$ . Al aumentar la longitud de las cadenas se requiere mayor energía para desenrollarlas y fusionarlas durante la gelatinización debido a que aumenta su estabilidad (Chung *et al.* 2009). En general, una alta temperatura de transición indica una región amorfa más estable (Leszkowiat *et al.*, 1990). El rango de temperatura de gelatinización ( $T_f - T_i$ ) disminuye al aumentar el grado de ramificación de las moléculas de amilopectina al disminuir la resistencia a la gelatinización del almidón (Biliaderis *et al.*, 1980).

Los valores de las temperaturas y de la  $\Delta H$  de gelatinización del AN se hallaron dentro del rango reportado por diversos investigadores. De acuerdo a lo comunicado por Moorthy (2002), los rangos de temperaturas para el almidón de mandioca son:  $T_i = 50,7-69$  °C;  $T_p = 54,7-78$  °C;  $T_f = 60,2-100$  °C y  $\Delta H = 4,8-16,6$  J/g. Las temperaturas de transición del AN en este trabajo se encontraron próximas a las reportadas por Hernández-Medina *et al.* (2008) ( $T_i = 57,8$  °C;  $T_p = 65,5$  °C y  $T_f = 75,3$  °C) aunque la entalpía de gelatinización resultó menor ( $\Delta H = 10,0$  J/g). Las variaciones observadas en las temperaturas de transición en el AN podrían deberse a factores biológicos y/o físicos. Los parámetros del análisis térmico por DSC son afectados por la variación genética y las condiciones ambientales de crecimiento de la planta (Asaoka *et al.*, 1992). Estos parámetros pueden ser afectados por la temperatura de secado (Moorthy, 2002). Gunaratne & Hoover (2002) observaron que el almidón de mandioca presenta una menor  $\Delta H$  en comparación con los almidones de *true yam*, papa, taro y *new cocoyan*. Estos investigadores sugirieron que los mayores valores de  $\Delta H$  en *true yam* y papa podrían estar relacionados a una mayor cantidad de doble hélices y/o débil interacción entre las doble hélices de la amilopectina en los dominios cristalinos.

Se observó que el almidón modificado presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) (Anexo 16a) de los parámetros térmicos de DSC comparado con el AN. Esto indicaría que el almidón se tornó más estable térmicamente con el tratamiento. Sin embargo, el rango de temperatura de gelatinización resultó significativamente menor. La combinación de tratamientos 6HMT-13EC T/T condujo a una endoterma más baja y angosta que la correspondiente al AN.

El mayor valor de  $T_i$  en el almidón modificado sugiere la presencia de regiones amorfas más estables desde el punto de vista térmico y estructural (Leszkowiat *et al.*, 1990). El mayor valor de  $T_p$  indica mayor resistencia a la gelatinización suponiendo una estructura cristalina más ordenada o una menor cantidad de regiones amorfas (Leszkowiat *et al.*, 1990; Barichello *et al.*, 1990). La mayor  $T_f$  indicaría la presencia de una región cristalina más estable y/o más ordenada (Barichello *et al.*, 1990). La endoterma más angosta (menor rango de temperatura de gelatinización) observada en el almidón modificado sugiere una mayor homogeneidad en la fusión de los cristales.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que los cambios en las temperaturas y  $\Delta H$  de gelatinización, observado en el almidón modificado por 6HMT-13EC T/T, podrían ser atribuidos al efecto conjunto de ambos tratamientos. Los mismos se complementan con los resultados obtenidos en las propiedades fisicoquímicas evaluadas.

Diversos investigadores han reportado que el HMT causa aumento en las temperaturas de transición y disminución de la  $\Delta H$  de gelatinización en almidones de diferentes orígenes botánicos: mandioca, trigo; papa, batata, maíz, maíz céreo, arveja, lenteja y canna (Brumovsky *et al.*, 2009; Gunaratne & Hoover, 2002; Hoover & Manuel, 1996a; Hoover & Manuel, 1996b; Park *et al.*, 2018; Chung *et al.*, 2009; Watcharatewinkul *et al.*, 2009). La región amorfa que rodea a la región cristalina influye en la temperatura de gelatinización de la región cristalina (Gunaratne & Hoover, 2002). Cuando la región amorfa se hincha genera una tensión sobre la zona cristalina que lleva a la desorganización de los cristalitos. El HMT, al producir una disminución del PH de los gránulos, causaría que la región amorfa tenga un menor efecto desestabilizante sobre la región cristalina ocasionando un aumento en la temperatura de gelatinización (Perera *et al.*, 1997). La disminución de la  $\Delta H$  en el HMT sugiere la ruptura de las dobles hélices en las regiones cristalinas y no cristalinas (gelatinización parcial). Esto, ocasionaría que un menor número de doble hélices se desenrollen y fusionen durante la gelatinización (Gunaratne & Hoover, 2002; Perera *et al.*, 1997). El HMT, al promover una fuerte interacción entre las moléculas de amilosa-amilosa y de amilosa-amilopectina, causaría un aumento de la temperatura necesaria para la fusión de los cristalitos produciendo un aumento en las  $T_i$ ,  $T_p$ ,  $T_f$  (Perera *et al.*, 1997). Se observó que el HMT aumenta el rango  $T_f-T_i$  indicando la formación de cristales de diferente estabilidad térmica (Hoover & Manuel, 1996b).

La modificación del almidón por EC genera cambios en las propiedades térmicas del mismo. El efecto depende de diversos factores tales como la fuente botánica del almidón, las condiciones de reacción y la concentración y el tipo de reactivo (Singh *et al.*, 2007). Wongsagonsup *et al.* (2014) reportaron que la modificación del almidón de mandioca por EC con TMFS/TPFS (0,25-6 %) afectó ligeramente los parámetros térmicos de DSC. Estos investigadores observaron un ligero incremento en la  $T_i$  y la  $\Delta H$  y una disminución en la  $T_f$  con el aumento de los niveles de EC. Además, argumentaron que los incrementos se deberían a la contribución a la estabilidad molecular de los EC generados. Los EC, al reducir la movilidad de las cadenas en la región amorfa (Singh *et al.*, 2007), actuarían como puentes, reduciendo la distancia entre las moléculas sin cambiar la estructura cristalina (Majzoobi *et al.*, 2009). Koo *et al.* (2010) no observaron cambios en los patrones de cristalinidad del almidón de maíz modificado por EC con TMFS/TPFS (12 %). Sang *et al.* (2010) no observaron cambios significativos en las propiedades térmicas del almidón de trigo modificado por EC con TMFS/TPFS (12 %) a diferentes pH (9-12) con respecto al almidón nativo. Woo & Seib (2002) reportaron un aumento en las  $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$  y una disminución de la  $\Delta H$  en almidones de trigo normal, trigo céreo, maíz normal, maíz céreo y papa modificados con EC con TMFS/TPFS, al 12 %, comparados con sus correspondientes almidones nativos. Estos investigadores indicaron que el aumento en la temperatura de gelatinización puede ser una consecuencia de la inhibición de la fusión cooperativa de la zona cristalina por la formación de los EC.

Park *et al.* (2018) no observaron diferencias en los parámetros térmicos de la DSC en el almidón céreo de maíz modificado por el HMT, HMT-EC con TMFS/TPFS o EC con TMFS/TPFS-HMT. Esto sugiere que los cambios ocasionados por el HMT tienen un efecto más importante en las propiedades térmicas en comparación con los causados por el tratamiento de EC.

El tratamiento combinado de 6HMT-13EC T/T contribuyó a la obtención de una estructura más ordenada y a la estabilización del gránulo de almidón desde el punto de vista térmico y estructural. Se puede inferir que el tratamiento 6HMT, al disminuir el PH y aumentar las interacciones amilosa-amilosa y amilosa-amilopectina, causó un aumento en las  $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$  con disminución de la  $\Delta H$ . Esto último, se atribuiría a una parcial gelatinización de algunas moléculas con menor estabilidad térmica (Horndok, & Noomhorm, 2007). El tratamiento 13EC T/T, a través de los EC, contribuyó a

estabilizar la estructura y habría permitido una fusión más homogénea de los cristales produciendo un menor rango de temperatura de gelatinización que el AN.

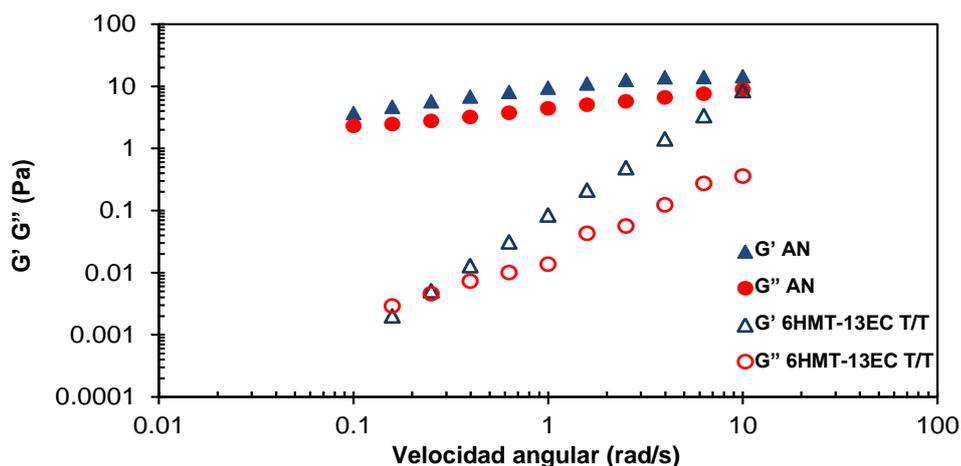
La obtención de una estructura más ordenada en el gránulo de almidón modificado por 6HMT-13EC T/T estaría respaldada por los bajos niveles de PH, de % SOL, de IAA, y de digestibilidad, por la estabilidad de las pastas y por el aumento en las temperaturas de gelatinización.

#### **4.6.7. Comportamiento reológico dinámico**

La reología dinámica se utiliza para evaluar el comportamiento viscoelástico de alimentos semisólidos (Kealy, 2006). De acuerdo a Singh *et al.* (2017) y a Chen *et al.* (2015), las pastas de almidón de mandioca presentan un comportamiento viscoelástico.

Los resultados obtenidos para los barridos de frecuencia de las pastas de AN y modificado por 6HMT-13EC T/T se muestran en la Figura 4.24. Este gráfico es generalmente conocido como espectro mecánico o barrido de frecuencia el cual puede ser utilizado para determinar la diferencia entre geles formados por redes desordenadas, por enlaces covalentes y por asociación física (Clark & Ross-Murphy, 1987; Yoneya *et al.*, 2003). Se muestra solo una determinación experimental a los fines de representación (como se representan los datos experimentales de esta naturaleza en la mayoría de la bibliografía en escala logarítmica) ya que, posteriormente, los datos se analizaron utilizando el modelo de Ley de Potencia (Tabla 4.25).

El módulo  $G'$ , también llamado módulo elástico o de almacenamiento, es una medida de la energía almacenada y recuperada por el material en cada ciclo. El módulo  $G''$ , conocido como módulo viscoso o de pérdida, es una medida de la energía perdida en cada ciclo. La tangente de  $\delta$  es un indicador de las contribuciones relativas de los componentes viscoso y elástico a las propiedades viscoelásticas del material (Karim *et al.*, 2000).



**Figura 4.24.** Barridos de frecuencia de las pastas del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T.

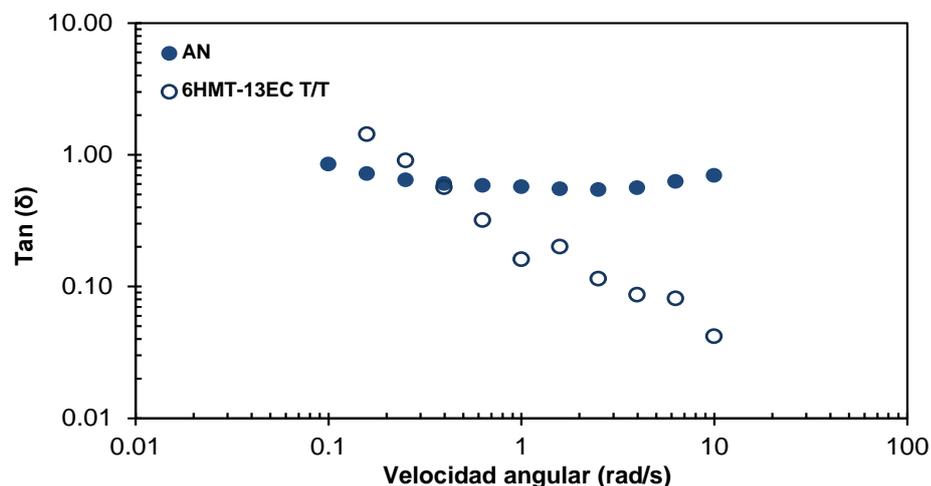
**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón. Los puntos corresponden a una de dos determinaciones experimentales.

A partir de los datos graficados, puede observarse que los valores de  $G'$ , en general, son mayores a los de  $G''$  en el rango de frecuencias estudiado. Esto indica que ambas pastas de almidón tienen un comportamiento predominantemente sólido, evidenciando una microestructura tipo gel débil (Kim & Yoo, 2009). Resultados similares fueron reportados por Charles *et al.* (2005), Chen *et al.* (2015), Singh *et al.* (2017), Osundahunsi *et al.* (2011) y Wongsagonsup *et al.* (2014) para las pastas del almidón de mandioca nativo. En el presente trabajo se presentó un aumento en la magnitud de los módulos dinámicos con el incremento de  $\omega$ . Las curvas de los módulos  $G'$  y  $G''$  del AN fueron casi paralelas y mostraron una menor dependencia de la  $\omega$ . Esto coincidió con lo reportado por Charles *et al.* (2005) para tres de cinco genotipos de almidón de mandioca estudiados. Estos investigadores sugieren que la ligera dependencia con la  $\omega$  estaría relacionada con el mayor contenido de amilosa y longitud de las cadenas de amilopectina las cuales contribuyen a una mayor firmeza y estabilidad del gel comparado con las variedades que mostraron dependencia de la  $\omega$ .

Los valores de  $G'$  y  $G''$  del almidón modificado fueron menores a los del AN en todo el rango de frecuencia. Según Osundahunsi *et al.* (2011) esto puede ser atribuido a la estabilidad de la integridad granular. Las diferencias de los valores de los módulos dinámicos del almidón modificado ( $G' > G''$ ) se incrementaron significativamente con el aumento de la frecuencia exhibiendo una mayor dependencia de la velocidad angular

que el AN. De acuerdo a Chaisawang & Supphantharika (2006) el mayor valor de  $G'$  del AN y menor dependencia con la frecuencia comparado con el almidón modificado 6HMT-13EC T/T podría estar relacionado con el mayor PH del AN, lo cual lleva a una mayor proximidad entre los gránulos hinchados y formación de una estructura de gel más fuerte. Esto se encuentra en concordancia con los otros hallazgos en este trabajo. Como se indicó el tratamiento de modificación 6HMT-13EC T/T restringió el aumento del tamaño del gránulo de almidón permitiéndole conservar su integridad a altas temperaturas y causó una disminución significativa del pico de viscosidad del amilograma.

El comportamiento similar a un sólido se comprobó además observando los valores graficados de la tangente del ángulo de fase en función de la frecuencia o velocidad angular (Figura 4.25). En ambas muestras de almidón, la tangente de  $\delta$  es aproximadamente igual o menor a 1, mostrando el comportamiento predominantemente sólido de las muestras, en el rango de frecuencia estudiado (Osundahunsi *et al.*, 2011). El menor valor de la tangente de  $\delta$  de 6HMT-13EC T/T comparado con el AN a la frecuencia de 10 rads/s indica que el almidón modificado es más estructurado y presenta un comportamiento más parecido a un sólido que el AN (Chainsawang & Supphantharika, 2006; Choi & Yoo, 2009).



**Figura 4.25.** Valores de  $\tan(\delta) = G''/G'$  de las pastas de AN y del de mandioca almidón modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón. Los puntos corresponden a una de dos determinaciones experimentales.

A partir de los datos obtenidos para las constantes del modelo de Ley de Potencia (Tabla 4.25), se puede observar que el valor de la pendiente B para el módulo elástico es mayor para 6HMT-13EC T/T en comparación con el AN. El valor de B está relacionado con la fuerza y la estructura del gel, valores de  $B = 0$  se hallan en geles covalentes y  $B > 0$  en geles por asociación física (Wongsagonsup *et al.*, 2014, Yoneya *et al.*, 2003). Valores bajos de B sugieren geles de estructura fuerte (Carbinatto *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicarían que el almidón modificado forma un gel más débil en comparación con las pastas del AN. El mismo fenómeno puede observarse con el valor de A, el cual para el almidón modificado es menor que para el AN. Esto demuestra un comportamiento predominantemente de sólido, en comparación con el AN.

De acuerdo a los valores de  $R^2$  obtenidos para ambas regresiones (Tabla 4.25), puede concluirse que el modelo de Ley de Potencia puede utilizarse para predecir satisfactoriamente los espectros mecánicos (o barridos de frecuencia) de ambas muestras de almidón.

**Tabla 4.25.** Parámetros reológicos del modelo de Ley de Potencia para el AN y el almidón de mandioca modificado por la combinación de 6HMT-13EC T/T.

Parámetros Muestra	G'			G''		
	A* (Pa)	B* (-)	R <sup>2</sup>	C* (Pa)	D* (-)	R <sup>2</sup>
AN	7,20 ± 2,04	0,31 ± 0,01	0,97	4,89 ± 0,76	0,28 ± 0,03	0,99
6HMT-13EC T/T	0,08 ± 0,00	2,02 ± 0,00	0,98	0,02 ± 0,01	1,26 ± 0,06	0,99

**Referencias:** AN = almidón de mandioca nativo, 6HMT-13EC T/T = tratamiento combinado de 6HMT = *heat moisture treatment* preparado a partir del almidón húmedo al 20 % (p/p) a 105 °C y tiempo de reacción de 5 h, 13EC T/T = enlaces cruzados con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio (99:1) al 15 % y 41,04 % de almidón. \*Valores promedio y desvíos estándares de dos determinaciones, A y C = constantes que corresponden a los módulos G' y G'' a una frecuencia de 1 rads/s, B y D = constantes que corresponden a las pendientes.

El comportamiento viscoelástico de los geles de almidón depende de la fase dispersa, de la fase continua y de su interacción. Algunos factores que pueden influir son la densidad de los EC en la fase continua, la rigidez o deformabilidad de los gránulos, la distribución espacial y el contacto efectivo entre los gránulos (Biliaderis & Tonagai, 1991; Eliasson, 1986). Las pastas de almidón pueden ser menos rígidas cuando

los gránulos presentan un alto PH lo cual los vuelve más blandos y deformables (Eliasson, 1986).

Wongsagonsup *et al.* (2014) observaron que, en el almidón de mandioca modificado por EC con TMFS/TPFS, los valores de los módulos  $G'$  y  $G''$  varían en función de la concentración del reactivo. Los mismos autores, observaron un incremento de los módulos a concentraciones bajas de TMFS/TPFS y una disminución a concentraciones superiores al 1 %. Estos investigadores, coincidiendo con el presente trabajo, encontraron valores más altos de la tangente de  $\delta$  para el AN en comparación con los almidones modificados por EC con TMFS/TPFS. En contraposición, observaron que con el uso de 1 % de TMFS/TPFS, el valor de la constante A fue más baja y el valor de la constante B fue más alto que los correspondientes al AN. Esto indicaría que en esas condiciones el gel formado fue más fuerte. Similares resultados fueron reportados en almidón de papa modificado con 500 ppm de  $POCl_3$  (Yoneya *et al.*, 2003) y en almidón de céreo de maíz modificado con TMFS (Khondkar *et al.*, 2007). Un alto grado de EC, al causar un bajo PH, disminuye la interacción granular ocasionando un menor aumento de  $G'$  (Singh *et al.* (2007).

Eerlingen *et al.* (1997) observaron que, en el almidón de papa modificado por el HMT, el comportamiento reológico (principalmente del módulo  $G'$ ) dependió de las condiciones del tratamiento. En sistemas concentrados, los valores del módulo  $G'$  dependieron de la rigidez de los gránulos observándose un incremento de  $G'$  con la disminución del PH y en sistemas diluidos el incremento de  $G'$  se presentó con el aumento del PH.

Se podría suponer que el comportamiento reológico observado en el almidón 6HMT-13EC T/T estaría relacionado con el pobre PH y la elevada rigidez conferida al gránulo de almidón por la combinación entre el HMT y EC con TMFS/TPFS. Esto condujo a que las pastas tuvieran un comportamiento más similar a un sólido pero con una estructura de gel débil comparado con el AN.

---

# CAPITULO 5

---

## 5. CONCLUSIONES

### 5.1. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden plantear las siguientes conclusiones parciales:

- Los tratamientos hidrotérmicos de ANN, el HMT y el OPT y el tratamiento químico de EC con EPI en las condiciones ensayadas no redujeron apreciablemente la digestibilidad *in vitro* del almidón de mandioca modificado.
- La modificación del AN por el método químico de EC con TMFS/TPFS, con una adecuada combinación de concentración de reactivo y cantidad de almidón, condujo a la obtención de un almidón de mandioca modificado de grado alimenticio con un elevado contenido de FDT.
- Las combinaciones duales de los tratamientos hidrotérmicos: ANN, HMT u OPT con el tratamiento químico EC con EPI causaron un efecto variado en la formación de FDT dependiendo de la secuencia de aplicación, exhibiendo en algunos casos una sutil disminución de la digestibilidad *in vitro*. Los niveles más altos de FDT se obtuvieron por la combinación de 4HMT-5EC EPI, 5EC EPI-6HMT y 5EC EPI-4OPT, los cuales resultaron poco significativos.
- Las combinaciones duales de los tratamientos hidrotérmicos: ANN u OPT con el tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS, independientemente del orden de aplicación, no favorecerían la formación FDT. Los almidones modificados por estas combinaciones presentan una mayor digestibilidad *in vitro* que el almidón modificado por el tratamiento químico.
- Una apropiada combinación dual del HMT (tratamiento hidrotérmico) con el tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS provoca un efecto sinérgico significativo en la formación de FDT a partir del AN y produce cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas.
- La secuencia de tratamientos que resultaría más efectiva para incrementar el contenido de FDT en el AN es la secuencia H-Q.

Donde:

H = HMT en condiciones de 20 % de humedad, temperatura de 105 °C y tiempo de reacción de 5 h.

Q = EC con TMFS/TPFS con el uso de una relación de reactivos de 99:1 y concentración de 15 %, concentración de almidón de 41,04 %, pH 11, temperatura de 45 °C y tiempo de reacción 3 h.

Este tratamiento combinado conduce a la obtención de un almidón modificado de grado alimenticio con un elevado contenido de FDT de 39,4 %, el cual presenta una estructura más ordenada y estabilidad granular desde el punto de vista térmico y estructural.

- La aplicación del tratamiento hidrotérmico (HMT) previo al tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS favorecería la formación de EC. Esto se infiere por el incremento en el contenido de fósforo. El cual no excedió el límite máximo permitido para uso alimentario con las concentraciones de reactivo utilizado, por lo tanto el almidón modificado podría ser utilizado como ingrediente alimentario.
- El almidón modificado por el tratamiento más efectivo para incrementar el contenido de FDT presentó:
  - pH y acidez titulable aceptables.
  - Mayor tamaño medio del gránulo a 25 °C en comparación con el AN.
  - Mayor termoestabilidad. El tratamiento restringe el aumento del tamaño del gránulo en suspensiones de agua con el incremento de la temperatura permitiéndole conservar su integridad granular a altas temperaturas.
  - Bajos PH, % SOL e IAA debido a la fuerte interacción entre las moléculas en el interior del gránulo ocasionados por los tratamientos aplicados.
  - Pastas con: Menor claridad y mayor estabilidad durante el almacenamiento.
    - Mayor temperatura de empastamiento y gelatinización.
    - Baja viscosidad.
    - Ausencia de retrogradación.
    - Comportamiento reológico más similar a un sólido con estructura de gel más débil que el AN.
- La obtención de una estructura más ordenada en el gránulo de almidón modificado por el tratamiento más efectivo para incrementar los niveles de FDT, estaría respaldada: por los bajos valores de PH, de % SOL, de IAA y de digestibilidad, estabilidad de las pastas y aumento en las temperaturas de gelatinización.

- Se infiere que los almidones obtenidos por la combinación de tratamientos más efectiva para reducir la digestibilidad *in vitro* del AN serían principalmente adecuados para la utilización en:
  - Alimentos que son sometidos a tratamientos térmicos durante su procesamiento como cocción, pasteurización, secado con calor, autoclavado, etc., como los productos enlatados, porque presentan estabilidad térmica.
  - Alimentos en los cuales no se desea un aumento o cambio en la viscosidad por el uso de altas temperaturas, por ejemplo en: pastas, fideos, productos de panadería entre otros.
  - Alimentos con baja humedad por su reducida capacidad de absorción de agua lo cual influye en la actividad del agua del producto terminado y retrogradación, por ejemplo en: cereales para desayuno, productos panificados entre otros.
  - Alimentos sometidos a altas temperaturas en los cuales se pretende aumentar la crocantez en la superficie sumado al aporte de fibra.
  - Bebidas saludables opacas en las cuales otorgaría mayor suavidad e interferiría en menor medida en el flavor que las fibras tradicionales, por ejemplo en yogurt.
  - Formulaciones de alimentos para diabéticos, celíacos, etc.

El almidón obtenido no sería apropiado para el empleo como espesante de un alimento debido a su escaso hinchamiento y viscosidad.

## **5.2. CONCLUSIÓN GENERAL**

La combinación dual de HMT-EC con TMFS/TPFS se presenta como una promisorio alternativa para la producción de almidones modificados de grado alimenticio con reducida digestibilidad *in vitro* a partir del almidón nativo de mandioca producido en la provincia de Misiones.

El almidón modificado podría ser utilizado para la formulación y la elaboración de alimentos funcionales con el objeto de incrementar la cantidad de FDT, los cuales tendrían mejores propiedades organolépticas que las obtenidas con el uso de las fibras tradicionales.

---

# CAPITULO 6

---

## 6. PROPUESTA DE TRABAJOS FUTUROS

Los trabajos futuros que podrían realizarse a partir de los resultados obtenidos en esta tesis son los siguientes:

- Determinación de la aplicabilidad del almidón de mandioca modificado por la combinación del tratamiento hidrotérmico, HMT, con el tratamiento químico de EC con TMFS/TPFS en diferentes matrices alimentarias, por ejemplo: fideos, productos panificados, yogurt, etc.

Objetivos:

- Formular el alimento con diferentes cantidades del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T.
  - Determinar el contenido de FDT en el alimento formulado y en el alimento sin el agregado del almidón modificado en las condiciones de consumo habitual.
  - Evaluar las propiedades fisicoquímicas de los alimentos formulados.
  - Evaluar las propiedades sensoriales de los alimentos formulados.
- Influencia de la temperatura y de la humedad durante el almacenamiento en el alimento formulado con almidón de mandioca modificado con elevado contenido de FDT.

Objetivos:

- Elaborar el alimento formulado con el almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T que presenta mejores propiedades organolépticas.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y contenido de FDT del alimento formulado almacenado durante diversos tiempos en diferentes combinaciones de temperatura y humedad.
- Establecer el tiempo de vida útil del alimento formulado.

- Formulación de un alimento para celíacos con elevado contenido de FDT.

Objetivos:

- Formular pre-mezclas para alimentos destinados a celíacos con el agregado de diferentes cantidades del almidón de mandioca modificado (6HMT-13EC T/T).
- Elaborar el alimento, por ejemplo: fideos, productos panificados, etc.
- Determinar el contenido de FDT en el alimento formulado y en el alimento sin el agregado del almidón modificado en las condiciones de consumo habitual.

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de los alimentos formulados.
  - Evaluar las propiedades sensoriales del alimento formulado.
  - Evaluar parámetros de calidad.
- Evaluar el efecto de la combinación de los tratamientos 6HMT-13EC T/T en la formación de AR en almidones de diferentes orígenes botánicos.

Objetivos:

- Obtener almidones modificados por 6HMT-13EC T/T de diferentes orígenes botánicos, por ejemplo: maíz, papa, etc.
- Evaluar contenido de AR y propiedades fisicoquímicas del almidón modificado.

---

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC (American Association of Cereal Chemistry) International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 32-05.01, Total dietary fiber. Method 32-07.01, Soluble, insoluble, and total dietary fiber in foods and food products. Method 32-40.01, Resistant Starch in Starch Samples and Plant Materials. Method 32-45.01, Total dietary fiber (Codex Alimentarius definition). Method 32-50.01, Insoluble, soluble, and total dietary fiber (Codex definition) by an enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.
- Abera, S., & Rakshit, S. K. (2003). Processing technology comparison of physicochemical and functional properties of cassava starch extracted from fresh root and dry chips. *Starch-Stärke*, 55(7), 287-296.
- Abraham, T. E. (1993). Stabilization of paste viscosity of cassava starch by heat moisture treatment. *Starch-Stärke*, 45(4), 131-135.
- Ačkar, Đ., Babić, J., Šubarić, D., Kopjar, M., & Miličević, B. (2010). Isolation of starch from two wheat varieties and their modification with epichlorohydrin. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 76-82.
- Acquarone, V. M., & Rao, M. A. (2003). Influence of sucrose on the rheology and granule size of cross-linked waxy maize starch dispersions heated at two temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 451-458.
- Adebowale, K. O., Afolabi, T. A., & Olu-Owolabi, B. I. (2005). Hydrothermal treatments of Finger millet (*Eleusine coracana*) starch. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 974-983.
- Adebowale, K. O., Henle, T., Schwarzenbolz, U., & Doert, T. (2009). Modification and properties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa* Hochst. Ex A. Rich.) Harms starch I: Heat moisture treatments and annealing. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1947-1957.
- Adebowale, K. O. & Lawal, O. S. (2003). Functional properties and retrogradation behavior of native and chemically modified starch of mucuna bean (*Mucuna pruriens*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(15), 1541-2154.
- Aguilar Brenes, E., Segreda Rodríguez, A., Saborío Argüello, D., Morales González, J., Chacón Lizano, M., Rodríguez Rojas, L., Acuña Chinchilla, P., Torres Portuguez, S. & Gómez Bonilla, Y. (2017). Manual del cultivo de yuca. *Manihot esculenta* Crantz. Instituto Nacional de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria

- (INTA). Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>. Fecha de consulta: 15 de enero de 2019.
- Ahuja, G., Jaiswal, S., & Chibbar, R. N. (2013). Starch biosynthesis in relation to resistant starch. In *Resistant starch: Sources, applications and health benefits*. John Wiley, Chichester, UK, pp. 1-22.
- Akerberg, A. K., Liljeberg, H. G., Granfeldt, Y. E., Drews, A. W., & Björck, I. M. (1998). An *in vitro* method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber. *The Journal of Nutrition*, 128(3), 651-660.
- Alcázar-Alay, S. C., & Meireles, M. A. A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*, 35(2), 215-236.
- Allem, A. C. (1994). The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* (Holanda), 14(3), 133-150.
- Al-Mana, N. M., & Robertson, M. D. (2018). Acute effect of resistant starch on food intake, appetite and satiety in overweight/obese males. *Nutrients*, 10(12), 1993.
- Almeida, E. L., Chang, Y. K., & Steel, C. J. (2013). Dietary fibre sources in frozen part-baked bread: Influence on technological quality. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 262-270.
- Anggraini, V., Sudarmonowati, E., Hartati, N. S., Suurs, L., & Visser, R. G. (2009). Characterization of cassava starch attributes of different genotypes. *Starch-Stärke*, 61(8), 472-481.
- Alsaffar, A. A. (2011). Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(3), 455-462.
- Al-Tamimi, E. K. (2007). Effect of resistant starch type 4 on glycemia and insulin sensitivity in young adults (Doctoral dissertation, Kansas State University).
- Alting, A. C., Van de Velde, F., Kanning, M. W., Burgering, M., Mulleners, L., Sein, A., & Buwalda, P. (2009). Improved creaminess of low-fat yoghurt: The impact of amyломaltase-treated starch domains. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 980-987.
- Amani, N., Kamenan, A., Rolland-Sabate, A., & Colonna, P. (2005). Stability of yam starch gels during processing. *Africans Journal of Biotechnology*, 4, 94-101.

- Andrade, M. M. P., de Oliveira, C. S., Colman, T. A. D., da Costa, F. J. O. G., & Schnitzler, E. (2014). Effects of heat–moisture treatment on organic cassava starch. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115(3), 2115-2122.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2012). Official Methods of Analysis of AOAC international, 19th edition. Method 991.43, Total, insoluble and soluble dietary fiber in foods. Enzymatic gravimetric method. MES-Tris buffer. Method 985.29, Total dietary fiber in Foods. Enzymatic-gravimetric method. Method 2002.02. Resistant starch in starch and plant materials. Method 2009.01. Total dietary fiber (Codex definition) by an enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography. Method 2011.25. Insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). (1995). Official Methods of Analysis of AOAC international, 16th edition. Method 995.11, Phosphorus (Total) in Foods, Colorimetric Method. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). (1997). Official Methods of Analysis of AOAC international, 16th edition, Volume I, Section 12.1.07, Method 960.52, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Aravind, N., Sissons, M., Fellows, C. M., Blazek, J., & Gilbert, E. P. (2013). Optimisation of resistant starch II and III levels in durum wheat pasta to reduce *in vitro* digestibility while maintaining processing and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 136(2), 1100-1109.
- Aristizábal J., & Calle F. (2015). Producción, procesamiento, usos y comercialización de mandioca. Cuaderno tecnológico Nro. 22. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). Unión Europea. Ministerio de Producción. Presidencia de la Nación. Argentina. <https://www.inti.gob.ar/ue/pdf/publicaciones/cuadernillo22.pdf>. Fecha de consulta: 15 de enero de 2019.
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. In Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. <http://www.fao.org/docrep/010/a1028s/a1028s00.HTM>. Fecha de consulta: 15 de enero de 2019.
- Asaoka, M., Blanshard, J. M. V., & Rickard, J. E. (1991). Seasonal effects on the physico-chemical properties of starch from four cultivars of cassava. *Starch-Stärke*, 43(12), 455-459.

- Asaoka, M., Blanshard, J. M. V., & Rickard, J. E. (1992). Effects of cultivar and growth season on the gelatinisation properties of cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(1), 53-58.
- Asaoka, M., Blanshard, J. M. V., & Rickard, J. E. (1993). The effect of pre-harvest pruning on the quality of cassava starch. *Annals of Applied Biology*, 122(2), 337-344.
- Ashogbon, A. O., & Akintayo, E. T. (2014). Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review. *Starch-Stärke*, 66(1-2), 41-57.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Wani, I. A., Shah, A., Masoodi, F. A., & Saxena, D. C. (2016a). Production of resistant starch from rice by dual autoclaving-retrogradation treatment: *In vitro* digestibility, thermal and structural characterization. *Food Hydrocolloids*, 56, 108-117.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2016b). Preparation, health benefits and applications of resistant starch-A review. *Starch-Stärke*, 68(3-4), 287-301.
- Auh, J. H., Chae, H. Y., Kim, Y. R., Shim, K. H., Yoo, S. H., & Park, K. H. (2006). Modification of rice starch by selective degradation of amylose using alkalophilic *Bacillus cyclomaltodextrinase*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2314-2319.
- Babić, J., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Kovačević, D., Piližota, V., & Kopjar, M. (2007). Preparation and characterization of acetylated tapioca starches. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103(12), 580-585.
- Babu, A. S., & Parimalavalli, R. (2018). Effect of pullulanase debranching and storage temperatures on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 208-216.
- Baghurst, K., Baghurst, P. A., Record, S. J. (1996). Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch: A review. *Food Australia*, 48(3), S3-S35.
- Baghurst, K. I., Baghurst, P. A., & Record, S. J. (2001). Dietary Fiber, Non-Starch Polysaccharide, and Resistant Starch Intakes in Australia. In *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. CRC Press, pp. 583-591.
- Baixaui, R., Salvador, A., Martínez-Cervera, S., & Fiszman, S. M. (2008). Distinctive sensory features introduced by resistant starch in baked products. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1927-1933.

- Banks, W., & Greenwood, C. T. (1975). *Starch and its Components*. John Wiley & Sons. New York.
- Barichello, V., Yada, R. Y., Coffin, R. H., & Stanley, D. W. (1990). Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: starch structure and composition. *Journal of Food Science*, 55(4), 1054-1059.
- Bello-Pérez, L., Contreras, S., Romero, R., Solorza, J. & Jiménez, A. (2002). Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano (*Musa paradisiaca* L. var. macho). *Agrociencia*, 36, 169-180.
- BeMiller, J. N. (1997). Starch modification: challenges and prospects. *Starch-Stärke*, 49(4), 127-131.
- Berry, C. S. (1986). Resistant starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4(4), 301-314.
- Bertoft, E. (2013). On the building block and backbone concepts of amylopectin structure. *Cereal Chemistry*, 90(4), 294-311.
- Bertoft, E., Zhu, Q., Andtfolk, H., & Jungner, M. (1999). Structural heterogeneity in waxy-rice starch. *Carbohydrate polymers*, 38(4), 349-359.
- Biliaderis, C. G. (1992). Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology*, 46:98-102.
- Biliaderis, C. G. (1998). Structures and phase transitions of starch polymers. In: *Polysaccharide Association Structures in Food*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 57-168.
- Biliaderis, C. G., & Tonogai, J. R. (1991). Influence of lipids on the thermal and mechanical properties of concentrated starch gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5), 833-840.
- Biliaderis, C. G., Maurice, T. J., & Vose, J. R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, 45(6), 1669-1674.
- Bird, A. R., Lopez-Rubio, A., Shrestha, A. K., & Gidley, M. J. (2009). Resistant starch *in vitro* and *in vivo*: Factors determining yield, structure, and physiological relevance. In *Modern Biopolymer Science*. Academic Press, pp. 449-510.
- Blazek, J., & Gilbert, E. P. (2011). Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 281-293.

- Blazek, J., Salman, H., Rubio, A. L., Gilbert, E., Hanley, T., & Copeland, L. (2009). Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content and functional characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 705-711.
- Ble-Castillo, J. L., Juárez-Rojop, I. E., Tovilla-Zárate, C. A., García-Vázquez, C., Servin-Cruz, M. Z., Rodríguez-Hernández, A., Araiza-Saldaña, C. I., Nolasco-Coleman, A. M., & Díaz-Zagoya, J. C. (2017). Acute consumption of resistant starch reduces food intake but has no effect on appetite ratings in healthy subjects. *Nutrients*, 9(7), 696.
- Bodinham, C. L., Frost, G. S., & Robertson, M. D. (2010). Acute ingestion of resistant starch reduces food intake in healthy adults. *British Journal of Nutrition*, 103(6), 917-922.
- Breuninger, W. F., Piyachomkwan, K., & Sriroth, K. (2009). Tapioca/cassava starch: Production and use. In *Starch. Chemistry and Tecnology*. Third Edition. Edited by BeMiller, J. and Whistler, R. Academic Press, pp. 541-568.
- Brouns, F., Kettlitz, B., & Arrigoni, E. (2002). Resistant starch and the butyrate revolution. *Trends in Food Science & Technology*, 13(8), 251-261.
- Brown, I. (1996). Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutrition Reviews*, 54(11), S115-S119.
- Brumovsky, J. O., & Thompson, D. B. (2001). Production of boiling-stable granular resistant starch by partial acid hydrolysis and hydrothermal treatments of high-amylose maize starch. *Cereal Chemistry*, 78(6), 680-689.
- Brumovsky, L. A., Brumovsky, J. O., Fretes, M. R., & Peralta, J. M. (2009). Quantification of resistant starch in several starch sources treated thermally. *International Journal of Food Properties*, 12(3), 451-460.
- Buttriss, J. L., & Stokes, C. S. (2008). Dietary fibre and health: an overview. *Nutrition Bulletin*, 33(3), 186-200.
- Caesar, G. V., & Moore, E. E. (1935). Consistency changes in starch pastes tapioca, corn, wheat, potato, and sweet potato. *Industrial & Engineering Chemistry*, 27(12), 1447-1451.
- Cameron, R. E., & Donald, A. M. (1992). A small-angle X-ray scattering study of the annealing and gelatinization of starch. *Polymer*, 33(12), 2628-2635.
- Carbinatto, F. M., de Castro, A. D., Cury, B. S., Magalhães, A., & Evangelista, R. C. (2012). Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 281-288.

- Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1376-1382.
- Carmona-García, R., Sánchez-Rivera, M. M., Méndez-Montealvo, G., Garza-Montoya, B., & Bello-Pérez, L. A. (2009). Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiaca*). *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 117-122.
- Ceballos, H. & De la Cruz, G. A. (2002). Taxonomía y morfología de la yuca. En: La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Nro. 327. Capítulo 2, pp. 13-28.
- Chaisawang, M., & Supphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 641-649.
- Champ, M. (1992). Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S51-62.
- Champ, M., Langkilde, A. M., Brouns, F., Kettlitz, B., & Le Bail-Collet, Y. (2003). Advances in dietary fibre characterisation. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labelling. *Nutrition Research Reviews*, 16(2), 143-161.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 131-141.
- Charles, A. L., Chang, Y. H., Ko, W. C., Siroth, K., & Huang, T. C. (2005). Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2717-2725.
- Charoenkul, N., Uttapap, D., Pathipanawat, W., & Takeda, Y. (2006). Molecular structure of starches from cassava varieties having different cooked root textures. *Starch-Stärke*, 58(9), 443-452.
- Chatakanonda, P., Varavinit, S., & Chinachoti, P. (2000a). Relationship of gelatinization and recrystallization of cross-linked rice to glass transition temperature. *Cereal Chemistry*, 77(3), 315-319.

- Chatakanonda, P., Varavinit, S., & Chinachoti, P. (2000b). Effect of crosslinking on thermal and microscopic transitions of rice starch. *LWT-Food Science and Technology*, 33(4), 276-284.
- Chen, H. M., Fu, X., & Luo, Z. G. (2015). Effect of gum arabic on freeze-thaw stability, pasting and rheological properties of tapioca starch and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51, 355-360.
- Choi, H. M., & Yoo, B. (2009). Steady and dynamic shear rheology of sweet potato starch-xanthan gum mixtures. *Food Chemistry*, 116(3), 638-643.
- Chung, H. J., Cho, A., & Lim, S. T. (2012). Effect of heat-moisture treatment for utilization of germinated brown rice in wheat noodle. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 342-347.
- Chung, H. J., Lim, H. S., & Lim, S. T. (2006). Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. *Journal of Cereal Science*, 43(3), 353-359.
- Chung, H. J., Liu, Q., & Hoover, R. (2009). Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 436-447.
- Chung, H. J., Liu, Q., & Hoover, R. (2010). Effect of single and dual hydrothermal treatments on the crystalline structure, thermal properties, and nutritional fractions of pea, lentil, and navy bean starches. *Food Research International*, 43(2), 501-508.
- Chung, H. J., Shin, D. H., & Lim, S. T. (2008). *In vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Research International*, 41(6), 579-585.
- Chung, H. J., Woo, K. S., & Lim, S. T. (2004). Glass transition and enthalpy relaxation of cross-linked corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 55(1), 9-15.
- Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In *Biopolymers* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 57-192.
- Code of Federal Regulations (CFR) (2010). Food-starch modified. In: *Food Additives Permitted in Foods for Human Consumption*, Title 21 Chapter 1, Part 172, Section 172.892. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., U. S. A.
- Codex (2009). Report on the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. ALINORM 09/32/26, Appendix II (p. 46). Rome; Codex Alimentarius Commission.

- Código Alimentario Argentino (CAA) (2018), actualizado al 2018, Almidones modificados (Res 101,8.8.75) en Aditivos Alimentarios, Capitulo XVIII, Artículo 1398, Inciso 23.1-4G. [www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp). Fecha de consulta: 03 de julio de 2018.
- Colonna, P., Leloup, V., & Buleon, A. (1992). Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S17-32.
- Conde-Petit, B., Nuessli, J., Arrigoni, E., Escher, F., & Amado, R. (2001). Perspectives of starch in food science. *Chimia, International Journal for Chemistry*, 55(3), 201-205.
- Cooke, D., & Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227, 103-112.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534.
- Coudray, C., Bellanger, J., Castiglia-Delavaud, C., Remesy, C., Vermorel, M., & Rayssiguier, Y. (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(6), 375.
- Cummings, J. H., & Englyst, H. N. (1995). Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(4), 938S-945S.
- CSIRO (Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization of Australia (2019). <http://www.ausfoodnews.com.au/2012/04/26/csiro-developing-resistant-starch-with-aim-to-tackle-bowel-cancer-in-australia.html>. Fecha de consulta: 05 de marzo de 2019.
- da Rosa Zavareze, E., & Días, A. R. G. (2011). Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 317-328.
- da Rosa Zavareze, E., Storck, C. R., de Castro, L. A. S., Schirmer, M. A., & Dias, A. R. G. (2010). Effect of heat-moisture treatment on rice starch of varying amylose content. *Food Chemistry*, 121(2), 358-365.
- Davies, L. (1995). Starch-composition, modifications, applications and nutritional value in foodstuffs. Food Tech Europe (United Kingdom).
- Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico-chemical properties of cassava starch. *Starch-Stärke*, 50(2-3), 58-64.

- Deetae, P., Shobsngob, S., Varayanond, W., Chinachoti, P., Naivikul, O., & Varavinit, S. (2008). Preparation, pasting properties and freeze–thaw stability of dual modified crosslink-phosphorylated rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 351-358.
- Deffenbaugh, L. B., & Walker, C. E. (1989). Comparison of starch pasting properties in the Brabender Viscoamylograph and the Rapid Visco-Analyzer. *Cereal Chemistry*, 66(6), 493-499.
- DeVries, J. W. (2010). Validating official methodology commensurate with dietary fibre research and definitions. In *Dietary Fibre: New Frontiers for Food and Health*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 29-48.
- DeVries, J. W., Prosky, L., Li, B., & Cho, S. (1999). A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World*, 44(5), 367-369.
- Donald, A. M., Kato, K. L., Perry, P. A., & Waigh, T. A. (2001). Scattering studies of the internal structure of starch granules. *Starch-Stärke*, 53(10), 504-512.
- Donovan, J. W. (1979). Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 18(2), 263-275.
- Dupuis, J. H., Liu, Q., & Yada, R. Y. (2014). Methodologies for increasing the resistant starch content of food starches: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1219-1234.
- Edwards A., Fulton D. C., Hylton C. M., Jobling S. A., Gidley M., Rössner U., Martin C., & Smith A. M. (1999). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal*, 17, 251-61.
- Eerlingen, R. C., Deceuninck, M., & Delcour, J. A. (1993). Enzyme resistant starch. II. Influence of amylose chain length on resistant starch formation. *Cereal Chemistry* 70(3),345–350.
- Eerlingen, R. C., Jacobs, H., Block, K., & Delcour, J. A. (1997). Effects of hydrothermal treatments on the rheological properties of potato starch. *Carbohydrate Research*, 297(4), 347-356.
- Eke, J., Achinewhu, S. C., Sanni, L., Barimalaa, I. S., Maziya-Dixon, B., & Dixon, A. (2007). Seasonal variations in the chemical and functional properties of starches from local and improved cassava varieties in high rainfall region of Nigeria. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(3-4), 36.

- Eliasson A. C. (1985). Retrogradation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In *New approaches to research on cereal carbohydrates*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 93–98.
- Eliasson, A. C. (1986). Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch I. Comparison of wheat, maize, potato and waxy-barley starches. *Journal of Texture Studies*, 17(3), 253-265.
- Eliasson, A. C. (2017). *Starch: Physicochemical and functional aspects*. In *Carbohydrates in Food, Third Edition*. CRC Press, pp. 501-600.
- Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1987). Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(2), 423-431.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46 (2): S33–S50.
- Englyst, H., Wiggins, H. S., & Cummings, J. H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, 107(1272), 307-318.
- Englyst, H. N., & Hudson, G. J. (1996). The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*, 57, 15–21.
- Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., & Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: An *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448-454.
- Englyst, K. N., Vinoy, S., Englyst, H. N., & Lang, V. (2003). Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *British Journal of Nutrition*, 89, 329-339.
- European Parliament. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Union Article ID:L 354/16*.
- Faisant, N., Planchot, V., Kozlowski, F., Pacouret, M. P., Colonna, P., & Champ, M. (1995). Resistant starch determination adapted to product containing high level of resistant starch. *Sciences des Aliments*, 15(1), 83-89.
- Fannon, J. E., Hauber, R. J., & BeMiller, J. N. (1992). Surface pores of starch granules. *Cereal Chemistry*, 69(3), 284-288.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2017). *Perspectivas alimentarias. Resúmenes de mercado*. Rome, Italy: FAO. <http://www.fao.org/3/a-i8307s.pdf>. Fecha de consulta: 21 de enero de 2019.
- Faraj, A., Vasanthan, T., & Hoover, R. (2004). The effect of extrusion cooking on resistant starch formation in waxy and regular barley flours. *Food Research International*, 37(5), 517-525.
- Fausto, F. D., Kacchi, A. I., & Mehta, D. (1997). Starch products in confectionery. *Beverage Food World*, 24(4), 4-16.
- Feltan R., Villasanti A., & Padawer A. (2016). La mandioca. *Tecnología en Alimentos para la Economía Social. Programa Consejo de la Demanda de Actores Sociales*. Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva. Presidencia de la Nación. Argentina. <http://cyt.rec.uba.ar>. Fecha de consulta: 11 de enero de 2019.
- Ferguson, L. R., Tasman-Jones, C., Englyst, H., & Harris, P. J. (2000). Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutrition and Cancer*, 36(2), 230-237.
- Foods for Special Dietary Uses. ALINORM 09/32/26, Appendix II (p. 46). Rome: Codex Alimentarius Commission.
- Fortuna, T., Juszczak, L., & Pałasiński, M. (1998). Change in the granule porosity on modification of starch. *Żywność. Technologia. Jakość*, 17, 124-130.
- Franco, C. M., Ciacco, C. F., & Tavares, D. Q. (1995). Effect of the heat-moisture treatment on the enzymatic susceptibility of corn starch granules. *Starch-Stärke*, 47(6), 223-228.
- French, D. (1972). Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 19(1), 8-25.
- French, D. (1984). Organization of starch granules. In *Starch chemistry and technology*. Second Edition. New York, NY, Academic Press, pp. 183-247.
- Frohberg, C., & Quanz, M. (2008). US Patent Application No. 10/577,073.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M. J., Sánchez-Zapata, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Resistant starch as functional ingredient. A review. *Food Research International*, 43(4), 931-942.
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic. A review. *Starch-Stärke*, 63(7), 406-415.

- Gall, A. F., Fabre, H. C., & Raimondi, H. L. (1975). Preparación de almidón de mandioca reticulado para uso en la industria de los alimentos. *Revista del Instituto de Tecnología de los Alimentos*, 1(1), 163-74. 1975.
- Gidley, M. J., & Bociek, S. M. (1985). Molecular organization in starches: A carbon 13 CP/MAS NMR study. *Journal of the American Chemical Society*, 107(24), 7040-7044.
- Gidley, M. J., & Bulpin, P. V. (1989). Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on phase behavior and aggregation kinetics. *Macromolecules*, 22(1), 341-346.
- Gong, B., Xu, M., Li, B., Wu, H., Liu, Y., Zhang, G., Ouyang, S., & Li, W. (2017). Repeated heat-moisture treatment exhibits superiorities in modification of structural, physicochemical and digestibility properties of red adzuki bean starch compared to continuous heat-moisture way. *Food Research International*, 102, 776-784.
- Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E., & Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*, 56(4), 445-449.
- González-Soto, R. A., Mora-Escobedo, R., Hernández-Sánchez, H., Sánchez-Rivera, M., & Bello-Pérez, L. A. (2007). The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food Research International*, 40(2), 304-310.
- Gordon, D. (2007). Dietary fiber definitions at risk. *Cereal Foods World*, 52(3), 112.
- Gui-Jie, M., Peng, W., Xiang-Sheng, M., Xing, Z., & Tong, Z. (2006). Crosslinking of corn starch with sodium trimetaphosphate in solid state by microwave irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(6), 5854-5860.
- Gunaratne, A., & Corke, H. (2007). Functional properties of hydroxypropylated cross linked, and hydroxypropylated cross linked tuber and root starches. *Cereal Chemistry*, 84(1), 30-37
- Gunaratne, A., & Hoover, R. (2002). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 425-437.
- Gutiérrez, T. J., Pérez, E., Guzmán, R., Tapia, M. S., & Famá, L. (2014). Physicochemical and functional properties of native and modified by crosslinking, dark cush-cush yam (*Dioscorea trifida*) and cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 2(1), 1-5.

- Hamdi, G., & Ponchel, G. (1999). Enzymatic degradation of epichlorohydrin crosslinked starch microspheres by  $\alpha$ -amylase. *Pharmaceutical Research*, 16(6), 867-875.
- Han, J. A., & BeMiller, J. N. (2007). Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 366-374.
- Hasjim, J., Ai, Y., & Jane, J. L. (2013). Novel applications of amylose-lipid complex as resistant starch type 5. In *Resistant Starch: Sources, Applications and Health Benefits*, First Edition. John Wiley & Sons. Chichester, West Sussex, UK, pp. 79-94.
- Hayashi, A., Kinoshita, K., & Miyake, Y. (1981). The conformation of amylose in solution. I. *Polymer Journal*, 13(6), 537-541.
- Haynes, L., Gimmler, N., Locke III, J. P., Kweon, M. R., Slade, L., & Levine, H. (2000). US Patent No. 6,013,299. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology*, 28(3), 718-726.
- Hickman, B. E., Janaswamy, S., & Yao, Y. (2009). Autoclave and  $\beta$ -amylolysis lead to reduced *in vitro* digestibility of starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7005-7012.
- Higgins, J. A. (2014). Resistant starch and energy balance: impact on weight loss and maintenance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9), 1158-1166.
- Higgins, J. A., Higbee, D. R., Donahoo, W. T., Brown, I. L., Bell, M. L., & Bessesen, D. H. (2004). Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutrition & Metabolism*, 1(1), 8.
- Hirsch, J. B., & Kokini, J. L. (2002). Understanding the mechanism of cross linking agents ( $\text{POCl}_3$ , STMP, and EPI) through swelling behaviour and pasting properties of cross-linked waxy maize starches. *Cereal Chemistry*, 79 (1), 102-107.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 141(2), 295-306.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, 147(2), 342-347.

- Hizukuri, S., Tabata, S., & Nikuni, Z. (1970). Studies on starch phosphate part 1. Estimation of glucose-6-phosphate residues in starch and the presence of other bound phosphate (s). *Starch-Stärke*, 22(10), 338-343.
- Hofvander, P., Andersson, M., Larsson, C. T., & Larsson, H. (2004). Field performance and starch characteristics of high-amylose potatoes obtained by antisense gene targeting of two branching enzymes. *Plant Biotechnology Journal*, 2(4), 311-320.
- Holm, J., & Björck, I. (1992). Bioavailability of starch in various wheat-based bread products: evaluation of metabolic responses in healthy subjects and rate and extent of *in vitro* starch digestion. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(2), 420-429.
- Homayouni, A., Amini, A., Keshtiban, A. K., Mortazavian, A. M., Esazadeh, K., & Pourmoradian, S. (2014). Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch-Stärke*, 66(1-2), 102-114.
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 253-267.
- Hoover, R., & Manuel, H. (1996a). The effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of normal maize, waxy maize, dull waxy maize and amylo maize V starches. *Journal of Cereal Science*, 23(2), 153-162.
- Hoover, R., & Manuel, H. (1996b). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of legume starches. *Food Research International*, 29(8), 731-750.
- Hoover, R., & Vasanthan, T. (1994). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume, and tuber starches. *Carbohydrate Research*, 252, 33-53.
- Horndok, R., & Noomhorm, A. (2007). Hydrothermal treatments of rice starch for improvement of rice noodle quality. *LWT-Food Science and Technology*, 40(10), 1723-1731.
- Hung, P. V., My, N. T. H., & Phi, N. T. L. (2014). Impact of acid and heat-moisture treatment combination on physicochemical characteristics and resistant starch contents of sweet potato and yam starches. *Starch-Stärke*, 66(11-12), 1013-1021.
- Iacovou, M., Lim, J., Maningat, C. C., Bogatyrev, A., Ly, E., Dhital, S., Gidley, J. Y., Shid, C., Muira, J., & Seib, P. A. (2017). *In vivo* digestibility of cross-linked phosphorylated (RS4) wheat starch in ileostomy subjects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 12, 25-36.

- IOM (Institute of Medicine of the National Academies) (1997). Phosphorus in Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. National Academy of Sciences, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. The National Academy Press, Washington DC, USA.
- Imberty, A., & Pérez, S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 27(8), 1205-1221.
- Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., & Pérez, S. (1991). Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch-Stärke*, 43(10), 375-384.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A., & Tran, V. (1988). The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *Journal of Molecular Biology*, 201(2), 365-378.
- Inagaki, T., & Seib, P. A. (1992). Firming of bread crumb with cross-linked waxy barley starch substituted for wheat starch. *Cereal Chemistry*, 69(3), 321-325.
- ISI (International Starch Institute) (1999). ISI 11-1e Determination of pH and acid factor of starch. ISI 12-1e Determination of acidity. Science Park Aarhus, Denmark.
- Jacobs, H., & Delcour, J. A. (1998). Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2895-2905.
- Jane, J. L. (2006). Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience*, 53(3), 205-213.
- Jane, J. L. (2007). Structure of starch granules. *Journal of Applied Glycoscience*, 54(1), 31-36.
- Jane, J. L. (2009). Structural features of starch granules II. *Chemistry and Technology*. Third Edition. Edited by BeMiller, J. and Whistler, R. Academic Press, pp. 193-236.
- Jane, J. L., & Robyt, J. F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate research*, 132(1), 105-118.
- Jane, J. L., Wong, K. S., & McPherson, A. E. (1997). Branch-structure difference in starches of A-and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrins. *Carbohydrate Research*, 300(3), 219-227.
- Jane, J. L., Xu, A., Radosavljevic, M., & Seib, P. A. (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. *Cereal Chemistry*, 69(4), 405-409.

- Janzen, J. G. (1969). Digestibility of starch and phosphated starches by pancreatin. *Starch-Stärke*, 21(9), 231.
- Jayakody L., & Hoover R. (2008). Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins. A review. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 691–703.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Augustin, L. S., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins A. L., & Axelsen, M. (2002). Glycemic index: Overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 266S-273S.
- Jobling, S. (2004). Improving Starch for Food and Industrial Applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 210-218.
- Juansang, J., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Pucha-arnon, S., & Uttapap, D. (2012). Effect of gelatinisation on slowly digestible starch and resistant starch of heat-moisture treated and chemically modified canna starches. *Food Chemistry*, 131(2), 500-507.
- Jyothi, A. N., Moorthy, S. N., & Rajasekharan, K. N. (2006). Effect of cross-linking with epichlorohydrin on the properties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch. *Starch-Stärke*, 58(6), 292-299.
- Jyothi, A. N., Sajeev, M. S., & Sreekumar, J. N. (2010). Hydrothermal modifications of tropical tuber starches. 1. Effect of heat-moisture treatment on the physicochemical, rheological and gelatinization characteristics. *Starch-Stärke*, 62(1), 28-40.
- Karim, A. A., Norziah, M. H., & Seow, C. C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71(1), 9-36.
- Kasemsuwan, T., Jane, J. L., 1996. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by P-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cereal Chemistry* 73(6), 702–707.
- Kassenbeck, P. (1978). Contribution to the knowledge on distribution of amylose and amylopectin in starch granules (maize, wheat). *Starch-Stärke*, 30(2), 40-46.
- Kaur, B., Ariffin, F., Bhat, R., & Karim, A. A. (2012). Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 398-404.
- Kaur, L., Singh, J., & Singh, N. (2006). Effect of cross-linking on some properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1945-1954.

- Kaur, L., Singh, J., & Singh, N. (2006). Effect of cross-linking on some properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1945-1954.
- Kaur, L., Singh, N., & Singh, J. (2004). Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 55(2), 211-223.
- Kavitha, R., & BeMiller, J. N. (1998). Characterization of hydroxypropylated potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 37 (2), 115-121.
- Kealy, T. (2006). Application of liquid and solid rheological technologies to the textural characterisation of semi-solid foods. *Food Research International*, 39(3), 265-276.
- Keenan, M. J., Zhou, J., McCutcheon, K. L., Raggio, A. M., Bateman, H. G., Todd, E., Jones, C. K., Tulley, R. T., Sheri Melton, Martin R. J., & Hegsted, M. (2006). Effects of resistant starch, a non-digestible fermentable fiber, on reducing body fat. *Obesity*, 14(9), 1523-1534.
- Khondkar, D., Tester, R. F., Hudson, N., Karkalas, J., & Morrow, J. (2007). Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1296-1301.
- Khunae, P., Tran, T., & Sirivongpaisal, P. (2007). Effect of heat-moisture treatment on structural and thermal properties of rice starches differing in amylose content. *Starch-Stärke*, 59(12), 593-599.
- Kim, N. H., Kim, J. H., Lee, S., Lee, H., Yoon, J. W., Wang, R., & Yoo, S. H. (2010). Combined effect of autoclaving-cooling and cross-linking treatments of normal corn starch on the resistant starch formation and physicochemical properties. *Starch-Stärke*, 62(7), 358-363.
- Kim, W. W., & Yoo, B. (2009). Rheological behaviour of acorn starch dispersions: Effects of concentration and temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 503-509.
- Kim, Y. K., & Robyt, J. F. (2000). Enzyme modification of starch granules: formation and retention of cyclomaltodextrins inside starch granules by reaction of cyclomaltodextrin glucanosyltransferase with solid granules. *Carbohydrate Research*, 328(4), 509-515.
- Kiseleva, V. I., Tester, R. F., Wasserman, L. A., Krivandin, A. V., Popov, A. A., & Yuryev, V. P. (2003). Influence of growth temperature on the structure and thermodynamic parameters of barley starches. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 407-415.

- Kittipongpatana, O. S., & Kittipongpatana, N. (2013). Physicochemical, *in vitro* digestibility and functional properties of carboxymethyl rice starch cross-linked with epichlorohydrin. *Food Chemistry*, 141(2), 1438-1444.
- Koo, S. H., Lee, K. Y., & Lee, H. G. (2010). Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 619-625.
- Kozlov, S. S., Blennow, A., Krivandin, A. V., & Yuryev, V. P. (2007). Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(5), 449-460.
- Kumoro, A. C., Retnowati, D. S., & Budiayati, C. S. (2010). Microwave assisted synthesis and characterization of acetate derivative cassava starch. *American Journal of Food Technology*, 5(2), 100-110.
- Lau, E., Zhou, W., & Henry, C. J. (2016). Effect of fat type in baked bread on amylose-lipid complex formation and glycaemic response. *British Journal of Nutrition*, 115(12), 2122-2129.
- Le Corre, D., & Angellier-Coussy, H. (2014). Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive and Functional Polymers*, 85, 97-120.
- Le Leu, R. K., Hu, Y., & Young, G. P. (2002). Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis*, 23(5), 713-719.
- Lee, C. J., Kim, Y., Choi, S. J., & Moon, T. W. (2012). Slowly digestible starch from heat-moisture treated waxy potato starch: Preparation, structural characteristics, and glucose response in mice. *Food Chemistry*, 133(4), 1222-1229.
- Lee, K. Y., Lee, S., Lee, H. G. (2013). Influence of storage temperature and autoclaving cycles on slowly digestible and resistant starch RS formation from partially debranched rice starch. *Starch/Starke*, 65(7-8), 694-701.
- Lee, S. C., Prosky, L., & De Vries, J. W. (1992). Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods: collaborative study (AOAC Method 991.43). *Journal of AOAC International*, 75(3), 395-416.
- Leelavathi, K., Indrani, D., & Sidhu, J. S. (1987). Amylograph pasting behaviour of cereal and tuber starches. *Starch-Stärke*, 39(11), 378-381.
- Lehmann, U., & Robin, F. (2007). Slowly digestible starch—its structure and health implications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), 346-355.

- Leloup, V. M., Colonna, P., Ring, S. G., Roberts, K., & Wells, B. (1992). Microstructure of amylose gels. *Carbohydrate Polymers*, 18(3), 189-197.
- Leszkowiat, M. J., Yada, R. Y., Coffin, R. H., & Stanley, D. W. (1990). Starch gelatinization in cold temperature sweetening resistant potatoes. *Journal of Food Science*, 55(5), 1338-1420.
- Li, L., Jiang, H., Campbell, M., Blanco, M., & Jane, J. L. (2008). Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 396-404.
- Lii, C. Y., Tsai, M. L., & Tseng, K. H. (1996). Effect of amylose content on the rheological property of rice starch. *Cereal Chemistry*, 73(4), 415-420.
- Lim, S., & Seib, P. A. (1993). Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. *Cereal Chemistry*, 70, 137-137.
- Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: A review. *Starch-Stärke*, 56(3-4), 89-99.
- Liu, H., Ramsden, L., & Corke, H. (1999). Physical properties of cross-linked and acetylated normal and waxy rice starch. *Starch-Stärke*, 51(7), 249-252.
- Liu, J., Ming, J., Li, W., & Zhao, G. (2012). Synthesis, characterisation and *in vitro* digestibility of carboxymethyl potato starch rapidly prepared with microwave-assistance. *Food Chemistry*, 133(4), 1196-1205.
- Liu, S., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Hu, F. B., Giovannucci, E., Colditz, G. A., Hennekens, C. H., & Willett, W. C. (2000). A prospective study of whole-grain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in US women. *American Journal of Public Health*, 90(9), 1409-1415.
- Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*, 131, 110-115.
- Lochocka, K., Bajerska, J., Glapa, A., Fidler-Witon, E., Nowak, J. K., Szczapa, T., Grebowiec, P., Lisowska, A., & Walkowiak, J. (2015). Green tea extract decreases starch digestion and absorption from a test meal in humans: a randomized, placebo-controlled crossover study. *Scientific Reports*, 5, 12015.
- Lockyer, S., & Nugent, A. P. (2017). Health effects of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 42(1), 10-41.

- Lopez, H. W., Levrat-Verny, M. A., Coudray, C., Besson, C., Krespine, V., Messenger, A., Demigné, C., & Rémésy, C. (2001). Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *The Journal of Nutrition*, 131(4), 1283-1289.
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160-168.
- Lorenz, K., & Kulp, K. (1982). Cereal and root starch modification by heat-moisture treatment. I. Physico-chemical properties. *Starch-Stärke*, 34(2), 50-54.
- Ludwig, D. S. (2002). The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *Jama*, 287(18), 2414-2423.
- Ludwig, D. S., Majzoub, J. A., Al-Zahrani, A., Dallal, G. E., Blanco, I., & Roberts, S. B. (1999). High glycemic index foods, overeating, and obesity. *Pediatrics*, 103(3), e26-e26.
- Luo, F. X., Huang, Q., Fu, X., Zhang, L. X. & Yu, S. J. (2009). Preparation and characterisation of crosslinked waxy potato starch. *Food Chemistry*, 115(2), 563-568.
- MacMasters, M. M. (1964). Microscopic techniques for determining starch granule properties. In *Methods in Carbohydrate Chemistry, Volume IV*. Academic Press, New York and London, pp. 233-240.
- Majzoobi, M., Radi, M., Farahnaky, A., Jamalian, J., & Tongdang, T. (2009). Physicochemical properties of phosphoryl chloride crosslinked wheat starch. *Iranian Polymer Journal*, 18(6), 491-499.
- Majzoobi, M., Sabery, B., Farahnaky, A., & Karrila, T. T. (2012). Physicochemical properties of cross-linked-annealed wheat starch. *Iranian Polymer Journal*, 21(8), 513-522.
- Malhotra, S. L. (1968). Epidemiological study of cholelithiasis among railroad workers in India with special reference to causation. *Gut*, 9(3), 290-295.
- Maningat, C. C., & Seib, P. A. (2013). RS 4-Type resistant starch: chemistry, functionality and health benefits. In *Resistant Starch: Sources, Applications and Health Benefits*, First Edition. John Wiley & Sons. Chichester, West Sussex, UK, pp 43-78.

- Maningat, C. C., Seib, P. A., & Bassi, S. D. (2013). Dietary fiber content of cross-linked phosphorylated resistant starch (RS4) determined by the Prosky and McCleary methods. Part II. Comparison of assay data. *Cereal Foods World*, 58(5), 252-263.
- Manners, D. J. (1989). Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, 11(2), 87-112.
- Manners, D. J., & Matheson, N. K. (1981). The fine structure of amylopectin. *Carbohydrate Research*, 90(1), 99-110.
- Martinez-Flores, H. E., Chang, Y. K., Martinez-Bustos, F., & Sgarbieri, V. (2004). Effect of high fiber products on blood lipids and lipoproteins in hamsters. *Nutrition Research*, 24(1), 85-93.
- Maurice, T. J., Slade, L., Sirett, R. R., & Page, C. M. (1985). Polysaccharide-water interactions-thermal behavior of rice starch. In *Properties of water in foods*. Springer, Dordrecht. pp. 211-227.
- Mazurs, E. G., Schoch, T. J., & Kite, F. E. (1957). Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. *Cereal Chemistry*, 34(3), 141-152.
- McCleary, B. V. (2007). An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 291-308.
- McCleary, B. V. (2013). Measurement of resistant starch and incorporation of resistant starch dietary fibre measurements. In *Resistant Starch: Sources, Applications and Health Benefits*, First Edition. John Wiley & Sons. Chichester, West Sussex, UK, pp. 43-78.
- McCleary, B. V., & Monaghan, D. A. (2002). Measurement of resistant starch. *Journal of AOAC International*, 85(3), 665-675.
- Medina, J. A., & Salas, J. C. (2008). Morphological characterization of native starch granule: Appearance, shape, size and its distribution. *Revista de Ingeniería*, (27), 56-62.
- Megazyme (2017). Total dietary fiber assay procedure. [https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-tdfr\\_data.pdf](https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-tdfr_data.pdf). Fecha de consulta: 02 de febrero de 2019.
- Megazyme (2018). Resistant Starch assay procedure. [https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-rstar\\_data.pdf](https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-rstar_data.pdf). Fecha de consulta: 02 de febrero de 2019.

- Mermelstein, N. H. (2009). Laboratory: analyzing for resistant starch. *Food Technology (Chicago)*, 63(4), 80-84.
- Mirmoghtadaie, L., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2009). Effects of cross-linking and acetylation on oat starch properties. *Food Chemistry*, 116(3), 709-713.
- Mishra, S., & Rai, T. (2006). Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 557-566.
- Moorthy, S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches. A review. *Starch-Stärke*, 54(12), 559-592.
- Moorthy, S. N., & Ramanujam, T. (1986). Variation in properties of starch in cassava varieties in relation to age of the crop. *Starch-Stärke*, 38(2), 58-61.
- Moreau, N. M., Martin, L. J., Toquet, C. S., Laboisse, C. L., Nguyen, P. G., Siliart, B. S., Dumon, H. J., & Champ, M. M. (2003). Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *British Journal of Nutrition*, 90(1), 75-85.
- Morikawa, K. & Nishinari, K. (2000a). Effects of concentration dependence of retrogradation behaviour of dispersions for native and chemically modified potato starch. *Food Hydrocolloids*, 14(14), 395-401.
- Morikawa, K., & Nishinari, K. (2000b). Rheological and DSC studies of gelatinization of chemically modified starch heated at various temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 43(3), 241-247.
- Mun, S. H., & Shin, M. (2006). Mild hydrolysis of resistant starch from maize. *Food Chemistry*, 96(1), 115-121.
- Murphy, M. M., Douglass, J. S., & Birkett, A. (2008). Resistant starch intakes in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(1), 67-78.
- Nasrin, T. A. A., & Anal, A. K. (2015). Enhanced oxidative stability of fish oil by encapsulating in culled banana resistant starch-soy protein isolate based microcapsules in functional bakery products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5120-5128.
- Nikuni, Z. (1978). Studies on starch granules. *Starch-Stärke*, 30(4), 105-111.
- Nugent, A. P. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1), 27-54.
- O'Brien, S., & Wang, Y. J. (2008). Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 597-607.

- Ogunsona, E., Ojogbo, E., & Mekonnen, T. (2018). Advanced material applications of starch and its derivatives. *European Polymer Journal*, 108, 570-581.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.
- Olayinka, O. O., Adebowale, K. O., & Olu-Owolabi, B. I. (2008). Effect of heat-moisture treatment on physicochemical properties of white sorghum starch. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 225-230.
- Onyango, C., Bley, T., Jacob, A., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Influence of incubation temperature and time on resistant starch type III formation from autoclaved and acid-hydrolysed cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 66(4), 494-499.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1974). In: *Food Additives Series No. 5*, pp. 368-371.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1972). In: *Food Additives Series No. 1*, pp. 46-48.
- Osundahunsi, O. F., & Mueller, R. (2011). Dynamic rheological and physicochemical properties of annealed starches from two cultivars of cassava. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1916-1921.
- Ozturk, S., Koxsel, H., Kahraman, K., & Ng, P. K. (2009). Effect of debranching and heat treatments on formation and functional properties of resistant starch from high-amylose corn starches. *European Food Research and Technology*, 229(1), 115-125.
- Park, E. Y., Baik, B. K., & Lim, S. T. (2009). Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and *in vitro* digestibility of waxy maize starch gel. *Journal of Cereal Science*, 50(1), 43-48.
- Park, E. Y., Ma, J. G., Kim, J., Lee, D. H., Kim, S. Y., Kwon, D. J., & Kim, J. Y. (2018). Effect of dual modification of HMT and crosslinking on physicochemical properties and digestibility of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, 75, 33-40.
- Perera, A., Meda, V., & Tyler, R. T. (2010). Resistant starch: A review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*, 43(8), 1959-1974.

- Perera, C., Hoover, R., & Martin, A. M. (1997). The effect of hydroxypropylation on the structure and physicochemical properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. *Food Research International*, 30(3-4), 235-247.
- Pérez S., Baldwin P. M., & Gallant D. J. (2009). Structural features of starch granules I. In *Chemistry and Tecnology*. Third Edition. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 149-188.
- Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke*, 62(8), 389-420.
- Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Overview of meat products as functional foods. In *Technological strategies for functional meat products development*. Kerala, India: Transworld Research Network, pp. 1-17.
- Pfannemüller, B. (1987). Influence of chain length of short monodisperse amyloses on the formation of A-and B-type X-ray diffraction patterns. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9(2), 105-108.
- Pizarro, M., Sánchez, T., Ceballos, H., Morante, N., & Dufour, D. L. (2016). Diversificación de los almidones de yuca y sus posibles usos en la industria alimentaria. *Revista Politécnica*, 37(2), 1-6.
- Pukkahuta, C., Shobsngob, S., & Varavinit, S. (2007). Effect of osmotic pressure on starch: New method of physical modification of starch. *Starch-Stärke*, 59(2), 78-90.
- Pukkahuta, C., Suwannawa, B., Shobsngob, S., & Varavinit, S. (2008). Comparative study of pasting and thermal transition characteristics of osmotic pressure and heat-moisture treated corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 527-536.
- Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 238-247.
- Raatz, S. K., Idso, L., Johnson, L. A. K., Jackson, M. I., & Combs, G. F. (2016). Resistant starch analysis of commonly consumed potatoes: Content varies by cooking method and service temperature but not by variety. *Food Chemistry*, 208, 297-300.
- Raigond, P., Ezekiel, R., & Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968-1978.
- Raigond, P., Dutt, S., & Singh, B. (2019). Resistant Starch in Food. *Bioactive Molecules in Food*, 815-846.

- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2008). Thermal behavior of resistant starches RS 2, RS 3, and RS 4. *Journal of Food Science*, 73(5), C356-C366.
- Reader, A. (1997). Response of resistant starch in a food bar vs two commercially available bars in persons with type II diabetes mellitus. *Diabetes*, 46, 254A.
- Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S., & Morell, M. (2006). High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3546-3551.
- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Ling, S., Li, Z., Rahman, S., & Morell, M. (2010). Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1469-1482.
- Richardson, S., Nilsson, G. S., Bergquist, K., Gorton, L., & Mischnick, P. (2000). Characterization of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch. *Carbohydrate Research*, 328 (3), 365-373.
- Rickard, J. E., Asaoka, M., & Blanshard, J. M. V. (1991). The physico-chemical properties of cassava starch. *Review. Tropical Science*, 31(2), 189-207.
- Ring, S. G., Gee, J. M., Whittam, M., Orford, P., & Johnson I. 1988. Resistant Starch: its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility *in vitro*. *Food Chemistry*, 28(2), 97-109.
- Roberts, J., Jones, G. P., Rutishauser, I. H., Birkett, A., & Gibbons, C. (2004). Resistant starch in the Australian diet. *Nutrition & Dietetics: The Journal of the Dietitians Association of Australia*, 61(2), 98-105.
- Robin. J. P., Mercier, C., Charbonniere, R., & Guibot, A. (1974). Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, 51, 389-406.
- Sae-kang, V., & Supphantharika, M. (2006). Influence of pH and xanthan gum addition on freeze-thaw stability of tapioca starch pastes. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 371-380.
- Safo-Kantanka, O., & Owusu-Nipah, J. (1992). Cassava varietal screening for cooking quality: Relationship between dry matter, starch content, mealiness and certain microscopic observations of the raw and cooked tuber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(1), 99-104.

- Sajilata, M. G., & Singhal, R. S. (2005). Specialty starches for snack foods. *Carbohydrate Polymers*, 59(2), 131-151.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant starch—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 1-17.
- Salmeron, J., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Wing, A. L., & Willett, W. C. (1997). Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Jama*, 277(6), 472-477.
- Sánchez, T., Salcedo, E., Ceballos, H., Dufour, D., Mafla, G., Morante, N., Calle, F., Pérez, J. C., Debouck, D., G., Jaramillo, G., & Moreno, I. X. (2009). Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Starch-Stärke*, 61(1), 12-19.
- Sang, Y., Prakash, O., & Seib, P. A. (2007). Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance ( $^{31}\text{P}$  NMR) spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 67(2), 201-212.
- Sang, Y., Seib, P. A., Herrera, A. I., Prakash, O., & Shi, Y. C. (2010). Effects of alkaline treatment on the structure of phosphorylated wheat starch and its digestibility. *Food Chemistry*, 118(2), 323-327.
- Santisopasri, V., Kurotjanawong, K., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Siroth, K., & Oates, C. G. (2001). Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. *Industrial Crops and Products*, 13(2), 115-129.
- Sarko, A., & Wu, H. C. (1978). The crystal structures of A, B and C-polymorphs of amylose and starch. *Starch-Stärke*, 30(3), 73-78.
- Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1981). Isolation, partial characterization and modification of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starch. *Journal of Food Science*, 46(2), 617-621.
- Schoch, T. J., & Maywald, E. C. (1956). Microscopic examination of modified starches. *Analytical Chemistry*, 28(3), 382-387.
- Schwall, G. P., Safford, R., Westcott, R. J., Jeffcoat, R., Tayal, A., Shi, Y. C., Gidley, M. J., & Jobling, S. A. (2000). Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology*, 18(5), 551-554.
- Sechi, N. D. S. M., & Marques, P. T. (2017). Preparation and physicochemical, structural and morphological characterization of phosphorylated starch. *Materials Research*, 20(2), 174-180.

- Seneviratne, H. D., & Biliaderis, C. G. (1991). Action of  $\alpha$ -amylases on amylose-lipid complex superstructures. *Journal of Cereal Science*, 13(2), 129-143.
- Serrano, P. O., & Franco, C. M. L. (2005). Modificação hidrotérmica (“annealing”) e hidrólise enzimática do amido de mandioca. *Brazilian Journal of Food and Technology*, 8(3), 220-232.
- Sharma, A., Yadav, B. S., & Ritika. (2008). Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, 24(2), 193-234.
- Shi, J., Sun, Z., & Shi, Y. C. (2019). Improved *in vitro* assay of resistant starch in cross-linked phosphorylated starch. *Carbohydrate Polymers*, 210, 210-214.
- Shi, M., Gu, F., Wu, J., Yu, S., & Gao, Q. (2013). Preparation, physicochemical properties, and *in vitro* digestibility of cross-linked resistant starch from pea starch. *Starch-Stärke*, 65(11-12), 947-953.
- Shiftan, D., Ravenelle, F., Mateescu, M. A., & Marchessault, R. H. (2000). Change in the V/B polymorph ratio and T1 relaxation of epichlorohydrin crosslinked high amylose starch excipient. *Starch-Stärke*, 52(6-7), 186-195.
- Shimada, T., Otani, M., Hamada, T., & Kim, S. H. (2006). Increase of amylose content of sweetpotato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (IbSBEII). *Plant Biotechnology*, 23(1), 85-90.
- Shin, M., Song, J., & Seib, P. A. (2004). *In vitro* digestibility of cross-linked starches-RS4. *Starch-Stärke*, 56(10), 478-483.
- Shukri, R., Zhu, L., Seib, P. A., Maningat, C., & Shi, Y. C. (2015). Direct *in-vitro* assay of resistant starch in phosphorylated cross-linked starch. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 1-9.
- Sievert, D., & Pomeranz, Y. (1989). Enzyme-resistant starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical, and microscopic methods. *Cereal Chemistry*, 66(4), 342-347.
- Simsek, S., Ovando-Martínez, M., Whitney, K., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Effect of acetylation, oxidation and annealing on physicochemical properties of bean starch. *Food Chemistry*, 134(4), 1796-1803.
- Singh, A., Geveke, D. J., & Yadav, M. P. (2017). Improvement of rheological, thermal and functional properties of tapioca starch by using gum arabic. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 155-162.

- Singh, H., Chang, Y. H., Lin, J. H., Singh, N., & Singh, N. (2011). Influence of heat-moisture treatment and annealing on functional properties of sorghum starch. *Food Research International*, 44(9), 2949-2954.
- Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A Review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1-22.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81(2), 219-231.
- Singh, S., Raina, C. S., Bawa, A. S., & Saxena, D. C. (2005). Effect of heat-moisture treatment and acid modification on rheological, textural, and differential scanning calorimetry characteristics of sweetpotato starch. *Journal of Food Science*, 70(6), e373-e378.
- Singh, U., Kherdekar, M. S., & Jambunathan, R. (1982). Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. The levels of amylase inhibitors, levels of oligosaccharides and *in vitro* starch digestibility. *Journal of Food Science*, 47(2), 510-512.
- Sitohy, M. Z., El-Saadany, S. S., Labib, S. M., & Ramadan, M. F. (2000). Physicochemical properties of different types of starch phosphate monoesters. *Starch-Stärke*, 52(4), 101-105.
- Sitohy, M. Z., & Ramadan, M. F. (2001). Granular properties of different starch phosphate monoesters. *Starch-Stärke*, 53(1), 27-34.
- Sivak, M. N., & Preiss, J. (1998). Physicochemical structure of the starch granule. In *Advances in Food and Nutrition Research. Starch: Basic Science to Biotechnology. Volume 41*. Academic Press. San Diego, California, USA, pp.13-32.
- Sivoli, L., Perez, E., & Rodriguez, P. (2012). Structural analysis of the cassava native starch (*Manihot esculenta* C.) using morphometric, chemical, thermal and rheological techniques. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 29(2), 293-313.
- Slattery, C. J., Kavakli, I. H., & Okita, T. W. (2000). Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science*, 5(7), 291-298.
- Song, J. Y., Park, J. H., & Shin, M. (2011). The effects of annealing and acid hydrolysis on resistant starch level and the properties of cross-linked RS4 rice starch. *Starch-Stärke*, 63(3), 147-153.

- Soni, P. L., Sharma, H. W., Dobhal, N. P., Bisen, S. S., Srivastava, H. C., & Gharia, M. M. (1985). The starches of *Dioscorea ballophylla* and *Amorphophallus campanulatus*. Comparison with tapioca starch. *Starch-Stärke*, 37(1), 6-9.
- Sriroth, K., Piyachomkwan, K., Wanlapatit, S., & Oates, C. G. (2000). Cassava starch technology: The Thai experience. *Starch-Stärke*, 52(12), 439-449.
- Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawong, K., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (1999). Cassava starch granule structure-function properties: Influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 38(2), 161-170.
- Steeneken, P. A. M., & Woortman, A. J. J. (2009). Superheated starch: A novel approach towards spreadable particle gels. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 394-405.
- Suárez Guerra, L. & Mederos Vega, V. R. (2011). Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Tendencias actuales. Cultivos Tropicales*, 32(3), 27-35.
- Svihus, B., Uhlen, A. K., & Harstad, O. M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3-4), 303-320.
- Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and properties of commercial native starches. *Starch-Stärke*, 37(1), 1-5.
- Szymońska, J., Krok, F., & Tomasik, P. (2000). Deep-freezing of potato starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), 307-314.
- Szymońska, J., Krok, F., Komorowska-Czepirska, E. & Bilas, K. (2003). Modification of granular potato starch by multiple deep-freezing and thawing. *Carbohydrate Polymers*, 52(1), 1-10.
- Takeo, K., Tokumura, A., & Kuge, T. (1973). Complexes of starch and its related materials with organic compounds. Part. X. X-ray diffraction of amylose-fatty acid complexes. *Starch-Stärke*, 25(11), 357-362.
- Tang, H., Mitsunaga, T., & Kawamura, Y. (2006). Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*, 63(4), 555-560.
- Tapsell, L. C. (2004). Diet and metabolic syndrome: where does resistant starch fit in?. *Journal of AOAC International*, 87(3), 756-760.
- Teerawanichpan, P., Lertpanyasampatha, M., Netrphan, S., Varavinit, S., Boonseng, O., & Narangajavana, J. (2008). Influence of cassava storage root development and environmental conditions on starch granule size distribution. *Starch-Stärke*, 60(12), 696-705.

- Tester, R. F., & Debon, S. J. (2000). Annealing of starch-a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(1), 1-12.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry*, 67(6), 551-557.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Thai Industrial Standard Institute: Standard for Tapioca Flour/Starch. UDC 664.272. Ministry of Industry, Bangkok 1978.
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch-value addition by modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 371-384.
- Tharanathan, R. N., & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14(12), 507-518.
- Thompson, D. B. (2000). Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 245-253.
- Vamadevan, V., & Bertoft, E. (2015). Structure-function relationships of starch components. *Starch-Stärke*, 67(1-2), 55-68.
- Van der Maarel, M. J., Capron, I., Euverink, G. J. W., Bos, H. T., Kaper, T., Binnema, D. J., & Steeneken, P. A. (2005). A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch. *Starch-Stärke*, 57(10), 465-472.
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Van Hung, P., & Morita, N. (2005a). Effects of granule sizes on physicochemical properties of cross-linked and acetylated wheat starches. *Starch-Stärke*, 57(9), 413-420.
- Van Hung, P., Huong, N. T. M., Phi, N. T. L., & Tien, N. N. T. (2017). Physicochemical characteristics and *in vitro* digestibility of potato and cassava starches under organic acid and heat-moisture treatments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 299-305.
- Van Hung, P., Lan Phi, N. T., & Vy Vy, T. T. (2012). Effect of debranching and storage condition on crystallinity and functional properties of cassava and potato starches. *Starch-Stärke*, 64(12), 964-971.

- Vandamme, T. F., Gbassi, G. K., Nguyen, T. L., & Li, X. (2016). Microencapsulation of probiotics. In *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, Second Edition. John Wiley & Sons. Chichester, West Sussex, UK, pp. 97-128.
- Varavinit, S., Paisanjit, W., Tukomane, T., & Pukkahuta, C. (2007). Effects of osmotic pressure on the crosslinking reaction of tapioca starch. *Starch-Stärke*, 59(6), 290-296.
- Veregin, R. P., Fyfe, C. A., Marchessault, R. H., & Taylor, M. G. (1986). Characterization of the crystalline A and B starch polymorphs and investigation of starch crystallization by high-resolution carbon-13 CP/MAS NMR. *Macromolecules*, 19(4), 1030-1034.
- Vernaza, M. G., Gularte, M. A., & Chang, Y. K. (2011). Addition of green banana flour to instant noodles: rheological and technological properties. *Ciencia e Agrotecnologia*, 35(6), 1157-1165.
- Wang, W. J., Powell, A. D., & Oates, C. G. (1997). Effect of annealing on the hydrolysis of sago starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 33(2-3), 195-202.
- Wang, Y. J., & Wang, L. (2002). Characterization of acetylated waxy maize starches prepared under catalysis by different alkali and alkaline-earth hydroxides. *Starch-Stärke*, 54 (1), 25-30.
- Watcharatewinkul Y., Puttanlek C., Rungsardthong V., & Uttapap D. (2009). Pasting properties of a heat-moisture treated canna starch in relation to its structural characteristics. *Carbohydrate Polymer*, 75(3), 505-11.
- Wei, C., Xu, B., Qin, F., Yu, H., Chen, C., Meng, X., Zhu, L., Wang, Y., Gu, M., & Liu, Q. (2010). C-type starch from high-amylose rice resistant starch granules modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7383-7388.
- Wepner, B., Berghofer, E., Miesenberger, E., & Tiefenbacher, K. (1999). Citrate starch: Application as resistant starch in different food systems. *Starch-Stärke*, 51(10), 354-361.
- Westenbrink, S., Brunt, K., & van der Kamp, J. W. (2013). Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry*, 140(3), 562-567.
- Wongsagonsup, R., Pujchakarn, T., Jitrakbumrung, S., Chaiwat, W., Fuongfuchat, A., Varavinit, S., Dangtipef, S., & Suphantharika, M. (2014). Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product. *Carbohydrate Polymers*, 101, 656-665.

- Woo, K. S., & Seib, P. A. (1997). Cross-linking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*, 33(4), 263-271.
- Woo, K. S., & Seib, P. A. (2002). Cross-linked resistant starch: Preparation and properties. *Cereal Chemistry*, 79(6), 819-825.
- Woo, K. S., Maningat, C. C., & Seib, P. A. (2009). Increasing dietary fiber in foods: The case for phosphorylated cross-linked resistant starch, a highly concentrated form of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 54(5), 217-223.
- Wurzburg, O. B. (1960). Preparation of Starch Derivatives. US Patent No. 2,935,510.
- Wurzburg, O. B. (1986a). Cross-linked starches. In *Modified Starches: Properties and Uses*. CRC Press. Florida, USA, pp. 41-53.
- Wurzburg, O. B. (1986b). Introduction. In *Modified Starches: Properties and Uses*. CRC Press. Florida, USA, pp. 4.
- Yoneya, T., Ishibashi, K., Hironaka, K., & Yamamoto, K. (2003). Influence of cross-linked potato starch treated with POCl<sub>3</sub> on DSC, rheological properties and granule size. *Carbohydrate Polymers*, 53(4), 447-457.
- Yoo, S. H., & Jane, J. L. (2002). Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydrate Polymers*, 49(3), 307-314.
- Yue, P., & Waring, S. (1998). Resistant starch in food applications. *Cereal Foods World*, 43(9), 690-695.
- Zanini A., Hoyos R. E., Luque A. V., & Di Feo L. del V. (2018). Epidemiología del mosaico común de la mandioca en Formosa. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). <https://inta.gob.ar> . Fecha de consulta: 17 de enero de 2019.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 209-234.
- Zeng, F., Ma, F., Kong, F., Gao, Q., & Yu, S. (2015). Physicochemical properties and digestibility of hydrothermally treated waxy rice starch. *Food Chemistry*, 172, 92-98.
- Zhu, F. (2015). Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 122, 456-480.

- Zia-ud-Din, Xiong, H., & Fei, P. (2017). Physical and chemical modification of starches: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2691-2705.
- Zielinski, G., DeVries, J. W., Craig, S. A., & Bridges, A. R. (2013). Dietary fiber methods in *Codex Alimentarius*: Current status and ongoing discussions. *Cereal Foods World*, 58(3), 148-152.

---

# ANEXOS

---

## Anexo 1

a) Análisis de Cribado para el diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por el tratamiento de ANN.

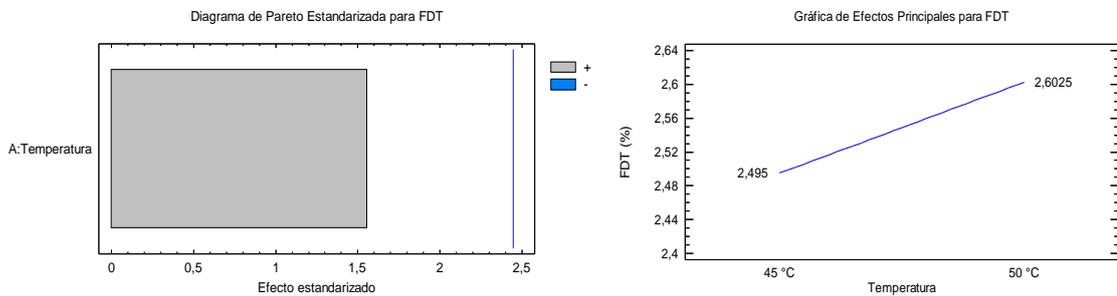
### Análisis de Varianza para FDT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0231125	1	0,0231125	2,42	0,1950
B:Tiempo	0,0190125	1	0,0190125	1,99	0,2313
AB	0,0001125	1	0,0001125	0,01	0,9188
Error puro	0,03825	4	0,0095625		
Total (corr.)	0,0804875	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

### Análisis de Varianza para FDT

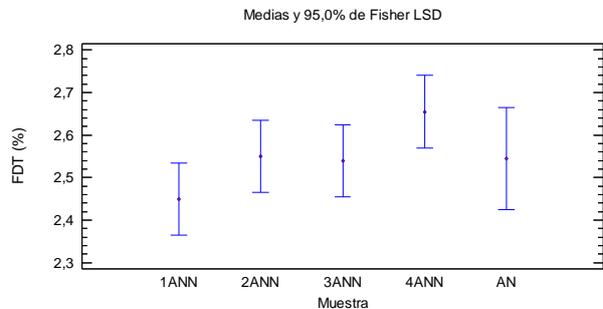
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0231125	1	0,0231125	2,42	0,1710
Error puro	0,057375	6	0,0095625		
Total (corr.)	0,0804875	7			



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el tratamiento de ANN.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1ANN	4	2,45	X
3ANN	4	2,54	XX
AN	2	2,545	XX
2ANN	4	2,55	XX
4ANN	4	2,655	X



## Anexo 2

a) Análisis de Cribado para el primer diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por el HMT (primer diseño).

### Análisis de Varianza para FDT

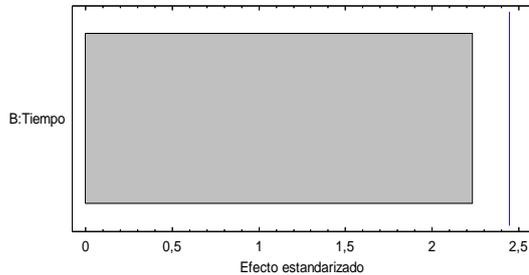
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0066125	1	0,0066125	1,16	0,3425
B:Tiempo	0,0253125	1	0,0253125	4,43	0,1031
AB	0,0010125	1	0,0010125	0,18	0,6954
Error puro	0,02285	4	0,0057125		
Total (corr.)	0,0557875	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

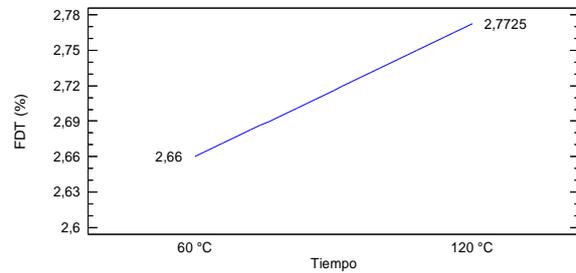
**Análisis de Varianza para FDT**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B:Tiempo	0,0253125	1	0,0253125	4,98	0,0670
Error puro	0,030475	6	0,00507917		
Total (corr.)	0,0557875	7			

Diagrama de Pareto Estandarizada para FDT



Gráfica de Efectos Principales para FDT

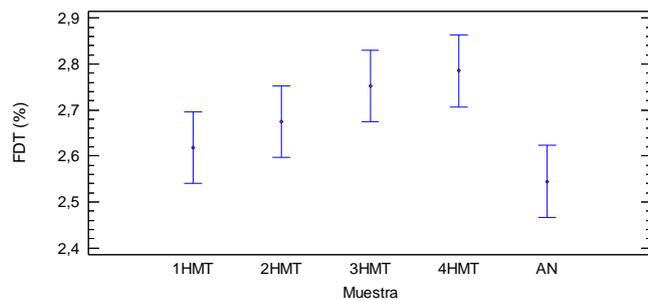


b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el HMT (primer diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
1HMT	4	2,6175	XX
2HMT	4	2,675	XXX
3HMT	4	2,7525	XXX
4HMT	4	2,785	X

Medias y 95.0% de Fisher LSD



c) Análisis de Cribado para el segundo diseño factorial 2<sup>2</sup> del contenido de FDT del almidón modificado por el HMT (segundo diseño factorial).

**Análisis de Varianza para FDT**

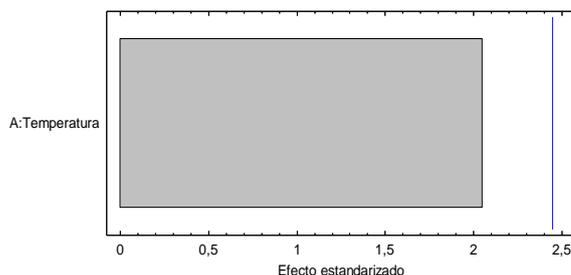
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0098	1	0,0098	4,13	0,1120
B:Tiempo	0,00405	1	0,00405	1,71	0,2616
AB	0,00045	1	0,00045	0,19	0,6858
Error puro	0,0095	4	0,002375		
Total (corr.)	0,0238	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

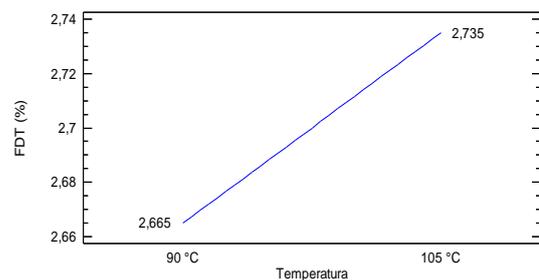
**Análisis de Varianza para FDT**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0098	1	0,0098	4,20	0,0863
Error puro	0,014	6	0,00233333		
Total (corr.)	0,0238	7			

Diagrama de Pareto Estandarizada para FDT



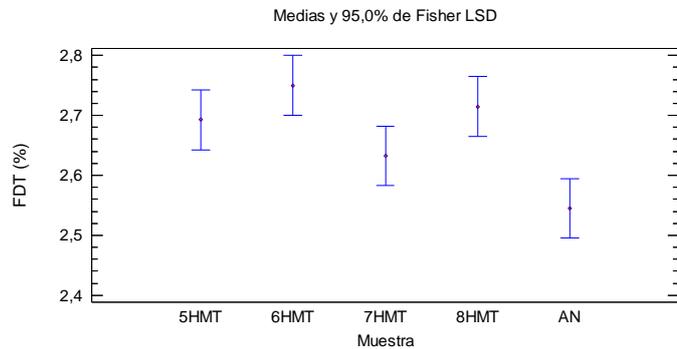
Gráfica de Efectos Principales para FDT



d) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el HMT (segundo diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

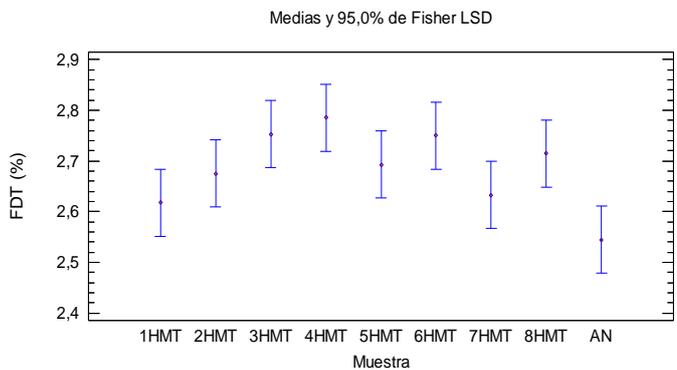
Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
7HMT	4	2,6325	XX
5HMT	4	2,6925	XX
8HMT	4	2,715	XX
6HMT	4	2,75	X



e) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el HMT (primer y segundo diseño factorial)

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
1HMT	4	2,6175	XX
7HMT	4	2,6325	XXX
2HMT	4	2,675	XXXXX
5HMT	4	2,6925	XXX
8HMT	4	2,715	XXX
6HMT	4	2,75	XX
3HMT	4	2,7525	XX
4HMT	4	2,785	X



### Anexo 3

a) Análisis de Cribado para el primer diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por el OPT.

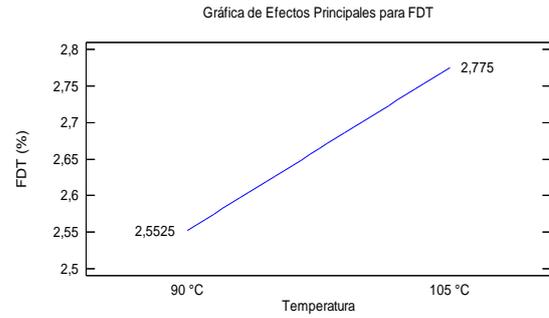
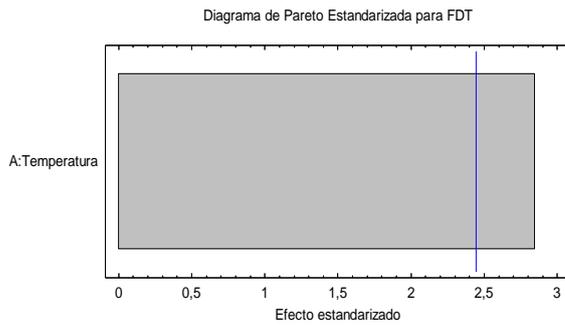
#### Análisis de Varianza para FDT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,0990125	1	0,0990125	11,56	0,0273
B: Tiempo	0,0091125	1	0,0091125	1,06	0,3605
AB	0,0300125	1	0,0300125	3,51	0,1345
Error puro	0,03425	4	0,0085625		
Total (corr.)	0,172387	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

#### Análisis de Varianza para FDT

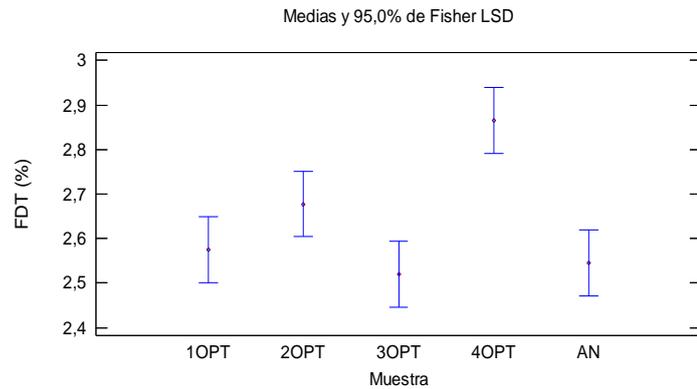
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,0990125	1	0,0990125	8,10	0,0294
Error puro	0,073375	6	0,0122292		
Total (corr.)	0,172387	7			



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el OPT (primer diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3OPT	4	2,52	X
AN	4	2,545	XX
1OPT	4	2,575	XX
2OPT	4	2,6775	X
4OPT	4	2,865	X



c) Análisis de Cribado para el segundo diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por el OPT.

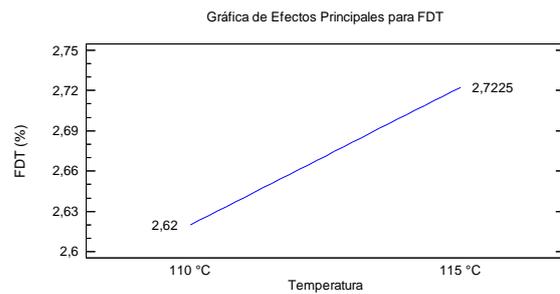
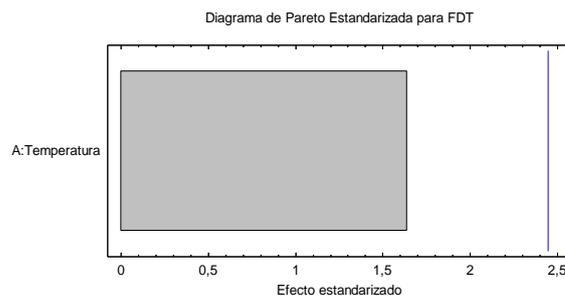
**Análisis de Varianza para FDT**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0210125	1	0,0210125	1,85	0,2455
B:Tiempo	0,0015125	1	0,0015125	0,13	0,7337
AB	0,0001125	1	0,0001125	0,01	0,9255
Error puro	0,04545	4	0,0113625		
Total (corr.)	0,0680875	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

**Análisis de Varianza para FDT**

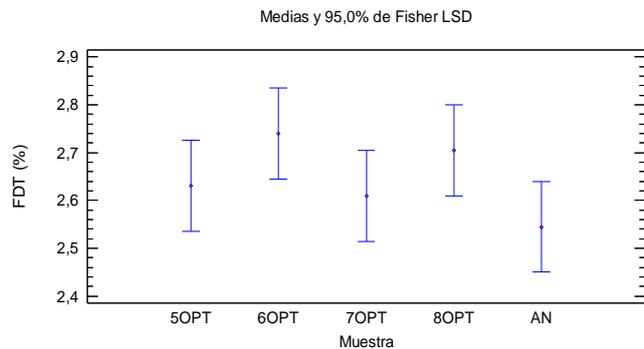
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,0210125	1	0,0210125	2,68	0,1528
Error puro	0,047075	6	0,00784583		
Total (corr.)	0,0680875	7			



d) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el OPT (segundo diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

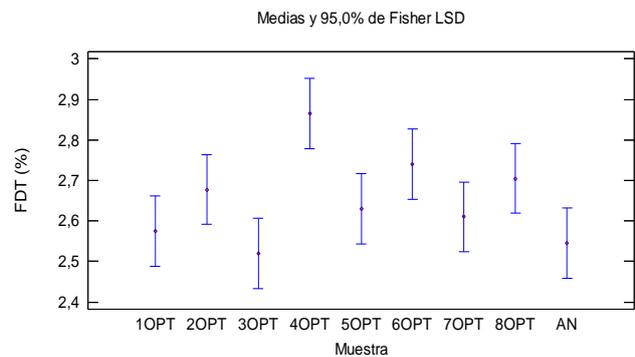
Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
7OPT	4	2,61	XX
5OPT	4	2,63	XX
8OPT	4	2,705	XX
6OPT	4	2,74	X



f) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por el OPT (primer y segundo diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3OPT	4	2,52	X
AN	4	2,545	XX
1OPT	4	2,575	XXX
7OPT	4	2,61	XXX
5OPT	4	2,63	XXX
2OPT	4	2,6775	XXX
8OPT	4	2,705	XXX
6OPT	4	2,74	XX
4OPT	4	2,865	X



#### Anexo 4

a) Análisis de Cribado para el primer diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por EC EPI.

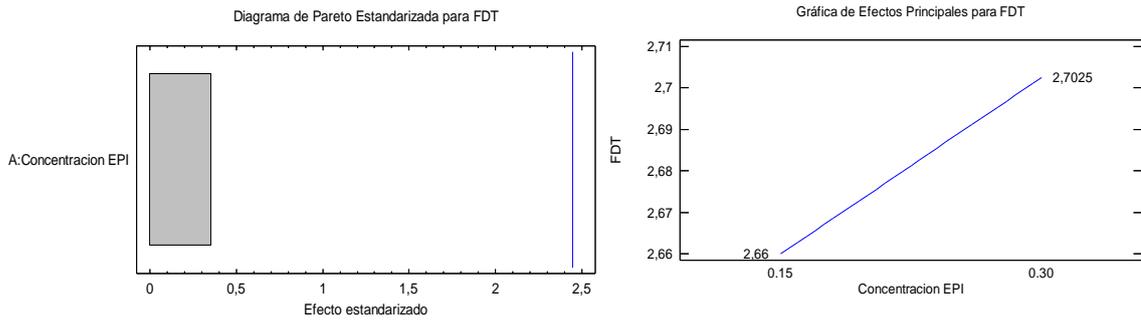
##### Análisis de Varianza para FDT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentracion EPI	0,0036125	1	0,0036125	0,09	0,7804
B:Tiempo	0,0091125	1	0,0091125	0,22	0,6604
AB	0,0003125	1	0,0003125	0,01	0,9343
Error puro	0,16245	4	0,0406125		
Total (corr.)	0,175488	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

##### Análisis de Varianza para FDT

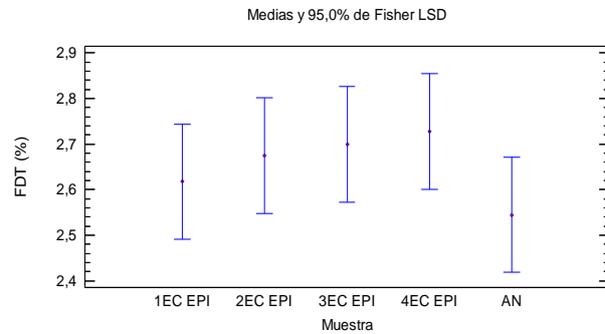
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentracion EPI	0,0036125	1	0,0036125	0,13	0,7347
Error puro	0,171875	6	0,0286458		
Total (corr.)	0,175488	7			



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por EC EPI (primer diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
1EC EPI	4	2,6175	X
2EC EPI	4	2,675	X
3EC EPI	4	2,7	X
4EC EPI	4	2,7275	X



c) Análisis de Cribado para el segundo diseño factorial  $2^2$  del contenido de FDT del almidón modificado por EC EPI.

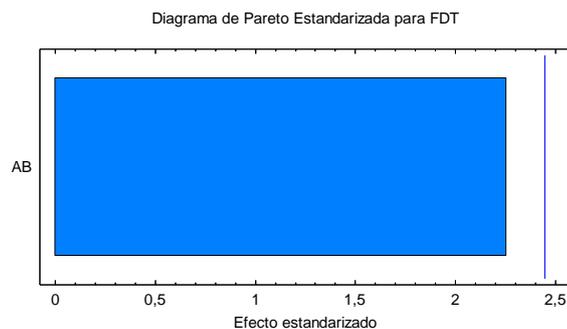
**Análisis de Varianza para FDT**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentracion EPI	0,0015125	1	0,0015125	2,47	0,1912
B:Tiempo	0,0003125	1	0,0003125	0,51	0,5145
AB	0,0036125	1	0,0036125	5,90	0,0721
Error puro	0,00245	4	0,0006125		
Total (corr.)	0,0078875	7			

Se eliminan los factores menos significativos para aumentar los grados de libertad y dejar los que tienen mayor influencia

**Análisis de Varianza para FDT**

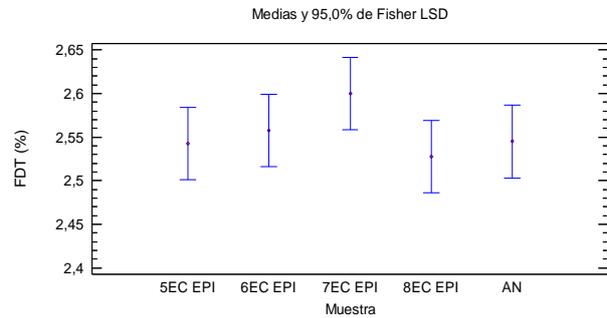
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
AB	0,0036125	1	0,0036125	5,07	0,0653
Error puro	0,004275	6	0,0007125		
Total (corr.)	0,0078875	7			



d) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por EC EPI (segundo diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

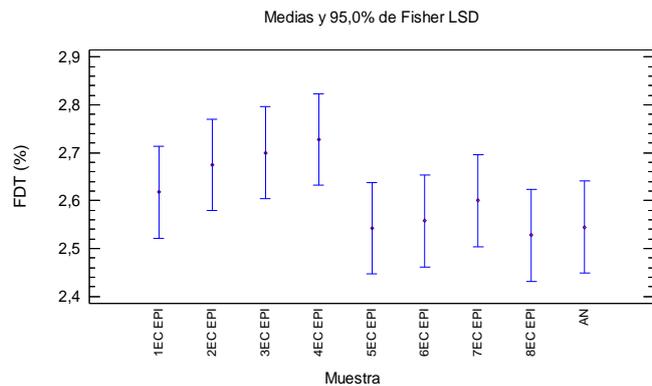
Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
8EC EPI	4	2,5275	X
5EC EPI	4	2,5425	X
AN	4	2,545	X
6EC EPI	4	2,5575	X
7EC EPI	4	2,6	X



e) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y modificado por EC EPI (primer y segundo diseño factorial).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
8EC EPI	4	2,5275	X
5EC EPI	4	2,5425	XX
AN	4	2,545	XX
6EC EPI	4	2,5575	XX
7EC EPI	4	2,6	XX
1EC EPI	4	2,6175	XX
2EC EPI	4	2,675	XX
3EC EPI	4	2,7	XX
4EC EPI	4	2,7275	X

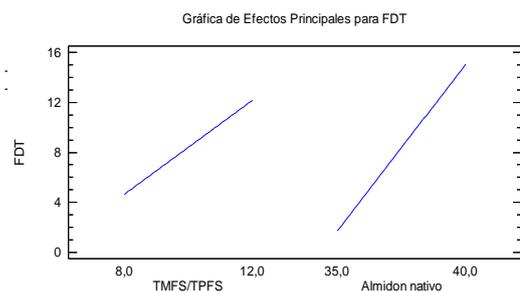
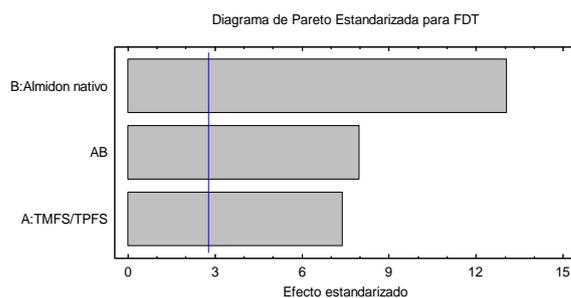


## Anexo 5

a) Tabla de ANOVA, diagrama de Pareto y gráfica de los efectos principales del diseño experimental completo  $2^2$  del tratamiento de modificación del almidón de mandioca por EC T/T.

Análisis de Varianza para FDT

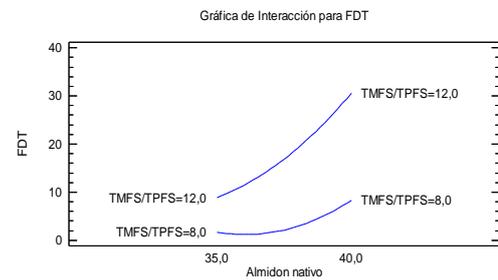
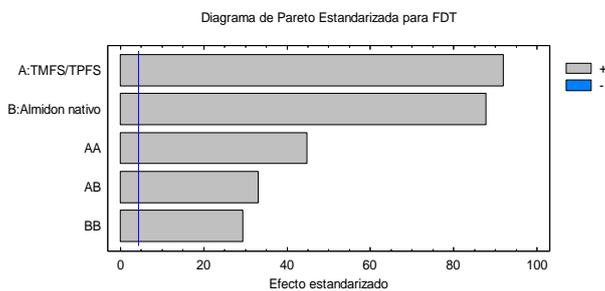
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:TMFS/TPFS	113,477	1	113,477	54,69	0,0018
B:Almidón nativo	354,179	1	354,179	170,69	0,0002
AB	132,113	1	132,113	63,67	0,0013
Error puro	8,29975	4	2,07494		
Total (corr.)	608,068	7			



b) Tabla de ANOVA, diagrama de Pareto, gráfica de interacción y pruebas de Múltiple Rangos de las experiencias del diseño central compuesto del tratamiento de modificación del almidón de mandioca por EC T/T.

Análisis de Varianza para FDT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:TMFS/TPFS	436,761	1	436,761	8464,36	0,0001
B:Almidón nativo	398,265	1	398,265	7718,32	0,0001
AA	103,714	1	103,714	2009,96	0,0005
AB	56,7009	1	56,7009	1098,85	0,0009
BB	44,5276	1	44,5276	862,94	0,0012
Falta de ajuste	213,155	3	71,0516	1376,97	0,0007
Error puro	0,1032	2	0,0516		
Total (corr.)	1223,5	10			



Pruebas de Múltiple Rangos para FDT % para las 11 experiencias del diseño central compuesto  
Método: 95,0 porcentaje LSD

Experiencia	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	1,45	X
1	2	2,045	XX
5	2	2,585	XX
7	2	4,235	XX
10	2	4,98	X
9	2	5,335	XX
11	2	5,4	XX
3	2	7,225	X
4	2	22,885	X
8	2	25,53	X
6	2	32,885	X

c) Pruebas de Múltiple Rangos de las experiencias 6, 12 y 13 del tratamiento de modificación del almidón de mandioca con EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

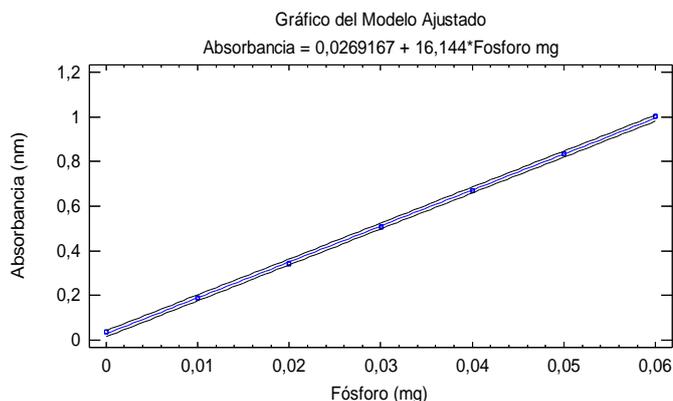
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
12 EC T/T	2	28,665	X
6 EC T/T	2	32,885	X
13 EC T/T	2	35,895	X

## Anexo 6

a) Curva estándar de fósforo y valores de absorbancia de los puntos de la curva.

Cantidad de Fósforo (mg)	Absorbancia (823 nm)
0	0,037
0	0,036
0	0,037
0,01	0,187
0,01	0,186
0,01	0,187
0,02	0,340
0,02	0,343
0,02	0,340
0,03	0,508
0,03	0,507
0,03	0,508
0,04	0,671
0,04	0,671
0,04	0,671
0,05	0,833
0,05	0,834
0,05	0,833
0,06	1,002
0,06	1,003
0,06	1,002

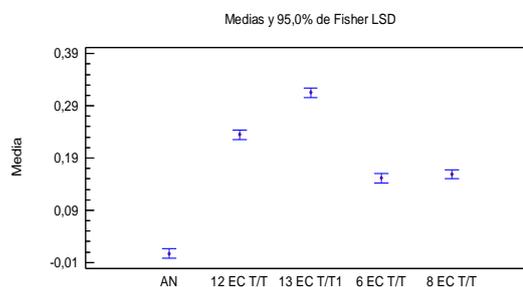
Coeficiente de Correlación = 0,999835  
 R-cuadrada = 99,9671 por ciento  
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9653 por ciento  
 Error estándar del est. = 0,00616233  
 Error absoluto medio = 0,00472109  
 Estadístico Durbin-Watson = 0,461593 (P=0,0000)  
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,67



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para fósforo (%) del AN y modificado por EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

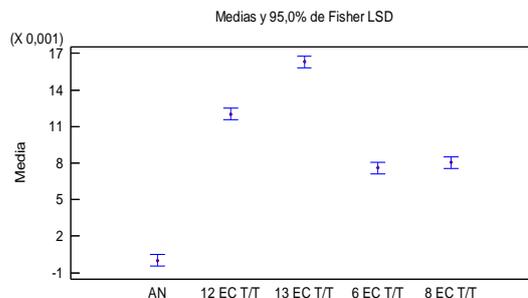
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	2	0,00705	X
6 EC T/T	2	0,1515	X
8 EC T/T	2	0,159	X
12 EC T/T	2	0,235	X
13 EC T/T	2	0,315	X



c) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para GS del AN y modificado por químico EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	2	0,0	X
6 EC T/T	2	0,0076	X
8 EC T/T	2	0,008047	X
12 EC T/T	2	0,012031	X
13 EC T/T	2	0,0163035	X

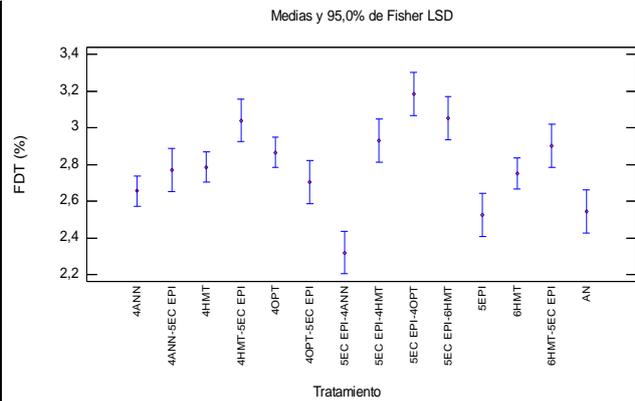


## Anexo 7

a) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por tratamientos hidrotérmicos, por EC con epíclorhidrina (5EPI) y por la combinación de tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5EC EPI-4ANN	2	2,32	X
5EPI	2	2,525	XX
AN	2	2,545	XXX
4ANN	4	2,655	XXX
4OPT-5EC EPI	2	2,705	XXXX
6HMT	4	2,75	XX
4ANN-5EC EPI	2	2,77	XXX
4HMT	4	2,785	XX
4OPT	4	2,865	XX
6HMT-5EC EPI	2	2,9	XX
5EC EPI-4HMT	2	2,93	XX
4HMT-5EC EPI	2	3,04	XX
5EC EPI-6HMT	2	3,05	XX
5EC EPI-4OPT	2	3,185	X

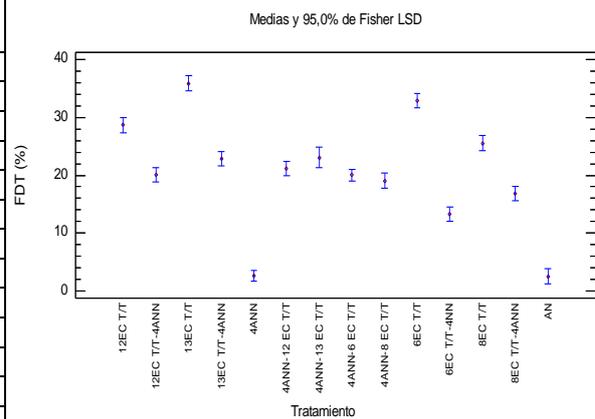


## Anexo 8

a) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por *annealing* (4ANN), por EC con trimetafosfato de sodio/ tripolifosfato de sodio (6, 8, 12 y 13EC T/T) y por la combinación de tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje LSD

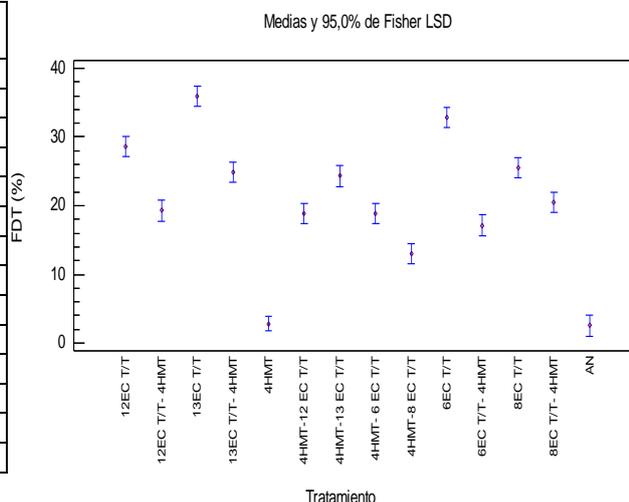
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
4ANN	4	2,655	X
6EC T/T-4ANN	2	13,28	X
8EC T/T-4ANN	2	16,84	X
4ANN-8 EC T/T	2	19,045	XX
4ANN-6 EC T/T	3	20,0067	X
12EC T/T-4ANN	2	20,075	XX
4ANN-12 EC T/T	2	21,165	XXX
13EC T/T-4ANN	2	22,835	X
4ANN-13 EC T/T	1	23,04	XXX
8EC T/T	2	25,53	X
12EC T/T	2	28,665	X
6EC T/T	2	32,885	X
13EC T/T	2	35,895	X



**b)** Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por *heat moisture treatment* (4HMT), por EC con trimetafosfato de sodio/ tripolifosfato de sodio (6, 8, 12 y 13EC T/T) y por la combinación de tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje LSD

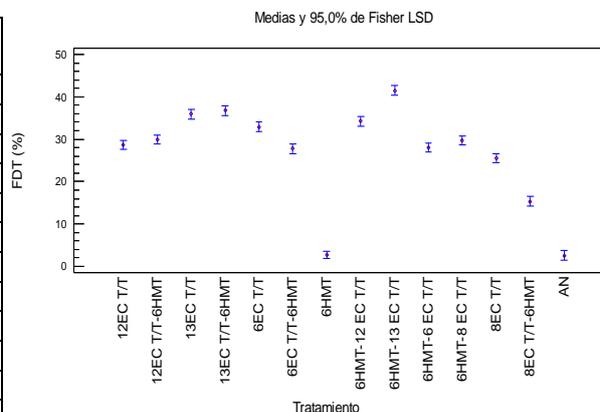
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
4HMT	4	2,785	X
4HMT-8 EC T/T	2	13,035	X
6EC T/T-4HMT	2	17,125	X
4HMT-12 EC T/T	2	18,83	XX
4HMT-6 EC T/T	2	18,845	XX
12EC T/T-4HMT	2	19,275	XX
8EC T/T-4HMT	2	20,475	X
4HMT-13 EC T/T	2	24,335	X
13EC T/T-4HMT	2	24,865	X
8EC T/T	2	25,53	X
12EC T/T	2	28,665	X
6EC T/T	2	32,885	X
13EC T/T	2	35,895	X



**c)** Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por *heat moisture treatment* (6HMT), por EC con trimetafosfato de sodio/ tripolifosfato de sodio (6, 8, 12 y 13EC T/T) y por la combinación de tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje LSD

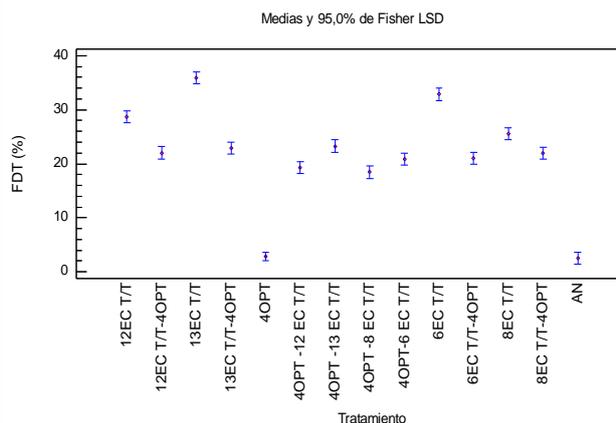
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
6HMT	4	2,75	X
8EC T/T-6HMT	2	15,375	X
8EC T/T	2	25,53	X
6EC T/T-6HMT	2	27,775	XX
6HMT-6 EC T/T	2	28,025	X
12EC T/T	2	28,665	X
6HMT-8 EC T/T	2	29,71	X
12EC T/T-6HMT	2	29,92	X
6EC T/T	2	32,885	X
6HMT-12 EC T/T	2	34,27	XX
13EC T/T	2	35,895	XX
13EC T/T-6HMT	2	36,785	X
6HMT-13 EC T/T	2	41,44	X



**d)** Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por *osmotic pressure treatment* (4OPT), por EC con trimetafosfato de sodio/ tripolifosfato de sodio (6, 8, 12 y 13EC T/T) y por la combinación de tratamientos.

Método: 95,0 porcentaje LSD

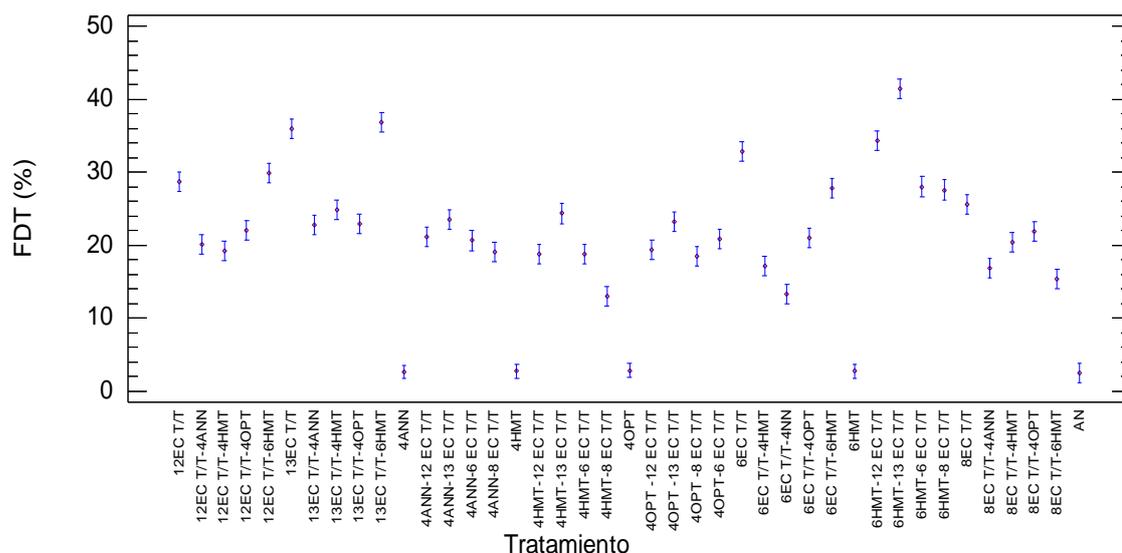
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	4	2,545	X
4OPT	4	2,865	X
4OPT -8 EC T/T	2	18,445	X
4OPT -12 EC T/T	2	19,34	XX
4OPT-6 EC T/T	2	20,815	XX
6EC T/T-4OPT	2	21,065	XXX
8EC T/T-4OPT	2	21,95	XX
12EC T/T-4OPT	2	22,035	XX
13EC T/T-4OPT	2	22,935	XX
4OPT -13 EC T/T	2	23,275	X
8EC T/T	2	25,53	X
12EC T/T	2	28,665	X
6EC T/T	2	32,885	X
13EC T/T	2	35,895	X



e) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para FDT (%) del AN y de los almidones modificados por 4ANN, 4HMT, 6HMT y 4OPT, por 6, 8, 12 y 13EC T/T y por la combinación de tratamientos hidrotérmicos-EC T/T y viceversa.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN	2	2,545	X
4ANN	4	2,655	X
6HMT	4	2,75	X
4HMT	4	2,785	X
4OPT	4	2,865	X
4HMT-8 EC T/T	2	13,035	X
6EC T/T-4NN	2	13,28	X
8EC T/T-6HMT	2	15,375	XX
8EC T/T-4ANN	2	16,84	XX
6EC T/T-4HMT	2	17,125	XX
4OPT -8 EC T/T	2	18,445	XX
4HMT-12 EC T/T	2	18,83	XXX
4HMT-6 EC T/T	2	18,845	XXX
4ANN-8 EC T/T	2	19,045	XXX
12EC T/T-4HMT	2	19,275	XXXX
4OPT -12 EC T/T	2	19,34	XXXX
12EC T/T-4ANN	2	20,075	XXXX
8EC T/T-4HMT	2	20,475	XXXXX
4ANN-6 EC T/T	2	20,64	XXXXXX
4OPT-6 EC T/T	2	20,815	XXXXXX
6EC T/T-4OPT	2	21,065	XXXXXXX
4ANN-12 EC T/T	2	21,165	XXXXXXX
8EC T/T-4OPT	2	21,95	XXXXXXX
12EC T/T-4OPT	2	22,035	XXXXXX
13EC T/T-4ANN	2	22,835	XXXXXX
13EC T/T-4OPT	2	22,935	XXXXXXX
4OPT -13 EC T/T	2	23,275	XXXXXX
4ANN-13 EC T/T	2	23,51	XXXX
4HMT-13 EC T/T	2	24,335	XXX
13EC T/T-4HMT	2	24,865	XX
8EC T/T	2	25,53	XX
6HMT-8 EC T/T	2	27,585	XX
6EC T/T-6HMT	2	27,775	XX
6HMT-6 EC T/T	2	28,025	XX
12EC T/T	2	28,665	X
12EC T/T-6HMT	2	29,92	X
6EC T/T	2	32,885	X
6HMT-12 EC T/T	2	34,27	XX
13EC T/T	2	35,895	X
13EC T/T-6HMT	2	36,785	X
6HMT-13 EC T/T	2	41,44	X

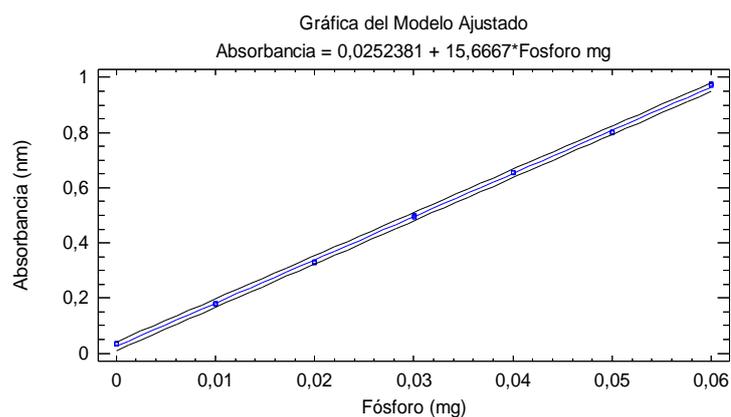


## Anexo 9

a) Curva estándar de fósforo y valores de absorbancia de los puntos de la curva del contenido de fósforo de los almidones modificados por la combinación de tratamientos anexo 56HMT-8EC TT, 6HMT-12EC TT, 6HMT-13EC TT.

Cantidad de Fósforo (mg)	Absorbancia (823 nm)
0	0,034
0	0,034
0	0,035
0,01	0,178
0,01	0,180
0,01	0,179
0,02	0,328
0,02	0,330
0,02	0,329
0,03	0,494
0,03	0,496
0,03	0,499
0,04	0,653
0,04	0,653
0,04	0,653
0,05	0,800
0,05	0,802
0,05	0,802
0,06	0,972
0,06	0,976
0,06	0,973

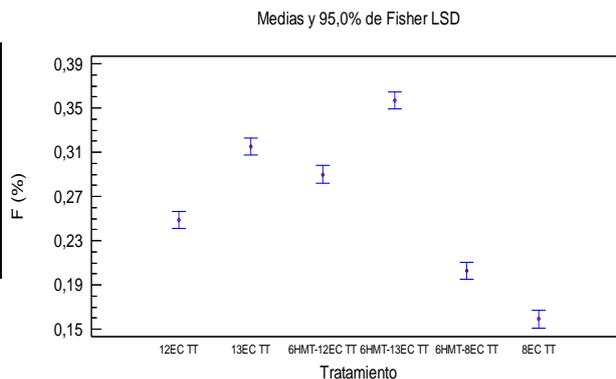
Coefficiente de correlación = 0,999769  
R-Cuadrada = 99,9537 por ciento  
R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,9513 por ciento  
Error estándar del est. = 0,00708771  
Error medio absoluto = 0,00575057  
Estadístico Durbin-Watson = 0,67716 (P=0,0001)  
Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,589643



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el contenido de fósforo del almidón de mandioca modificado por los tratamientos 8, 12 y 13 EC T/T y los tratamientos combinados 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T, 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

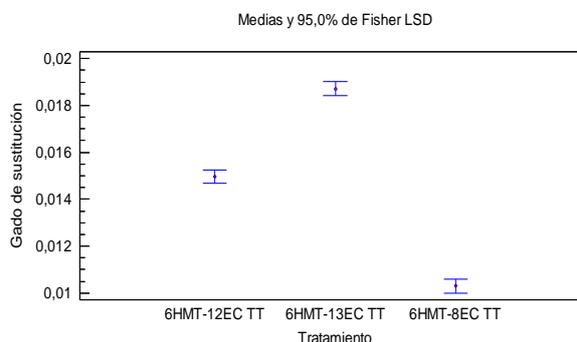
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
8EC T/T	2	0,159	X
6HMT-8EC T/T	2	0,2025	X
12EC T/T	2	0,2485	X
6HMT-12EC T/T	2	0,29	X
13EC T/T	2	0,315	X
6HMT-13EC T/T	2	0,36	X



c) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el GS del almidón de mandioca modificado por los tratamientos 6HMT-8EC T/T, 6HMT-12EC T/T, 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

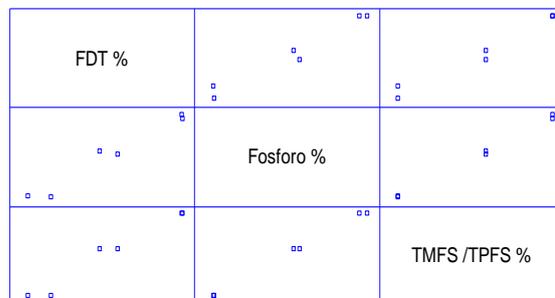
Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6HMT-8EC T/T	2	0,0103035	X
6HMT-12EC T/T	2	0,0149655	X
6HMT-13EC T/T	2	0,0187185	X



d) Correlación entre concentración de TMFS/TPFS, contenido de fósforo y FDT en los almidones modificados por la combinación 6HMT-EC T/T (6, 8 y 12 EC T/T).

#### Correlaciones

	FDT %	Fósforo %	TMFS/TPFS %
FDT %		0,9829 (6)	0,9847 (6)
		<b>0,0004</b>	<b>0,0003</b>
Fósforo %	0,9829 (6)		0,9988 (6)
	<b>0,0004</b>		<b>0,0000</b>
TMFS/TPFS %	0,9847 (6)	0,9988 (6)	
	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>	



### Anexo 10

a) Comparación de medias de FDT del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T medido por el método 985.29 de la AOAC con y sin modificaciones.

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de FDT %:

- a) método modificado: 41,44 +/- 0,254124 [41,1859; 41,6941]
- b) método sin modificaciones: 39,4 +/- 11,4356 [27,9644; 50,8356]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

Sin suponer varianzas iguales: 2,04 +/- 13,4661 [-11,4261; 15,5061]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Sin suponer varianzas iguales: t = 2,26611 valor-P = **0,264373**

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

## Anexo 11

a) Comparación de medias del pH para el AN y el almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Intervalos de confianza del 95,0% para la media del pH de:

- a) 6HMT-13EC T/T: 7,545 +/- 0,444717 [7,10028; 7,98972]
- b) AN: 6,42 +/- 0,254124 [6,16588; 6,67412]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
Suponiendo varianzas iguales: 1,125 +/- 0,173445 [0,951555; 1,29845]

### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = 27,9078 valor-P = 0,00128148

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

b) Comparación de medias de la acidez titulable para el AN y el almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de acidez de:

- a) AN: 0,0033 +/- 0,00127062 [0,00202938; 0,00457062]
- b) 6HMT-13EC T/T: 0,00389 +/- 0,00508248 [-0,00119248; 0,00897248]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
Suponiendo varianzas iguales: -0,00059 +/- 0,00177403 [-0,00236403; 0,00118403]

### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: t = -1,43096 valor-P = 0,288743

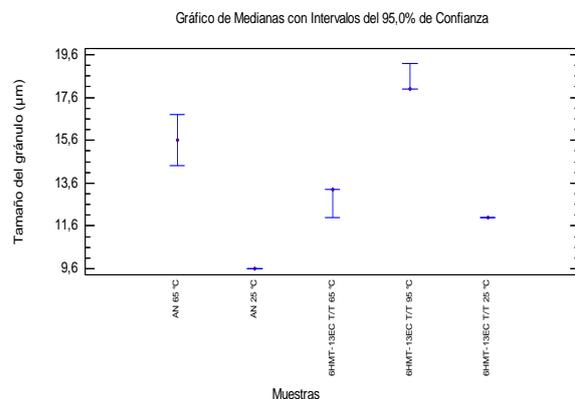
No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

## Anexo 12

a) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa del tamaño del gránulo de AN y modificado por la combinación de tratamientos 6HMT-13EC T/T a 25, 65 y 95 °C.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN 25 °C	500	10,056	X
6HMT-13EC T/T 25 °C	500	11,6978	X
6HMT-13EC T/T 65 °C	500	13,2164	X
6HMT-13EC T/T 95 °C	500	18,6194	X
AN 65°C	500	20,8182	X



b) Prueba de la mediana de Mood del gránulo de AN y modificado por la combinación de los tratamientos 6HMT-13EC T/T a 25, 65 y 95 °C.

### Prueba de la Mediana de Mood

Muestra	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95,0%	LC superior 95,0%
AN 65°C	500	194	306	15,6	14,4	16,8
AN 25 °C	500	390	110	9,6	9,6	9,6
6HMT-13EC T/T 65 °C	500	239	261	13,3	12,0	13,3
6HMT-13EC T/T 95 °C	500	115	385	18,0	18,0	19,2
6HMT-13EC T/T 25 °C	500	328	172	12,0	12,0	12,0

Total n = 2500

Gran mediana = 12,0

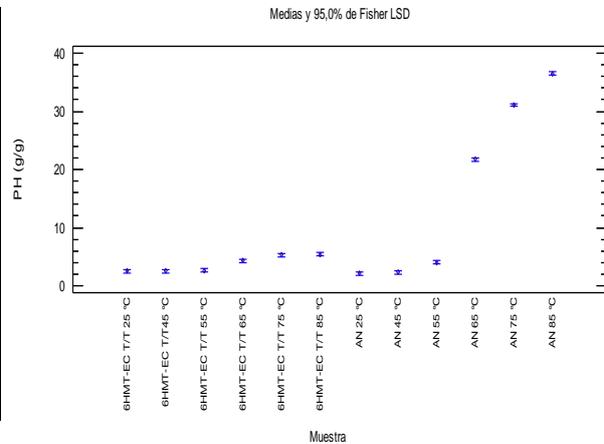
Estadístico = 376,98 Valor-P = 0,0

### Anexo 13

a) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el PH del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

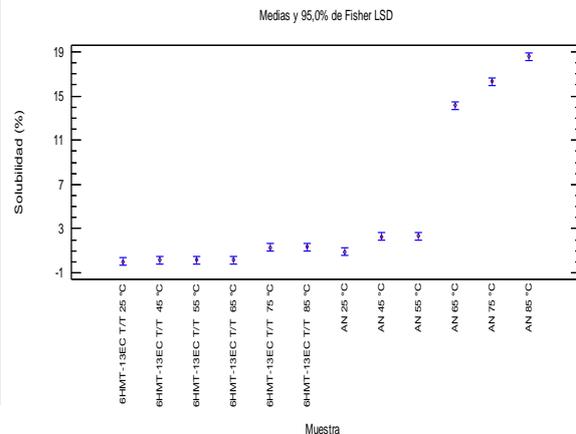
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN 25 °C	3	2,12333	X
AN 45 °C	3	2,28667	X
6HMT-13EC T/T 25 °C	3	2,47667	X
6HMT-13EC T/T 45 °C	3	2,51333	X
6HMT-13EC T/T 55 °C	3	2,58667	X
AN 55 °C	3	4,00667	X
6HMT-13EC T/T 65 °C	3	4,31	X
6HMT-13EC T/T 75 °C	3	5,26	X
6HMT-13EC T/T 85 °C	3	5,38333	X
AN 65 °C	3	21,7567	X
AN 75 °C	3	31,09	X
AN 85 °C	3	36,5267	X



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el % SOL del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

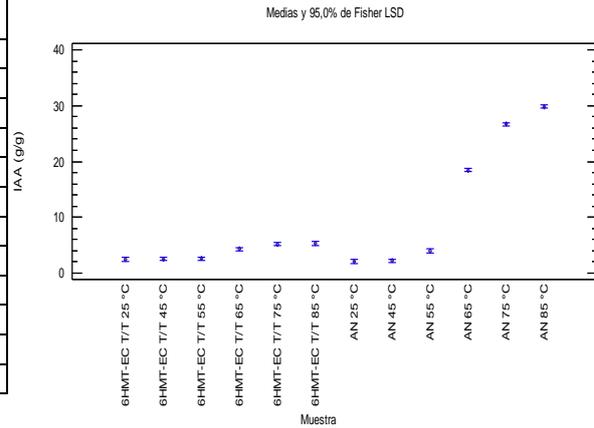
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6HMT-13EC T/T 25 °C	3	0,0	X
6HMT-13EC T/T 55 °C	3	0,133333	X
6HMT-13EC T/T 45 °C	3	0,133333	X
6HMT-13EC T/T 65 °C	3	0,133333	X
AN 25 °C	3	0,9	X
6HMT-13EC T/T 75 °C	3	1,3	X
6HMT-13EC T/T 85 °C	3	1,33333	X
AN 45 °C	3	2,26667	X
AN 55 °C	3	2,33333	X
AN 65 °C	3	14,1333	X
AN 75 °C	3	16,3333	X
AN 85 °C	3	18,6	X



c) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el IAA del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN 25 °C	3	2,07867	X
AN 45 °C	3	2,233	X
6HMT-13EC T/T 25 °C	3	2,47267	X
6HMT-13EC T/T 45 °C	3	2,512	X
6HMT-13EC T/T 55 °C	3	2,581	X
6HMT-13EC T/T 55 °C	3	3,96967	X
6HMT-13EC T/T 65 °C	3	4,302	X
6HMT-13EC T/T 75 °C	3	5,21067	X
6HMT-13EC T/T 85 °C	3	5,31333	X
AN 65 °C	3	18,4377	X
AN 75 °C	3	26,6963	X
AN 85 °C	3	29,846	X

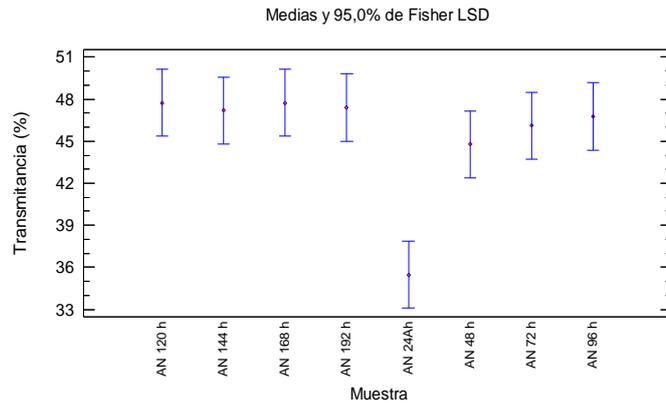


### Anexo 14

a) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el % T del AN almacenado a 25 °C.

Método: 95,0 porcentaje LSD

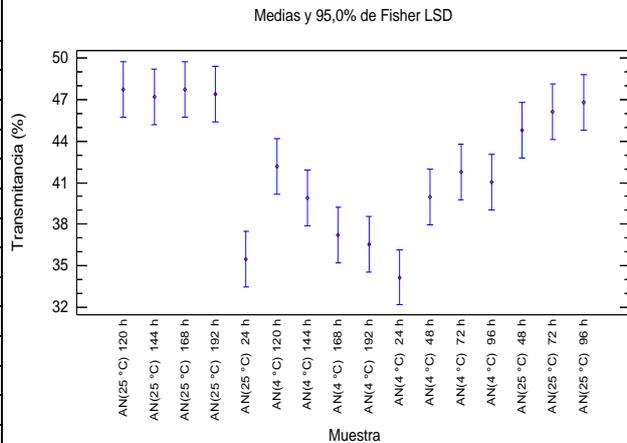
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN 24 h	3	35,4667	X
AN 48 h	3	44,7667	X
AN 72 h	3	46,1	X
AN 96 h	3	46,7667	X
AN 144 h	3	47,1933	X
AN 192 h	3	47,4	X
AN 168 h	3	47,7333	X
AN 120 h	3	47,7333	X



b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el % T del AN almacenado a 25 °C y a 4 °C.

Método: 95,0 porcentaje LSD

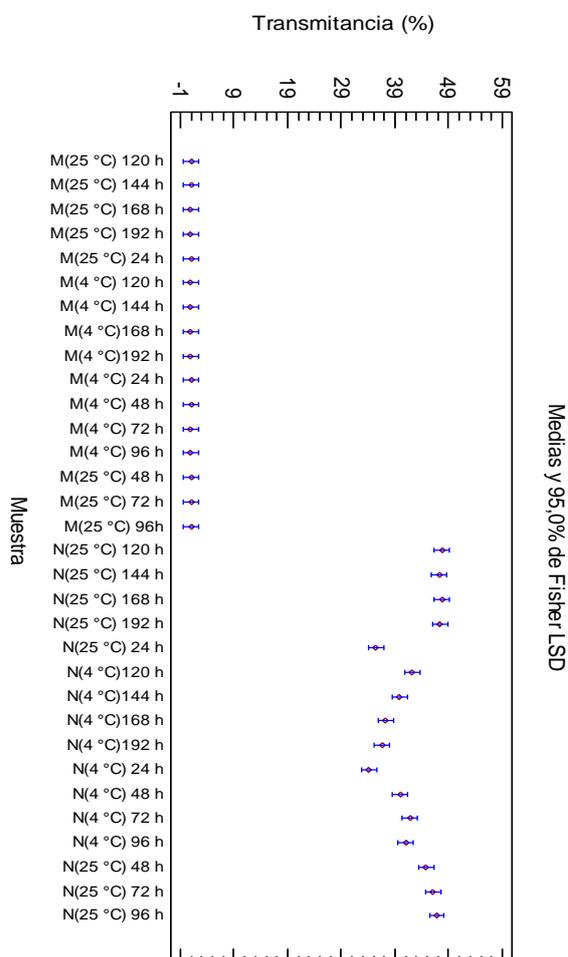
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AN(4 °C) 24 h	3	34,1667	X
AN(25 °C) 24 h	3	35,4667	X
AN(4 °C) 192 h	3	36,5333	XXX
AN(4 °C) 168 h	3	37,2333	XXX
AN(4 °C) 144 h	3	39,9	XXX
AN(4 °C) 48 h	3	39,9667	XXX
AN(4 °C) 96 h	3	41,0333	XXX
AN(4 °C) 72 h	3	41,7667	XX
AN(4 °C) 120 h	3	42,1667	XXX
AN(25 °C) 48 h	3	44,7667	XXX
AN(25 °C) 72 h	3	46,1	XX
AN(25 °C) 96 h	3	46,7667	X
AN(25 °C) 144 h	3	47,1933	X
AN(25 °C) 192 h	3	47,4	X
AN(25 °C) 168 h	3	47,7333	X
AN(25 °C) 120 h	3	47,7333	X



c) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa para el % T del AN y del almidón modificado por 6HMT-13EC T/T almacenado a 25 °C y a 4 °C.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M(4 °C) 192 h	3	0,9	X
M(4 °C) 144 h	3	0,9	X
M(4 °C) 168 h	3	0,9	X
M(4 °C) 72 h	3	0,933333	X
M(4 °C) 120 h	3	0,933333	X
M 192 h	3	0,933333	X
M 168 h	3	0,933333	X
M(4 °C) 96 h	3	0,933333	X
M(25 °C) 48 h	3	0,966667	X
M(25 °C) 144 h	3	0,966667	X
M(25 °C) 120 h	3	0,966667	X
M(25 °C) 96 h	3	0,966667	X
M(25 °C) 72 h	3	0,966667	X
M(4 °C) 48 h	3	1,0	X
M(25 °C) 24 h	3	1,0	X
M(4 °C) 24 h	3	1,0	X
N(4 °C) 24 h	3	34,1667	X
N(25 °C) 24 h	3	35,4667	XX
N(4 °C) 192 h	3	36,5333	XX
N(4 °C) 168 h	3	37,2333	XX
N(4 °C) 144 h	3	39,9	XX
N(4 °C) 48 h	3	39,9667	XX
N(4 °C) 96 h	3	41,0333	X
N(4 °C) 72 h	3	41,7667	X
N(4 °C) 120 h	3	42,1667	XX
N(25 °C) 48 h	3	44,7667	XX
N(25 °C) 72 h	3	46,1	XX
N(25 °C) 96 h	3	46,7667	XX
N(25 °C) 144 h	3	47,1933	XX
N(25 °C) 192 h	3	47,4	XX
N(25 °C) 168 h	3	47,7333	X
N(25 °C) 120 h	3	47,7333	X



Referencias: N = almidón de mandioca nativo, M = 6HMT-13EC T/T

## Anexo 15

a) Comparación de las medias de las temperaturas de empastamiento del AN y del almidón modificado por 6HMT-EC T/T.

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de temperatura de empastamiento:

a) AN: 61,25 +/- 9,52965 [51,7203; 70,7797]

b) 6HMT-13EC T/T: 71,0 +/- 0,0 [71,0; 71,0]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias sin suponer varianzas iguales: -9,75 +/- 9,52965 [-19,2797; -0,220346]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

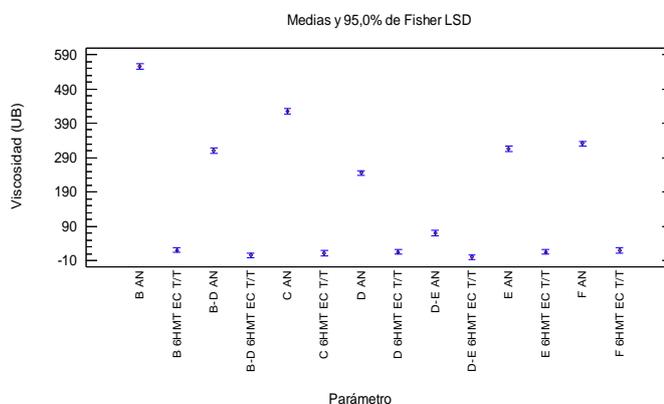
sin suponer varianzas iguales: t = -13,0 valor-P = 0,0488745

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

b) Pruebas de Múltiple Rangos y gráfica de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa de los parámetros de viscosidad (UB) del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
D-E M	2	0,0	X
B-D M	2	5,0	XX
C M	2	11,5	XXX
E M	2	15,0	XX
D M	2	15,0	XX
F M	2	19,5	X
B M	2	20,0	X
D-E AN	2	70,0	X
D AN	2	245,0	X
B-D AN	2	310,0	X
E AN	2	315,0	X
F AN	2	330,0	X
C AN	2	425,0	X
B AN	2	555,0	X



Referencia: M = 6HMT-13EC T/T

## Anexo 16

a) Pruebas de Múltiple Rangos de mínima diferencia significativa de Fisher de los parámetros de DSC del AN y del almidón de mandioca modificado por 6HMT-13EC T/T.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6HMT-13EC T/T $\Delta H$	2	4,14	X
AN $\Delta H$	2	5,485	X
6HMT-13EC T/T $T_f - T_i$	2	17,015	X
AN $T_f - T_i$	2	18,895	X
AN $T_i$	2	58,655	X
6HMT-13EC T/T $T_i$	2	64,55	X
AN $T_p$	2	65,575	X
6HMT-13EC T/T $T_p$	2	73,095	X
AN $T_f$	2	77,55	X
6HMT-13EC T/T $T_f$	2	81,565	X

## **PUBLICACIÓN EN REVISTA CIENTÍFICA**

***In vitro* digestibility and pasting properties of epichlorohydrin modified cassava starch.** Marta Aurelia Horianski, Juan Manuel Peralta, Luis Alberto Brumovsky. Nutrition and Food Science. Emerald. Vol. Nro. 46 (4). Pág. 517-528. ISSN: 0034-6659. doi: 10.1108/NFS-11-2015-0151. Recibido: 26/11/2015. Aceptado: 08/03/2016. Año de publicación 2016.

Eprint: <http://www.emeraldinsight.com/doi/pdfplus/10.1108/NFS-11-2015-0151>

URL: <http://www.emeraldinsight.com/doi/abs/10.1108/NFS-11-2015-0151>

## **PRESENTACIONES A JORNADAS Y CONGRESOS**

**Efecto de tratamientos físicos y químicos en la formación de almidón de mandioca resistente.** Horianski, Marta Aurelia; Brumovsky, Luis Alberto. IX Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Secretaria general de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina, 26, 27 y 28 de octubre de 2015. Resumen publicado en el libro digital de resúmenes. Pag. 306. ISBN: 978-950-766-112-9. Editor: EDUNAM-Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones. Año de edición: 2015.

URL: <http://www.fceqyn.unam.edu.ar/secip/index.php/27-investigacion/jornadas-de-investigacion/31-ix-jct-fceqyn-unam>

**Digestibilidad *in vitro* y propiedades de las pastas de almidón de mandioca modificado con epiclóridrina.** Horianski, Marta Aurelia; Peralta, Juan Manuel; Brumovsky, Tamara Nicole; Brumovsky, Luis Alberto. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos CYTAL. Alimentos Futuros: Equilibrio entre innovación, salud, conveniencia y sustentabilidad. 6° Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. 4° Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. 2° Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 03, 04 y 05 de noviembre de 2015. Trabajo completo y resumen publicado en actas de congreso en formato electrónico (CD). Editor: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Año de edición: 2015.

**Almidón resistente de mandioca estable a la ebullición por tratamiento con trimetafosfato de sodio/tripolifosfato de sodio.** Horianski, Marta Aurelia; Peralta, Juan Manuel; Brumovsky, Luis Alberto. Jornadas Científico Tecnológicas en el marco del 40 Aniversario de la Universidad Nacional de Misiones. Secretaria general de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina, 09, 10 y 11 de Mayo de 2018. Resumen publicado en el libro digital de resúmenes. Pag. 463. ISBN: 978-950-579-1495-9. Editor: EDUNAM-Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones. Año de edición: 2018.

URL: [http://www.fceqyn.unam.edu.ar/secip/files/jornadas/2018/Libro\\_resumenes\\_JCT\\_45ANIVERSARIO\\_UNaM\\_2018.pdf](http://www.fceqyn.unam.edu.ar/secip/files/jornadas/2018/Libro_resumenes_JCT_45ANIVERSARIO_UNaM_2018.pdf)