

# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN TUXTEPEC

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN DE PLÁTANO (*Musa paradisiaca*) Y MALANGA (*Colocasia esculenta*) MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARCIAL ASISTIDA CON ULTRASONIDO.

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

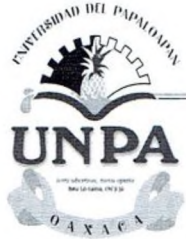
**PRESENTA:**

**IBQ. LUZ DEL CARMEN QUEVEDO ZÁRATE**

**DIRECTOR: DR. ANDRÉS AGUIRRE CRUZ**

**CO-DIRECTORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN NÚÑEZ SANTIAGO**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca  
Junio de 2019**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/053
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 12 de junio de 2019

**C. LUZ DEL CARMEN QUEVEDO ZÁRATE**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	Presidente
Dra. María del Carmen Núñez Santiago	CEPROBI-IPN	Vocal
Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Secretario
Dr. Julián Mario Peña Castro	UNPA	1er Suplente
Dr. Mario Valera Zaragoza	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado

C.c.p. Dr. Andrés Aguirre Cruz – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo



**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico  
Vo. Bo.

VICE-RECTORIA  
ACADEMICA



DEPARTAMENTO DE SERVICIOS  
ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC

CAMPUS TUXTEPEC  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/229
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 28 de junio de 2019

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la **C. Luz del Carmen Quevedo Zárate**, matrícula **14140016**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Obtención de nanopartículas de almidón de plátano (*Musa paradisiaca*) y malanga (*Colocasia esculenta*) mediante hidrólisis enzimática parcial asistida con ultrasonido**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Luz del Carmen Quevedo Zárate  
C.c.p. Archivo



18/05

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## AGRADECIMIENTOS

A ti **Dios** que has sido fiel a tus promesas y nunca me has abandonado.

A mis hijos **Samuel y Saraluz** por ser mi motor de vida y obligarme a no rendirme nunca.

A mi madre **Teófila** por todo su amor incondicional.

A **Eliud Domínguez** por siempre alentarme a ser feliz, y darme todo el apoyo necesario siempre.

A mis hermanos **José Alberto y Dariela** por su apoyo y sus consejos.

A mis abuelos **Úrsula y Félix** por ser siempre mi inspiración.

A todos mis **Tíos** por estar siempre en todo momento.

A los "**Primos Zarate**" por hacer la carga más ligera con todas sus ocurrencias y buenos momentos.

A mi amiga **Leticia Saldaña** por siempre estar ahí para apoyarme y regañarme en todo momento, por mostrarme el valor de la amistad.

A mi director de tesis **Andrés** por cada una de las enseñanzas que me dio siempre.

A mis I y V **Aurora, Erika, Jair, Fernando**, por acompañarme a llorar, a reír y obvio a tragar.

A la **UNPA** por todas las facilidades y el apoyo otorgado, en especial a mi jefecito Héctor López Arjona, por soportar mis locuras.

A mi comité revisor por la paciencia y el apoyo otorgado.

A mis compañeros de trabajo de **UGM** por apoyarme en los últimos desánimos.

## INDICE

1.INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Plátano.....	3
2.1.1 Producción del plátano macho .....	3
2.2 Malanga .....	5
2.2.1 Producción de la malanga.....	6
2.3 Almidón.....	6
2.3.1 Composición química del almidón.....	7
2.3.1.1 Amilosa.....	7
2.3.1.2 Amilopectina.....	8
2.4 Nanotecnología .....	8
2.5. Nanopartículas de almidón .....	10
2.5.1 Métodos para obtención de nanopartículas .....	10
2.5.1.1 Hidrólisis ácida .....	12
2.5.1.2 Microfluidización (MF) .....	12
2.5.1.3 Regeneración .....	13
2.5.1.4 Ultrasonificación.....	13
2.5.1.5 Hidrólisis enzimática .....	14
2.5.1.5.1 $\alpha$ -Amilasas .....	16
3.ANTECEDENTES .....	17
4.JUSTIFICACIÓN .....	20
5. HIPÓTESIS .....	21
6. OBJETIVOS .....	21
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	21
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
7.1. Materia prima .....	22
7.2 Aislamiento de almidón de plátano .....	22
7.3 Aislamiento de almidón de malanga .....	22
7.4 Análisis Químico Proximal .....	23
7.4.1 Determinación de humedad .....	23
7.4.2 Determinación de cenizas .....	23

7.4.3 Extracto etéreo o grasas .....	24
7.4.4 Nitrógeno total método kjedahl.....	25
7.5 Contenido de amilosa y amilopectina.....	25
7.6 Almidón total. ....	26
7.7 Tratamiento con ultrasonido del almidón.....	27
7.8 Hidrólisis enzimática. ....	27
7.9 Determinación de azúcares reductores.....	28
7.10 Estudios morfológicos de los almidones. ....	27
7.10.1 Determinación de la distribución de tamaño de partícula.....	28
7.10.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	29
7.10.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	29
7.11 Estudios moleculares de los almidones.....	29
7.11.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	29
7.11.2 Difracción de Rayos X (DRX) .....	30
7.12 Estudios térmicos de los almidones. ....	30
7.12.1 Calorimetría diferencial de barrido (CBD) .....	30
7.12.2 Análisis térmico gravimétrico (TGA).....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
8.1 Composición química proximal del almidón de plátano y malanga. ....	32
8.2 Cinética de hidrólisis de los almidones.....	33
8.3 Análisis de la distribución del tamaño de partícula (DTP) .....	37
8.4 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	39
8.4.1 Almidón de plátano y malanga nativos.....	39
8.4.2 Almidón plátano de hidrolizado y sonicado-hidrolizado.....	42
8.4.3 Almidón de malanga hidrolizado y sonicado hidrolizado .....	44
8.5 Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	46
8.5.1 Almidón de plátano y malanga sonicado hidrolizado.....	46
8.6 Espectrometría de dispersión de energía de Rayos X (EDS).....	48
8.7 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR).....	51
8.8 Difracción de Rayos X (DRX).....	55
8.9 Calorimetría diferencial de barrido (CBD).....	59
8.10 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	61
9. CONCLUSIONES.....	65
10. REFERENCIAS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	(a) Planta y (b) Fruto de plátano .....	3
<b>Figura 2.</b>	(a) Planta y (b) Cormo de malanga.....	6
<b>Figura 3.</b>	Componentes estructurales del almidón. (a) amilosa y (b) amilopectina (Xie <i>et al.</i> , 2013).....	8
<b>Figura 4.</b>	Métodos de obtención de nanopartículas, nanocristales y nanocoloides a partir de almidón (Fuente: Le Corre, 2014).....	11
<b>Figura 5</b>	Grado de hidrólisis (%) de almidón de papa, plátano y malanga.....	34
<b>Figura 6.</b>	a) Grado de hidrólisis (%) del almidón de plátano nativo (APN) y almidón de plátano sonicado (APS) y b) Grado de hidrólisis (%) del almidón de malanga nativo (AMN) y almidón de malanga sonicado (AMS).....	36
<b>Figura 7.</b>	Distribución de tamaño de partícula de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado-hidrolizado (APSH).....	38
<b>Figura 8.</b>	Distribución de tamaño de partícula de almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonicado-hidrolizado (AMSH).....	39
<b>Figura 9.</b>	Microscopia Electrónica de Barrido de almidón de plátano nativo (APN) y almidón de malanga nativo (AMN).....	41
<b>Figura 10.</b>	Microscopia Electrónica de Barrido de almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado-hidrolizado (APSH).....	43
<b>Figura 11.</b>	Microscopia Electrónica de Barrido de almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonicado-hidrolizado (AMSH).....	45
<b>Figura 12.</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión del almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSHH) (a, y b) y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH) (c y d) .....	47
<b>Figura 13.</b>	Análisis de EDS para el almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado e hidrolizado (APSH).....	49

<b>Figura 14.</b>	Análisis de EDS para el almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonicado e hidrolizado (AMSH).....	49
<b>Figura 15.</b>	Esquema del mecanismo de reacción, para ilustrar la interacción de los iones de Na y P con el almidón. Fuente: adaptado de (Beck <i>et al.</i> , 2011) .....	51
<b>Figura 16.</b>	Espectros de FTIR de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH), almidón de plátano sonicado-hidrolizado (APSH).....	53
<b>Figura 17.</b>	Espectros de FTIR de almidón de malanga nativo (APN), almidón de malanga hidrolizado (APH), almidón de malanga sonicado-hidrolizado (APSH).....	55
<b>Figura 18.</b>	Patrones de difracción de Rayos X de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSH).....	57
<b>Figura 19.</b>	Patrones de difracción de Rayos X de almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH) .....	59
<b>Figura 20.</b>	Curvas de pérdida de peso (%) obtenidas por análisis termogravimétrico del almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH), y almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSH).....	62
<b>Figura 21.</b>	Curvas de pérdida de peso (%) obtenidas por análisis termogravimétrico del almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH), y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH).....	64

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Producción de plátano macho en principales municipios del estado de Oaxaca.....	4
<b>Cuadro 2.</b> Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón.....	14
<b>Cuadro 3.</b> Composición química (%) del almidón de plátano y malanga.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Temperaturas (Ti, Tp y Tf) y entalpía de gelatinización ( $\Delta H$ ) del almidón de plátano nativo (APN) y malanga nativo (AMN) .....	60

## INDICE DE ABREVIATURAS

### Abreviaturas

AC	Almidón comercial
AM	Almidón de malanga
AMH	Almidón de malanga hidrolizado
AMN	Almidón de malanga nativo
AMS	Almidón de malanga sonicado
AMSH	Almidón de malanga sonicado hidrolizado
AP	Almidón de plátano
APH	Almidón de plátano hidrolizado
APS	Almidón de plátano sonicado
APSH	Almidón de plátano sonicado hidrolizado
b/s	Base seca
NAT	Nanopartículas de almidón de taro
nm	Nanómetro
np	Nanopartículas
npa	Nanopartículas de almidón

## RESUMEN

El almidón es un polisacárido que ha sido utilizado como materia prima para la obtención de nanopartículas debido a las propiedades y aplicaciones que tiene. Las nanopartículas de almidón (npa) han sido extraídas por distintos métodos (físicos, químicos, enzimáticos y combinaciones de estos) y tienen una gran gama de aplicaciones industriales, como por ejemplo sustitutos de grasas, estabilizadores, agentes emulsionantes o de refuerzo en materiales poliméricos de origen natural o sintético. El objetivo del presente trabajo de investigación fue obtener npa mediante hidrólisis enzimática parcial-asistida con ultrasonido a partir de dos fuentes botánicas diferentes de almidón (plátano y malanga). Primero se realizó la caracterización química proximal de los almidones nativos y grado de hidrólisis (GH). El material obtenido después del proceso de hidrólisis enzimático (npa) se analizó por distribución de tamaño de partícula (DTP) y se caracterizó por análisis morfológico, estructural y térmico.

La composición química proximal (CQP) del almidón de plátano (AP) y malanga (AM) fue la siguiente: lípidos (0.38 y 0.53%), proteínas (0.82 y 0.53%) y cenizas (0.21 y 0.47%), respectivamente. El AM presentó un contenido de amilosa y amilopectina de 13.93% y 86.07% respectivamente mientras que el AP presentó un contenido de amilosa y amilopectina de 23.75% y 76.25%, respectivamente. La cinética de hidrólisis de los almidones (plátano y malanga) permitió observar que el GH del AP es más rápido en comparación con el GH del AM. La DTP para las muestras de almidón de malanga hidrolizado (AMH) y sonicado e hidrolizado (AMSH) fue el más bajo (125 y 80.6 nm). Los gránulos de AM y AP presentaron morfologías características (elípticos y poligonales) de su fuente botánica. El proceso de hidrólisis enzimática y ultrasonido generó agregados y npa con formas ovoides o esféricas. El análisis de EDS reveló que los almidones sonicados e hidrolizados están compuesto por carbono, oxígeno, fósforo y sodio. Los espectros de FTIR del AMSH y AMH no presentaron cambios importantes en las señales. El patrón de difracción de Rayos X de las muestras (APSH y AMSH) cambió de forma importante en comparación con el patrón de difracción característico en estado nativo y mostró la presencia de nuevas señales asociadas con fósforo y sodio.

Estos componentes también influenciaron el comportamiento térmico de las muestras generadas después del proceso de sonicación e hidrólisis enzimática (AMPH y AMSH). En DSC no se observó transición de la temperatura de gelatinización y por TGA las muestras presentaron mejor estabilidad térmica en comparación con las muestras de APN y AMN.

## ABSTRAC

Starch is a polysaccharide that has been used as a raw material for obtaining nanoparticles due to the properties and applications it has. The nanoparticles of starch (npa) have been extracted by different methods (physical, chemical, enzymatic and combinations of these) and have a wide range of industrial applications, such as for example fat substitutes, stabilizers, emulsifying or reinforcing agents in polymeric materials of natural or synthetic origin. The objective of the present research work was to obtain npa by partial-assisted enzymatic hydrolysis with ultrasound from two different botanical sources of starch (banana and taro). First, the proximal chemical characterization of the native starches and degree of hydrolysis (GH) was carried out. The material obtained after the enzymatic hydrolysis process (npa) was analyzed by particle size distribution (DTP) and characterized by morphological, structural and thermal analysis

The proximal chemical composition (CQP) of plantain starch (AP) and taro (AM) was as follows: lipids (0.38 and 0.53%), proteins (0.82 and 0.53%) and ashes (0.21 and 0.47%), respectively. The AM showed an amylose and amylopectin content of 13.93% and 86.07% respectively, while the AP presented an amylose and amylopectin content of 23.75% and 76.25%, respectively. The hydrolysis kinetics of the starches (banana and taro) allowed to observe that the GH of the AP is faster in comparison with the GH of the AM. The DTP for the samples of hydrolyzed taro (AMH) and sonicate and hydrolyzed starch (AMSH) was the lowest (125 and 80.6 nm). The granules of AM and AP showed characteristic morphologies (elliptical and polygonal) of their botanical source. The process of enzymatic hydrolysis and ultrasound generated aggregates and npa with ovoid or spherical forms. The EDS analysis revealed that sonicated and hydrolyzed starches are composed of carbon, oxygen, phosphorus and sodium. The FTIR spectra of the AMSH and AMH did not show significant changes in the signals. The X-ray diffraction pattern of the samples (APSH and AMSH) changed significantly compared to the characteristic diffraction pattern in the native state and showed the presence of new signals associated with phosphorus and sodium.

These components also influenced the thermal behavior of the samples generated after the process of sonication and enzymatic hydrolysis (AMPH and AMSH). In DSC no

gelatinization temperature transition was observed and by TGA the samples showed better thermal stability compared to the APN and AMN samples.

# 1. INTRODUCCIÓN

La modificación del almidón por hidrólisis enzimática puede ser usada para las propiedades fisicoquímicas y proveer diferentes propiedades funcionales a un almidón, ampliando la posibilidad de uso y aplicación en la industria alimentaria y no-alimentaria como: sustitutos de grasas, agente aglutinante, elaboración de materiales biodegradables y estabilizante en emulsiones (Tesch *et al.*, 2002). Los almidones también son utilizados en aplicaciones biomédicas como vehículos para la liberación controlada de fármacos y otros agentes bioactivos (Kaur *et al.*, 2007). Otras aplicaciones potenciales son la obtención de nanopartículas a partir de almidón entre sus usos incluye el tratamiento de aguas residuales donde pueden reemplazar el costoso carbón activado como absorbentes.

Las propiedades y funcionalidad de las nanopartículas de almidón están estrechamente relacionadas con la composición química, estructura y tamaño de las mismas. Este último factor puede potencializar su funcionalidad, por lo cual, existe mucho interés en la obtención y desarrollo de métodos para la síntesis u obtención de nanopartículas de almidón (npa). Uno de los métodos más utilizados para la obtención de npa es la hidrólisis ácida. En esta ocurre una depolimerización de las regiones amorfas y cristalinas del gránulo de almidón (Angellier *et al.*, 2005; Haaj *et al.*, 2013). Sin embargo, los principales inconvenientes de este método son los reactivos químicos y duración.

En el sentido estricto las nanopartículas son aquellas con un tamaño menor a 100 nm. Sin embargo, algunos autores consideran que las npa pueden ser consideradas por debajo de 1  $\mu\text{m}$  (Gupta y Gupta, 2005; Ling *et al.*, 2012). La importancia de generar nanopartículas nace de la necesidad de nuevos materiales de mayor utilidad en investigaciones médicas, farmacéuticas y químicas. En este trabajo se propone un método combinado entre ultrasonido e hidrólisis enzimática para la obtención de npa a partir de dos diferentes fuentes botánicas plátano (APN) y malanga (AMN). Debido a la ubicación geográfica de Tuxtepec, Oaxaca, el plátano macho (*Musa paradisiaca L.*) y la malanga (*Colocasia Esculenta*) son cultivos abundantes de esta región, los cuales son fuentes alternativas para la obtención de almidón y por ende una fuente de obtención de npa. Las propiedades (hinchamiento, solubilidad, gelatinización, características reológicas, mecánica) de estas pueden cambiar sustancialmente dependiendo de la fuente botánica de almidón. Por lo cual, es importante evaluar y

caracterizar las npa desde el punto de vista morfológico, térmico y estructural. Esto es de gran utilidad para analizar las características y propiedades que estas puedan presentar y poder sugerir usos o aplicaciones específicas.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Plátano

El plátano es un término general que involucra un número de especies o híbridos del genero *Musa* de la familia *Musaceae* (Figura 1). Casi todos los cultivos de plátanos comestibles surgieron a partir de dos especies diploides, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, las cuales son nativas del sureste de Asia (Figura 1a). El plátano se considera una de las principales fuentes de energía para las personas y es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, trigo y maíz (Stover y Simmonds, 1987; Robinson, 1996). Es un fruto climatérico, lo que significa que una vez que se corta del árbol, inicia un proceso de maduración acelerado, ocasionando que cada año se pierda del 30 al 50% de la cosecha (Figura 1b) (FAOSTAT, 2001).



Figura 1. (a) Planta y (b) Fruto de plátano

#### 2.1.1 Producción del plátano macho

Los principales países productores de plátano en el 2010 fueron India (23,204,800 Ton), Filipinas (8,687,624 Ton), China (8,042,702 Ton) representando a su vez el 25.6%, 9.2% y el 9% del total de la producción mundial. El cultivo de plátano tiene una producción mundial de aproximadamente 90,643,750 toneladas. México ocupa el

octavo lugar con una producción de 2,159,280 toneladas con un 2.4% del total mundial (FAOSTAT, 2010). En México, el principal tipo de plátano producido es la variedad de enano gigante (1,322,556.79 Ton) el segundo es el plátano Macho (332,242.43 Ton) y el tercero es el plátano Tabasco (159,662.4 Ton). Los principales estados productores de plátano Macho en México son Chiapas (165,650 Ton), Veracruz (48,291 Ton), Tabasco (37,996 Ton) y Oaxaca (35,107 Ton) (SIAP-SAGARPA, 2012). En el Cuadro 1 se muestran los principales municipios productores de plátano macho en el estado de Oaxaca hasta el año 2012.

**Cuadro 1.** Producción de plátano macho en principales municipios del estado de Oaxaca.

<b>Municipios</b>	<b>Producción en Ton</b>
San Juan Bautista Tuxtepec	32,274.80
Santa María Tonameca	2,839.55
San Juan Bautista Valle Nacional	2,653.50
Santa María Huatulco	2,244.85
San José Chiltepec	2,232.15
Santiago Jamiltepec	1,500.02
Santa María Jacatepec	1,223.20

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2012.

Debido a su alto contenido de almidón (70% en base seca) el plátano es procesado para obtener este polisacárido y representa una alternativa tecnológica para el aprovechamiento de este recurso sub-utilizado (Waliszewski *et al.*, 2003; Manrique-Quevedo *et al.*, 2007) con el interés de ofrecer una posible fuente importante no convencional con aplicaciones en la industria de alimentos, así como también, su uso artesanal como frituras tipo chips. Estudios acerca del aislamiento del almidón de plátano a nivel laboratorio y su caracterización, han sugerido que pueden tener

características fisicoquímicas y funcionales (Faisant *et al.*, 1995; Bello Pérez *et al.*, 1998 y 1999). Flores-Gorosquera *et al.*, (2004) desarrollaron la metodología para el aislamiento de almidón de plátano a nivel planta piloto, reportando un rendimiento de 71% y 91% de pureza, posteriormente Vergara Méndez *et al.*, (2012) hicieron modificaciones a esta técnica de la cual obtuvieron almidón con una pureza de  $93.07 \pm 0.2$  %.

## 2.2 Malanga

La malanga (*Colocasia esculenta*) es una planta herbácea de raíz almidonosa que pertenece a la familia *Araceae* (Figura 2a). La parte comestible principalmente es un tallo corto llamado cormo (Figura 2b). Crece en áreas de clima tropical y subtropical, y es la principal fuente de alimento para más de 500 millones de personas en Asia, América Central, Sudamérica, Islas del Pacífico, Polinesias y África (Simsek y Nehir, 2012; Sanni *et al.*, 2003). La planta de malanga tiene un alto rendimiento de producción por hectárea comparado con otros tubérculos y con maíz. La malanga es una planta perenne, que puede alcanzar 2 m de altura. La planta no produce semillas, las hojas son grandes, con pecíolos largos y acanalados, tiene tallo corto principal subterráneo denominado cormo que es un rizoma tuberoso pivotante y grueso del cual brotan ramificaciones o raíces secundarias, laterales y engrosadas. Estos cormos son comestibles de forma ovoide redonda con una pulpa blanca almidonosa (Antonio-Estrada *et al.*, 2009).

La planta de malanga tiene diferentes aplicaciones, una de ellas es el uso de las hojas como forraje de animales. Los cormos son utilizados en la elaboración de productos alimenticios a nivel casero como ingrediente en diversos platillos y en la preparación de otros a nivel artesanal como: agua de horchata, encurtidos, rodajas fritas, entre otros. Para su consumo, la corteza del tubérculo debe ser retirada con cuidado ya que el tubérculo puede causar irritación en la piel, debida principalmente a su contenido de oxalatos, sin embargo, se ha reportado que el tratamiento térmico elimina dicha toxicidad (Sefa-Dedeh y Agyr-sacker, 2004).



**Figura 2.** (a) Planta y (b) Corno de malanga

La composición de la malanga varía dependiendo del género y especie, así como de las características de la zona de cultivo y del grado de madurez del tubérculo. En general, la composición química proximal es: humedad 67-72%, proteínas 2.5-3.9%, grasas 0.18-0.8%, fibra cruda 0.58-0.6% y carbohidratos 26-28% (INN, 1999). Dentro de estos últimos, el almidón es el principal componente.

### **2.2.1 Producción de malanga**

En México se cultiva en la parte sur, en los estados de Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Yucatán con una producción anual promedio de 8910 Ton hasta el 2004. En el estado de Oaxaca se reportó una producción de aproximadamente 6000 Ton en el 2005, siendo Tuxtepec y Valle Nacional los únicos municipios productores de este tubérculo en el estado (PROCAMPO. 2004)

### **2.3 Almidón.**

El almidón es el principal polisacárido de reserva sintetizado por las plantas superiores. Es un componente importante de un gran número de productos agrícolas como los cereales (maíz, trigo, arroz, cebada) en los cuales el contenido de almidón es del 30-80%, leguminosas (frijoles, chicharos, habas) con 25-50%, tubérculos (papa, yuca) con

60-90% y algunos frutos en estado fisiológico inmaduro (mango, plátano) los cuales pueden contener hasta un 70% en base seca de este carbohidrato (Bello Pérez *et al.*, 1999). Aunque en México se ha usado el maíz como la principal fuente de obtención del almidón, actualmente se ha optado por fuentes alternas no convencionales como el amaranto, la yuca, el sorgo, y frutos en estado inmaduro, en los cuales el almidón es un componente principal después del agua (Bello Pérez *et al.*, 1999).

El almidón se conforma de gránulos pequeños siendo su tamaño una de las características que más afecta a sus propiedades funcionales. Se ha reportado que los gránulos pequeños presentan mayor solubilidad y una alta capacidad de adsorción de agua (Singhal y Kulkarni, 1988). Los gránulos de almidón pueden presentar diversas formas: elípticos, esféricos o aplanados con un surco longitudinal, como es el caso del almidón obtenido del trigo, cebada y centeno (Donald, 2001; Smith, 2001). El tamaño de los gránulos de almidón va de 0.1 a 100  $\mu\text{m}$ . Los gránulos más grandes que se han reportado son del almidón de papa (15 a 100  $\mu\text{m}$ ) (Lineback, 1984) y los más pequeños los del amaranto, los cuales van de 0.8  $\mu\text{m}$  a 2.5  $\mu\text{m}$ ) (Paredes-López *et al.*, 1989).

### **2.3.1 Composición química del almidón.**

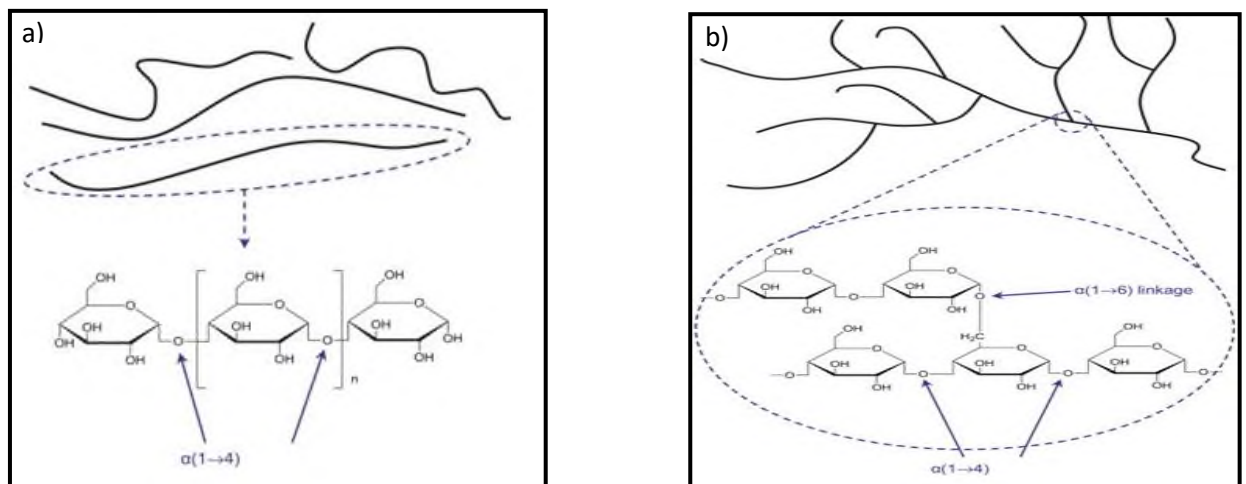
#### **2.3.1.1 Amilosa.**

La amilosa se define como una molécula lineal de (1 $\rightarrow$ 4) unidades vinculados de  $\alpha$ -D-glucopiranosil, sin embargo, algunas moléculas son poco ramificadas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (Banks y Greenwood, 1975). Por lo general, los diferentes tipos de almidones se encuentran compuestos por 1000 unidades de glucosa por cada molécula de amilosa y tienen forma de espiral. En uno de los extremos de la amilosa, la unidad de glucosa contiene el hidroxilo del carbono anomérico libre, por lo cual se llama extremo reductor (Aspinal, 1983). En el otro extremo no reductor, el hidroxilo del carbono anomérico forma parte del enlace glucosídico (Figura 3a). Debido a su linealidad, los polímeros de la amilosa tienden a agruparse muy estrechamente en forma paralela mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de los polímeros adyacentes reduciendo así su afinidad por el agua (Wurzburg, 1986). En soluciones diluidas, el tamaño de agregación de los polímeros se puede incrementar hasta el punto en que ocurre precipitación. En general, la estructura lineal de la amilosa favorece la formación de películas fuertes. La amilosa forma complejos insolubles con un gran número de

moléculas orgánicas como alcoholes alifáticos, ácidos monoglicéridos o ácidos grasos lineales; el complejo generalmente precipita cristalizándose lo que permite hacer la separación con la amilopectina. La amilosa tiene afinidad por el yodo y sus moléculas contienen segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. El color del complejo es característico de la amplitud de la cadena, azul para un grado de polimerización mayor de 40 y rojo, pardo o amarillo para un valor menor que este (Wurzburg, 1986).

### 2.3.1.2 Amilopectina.

La amilopectina es un polímero altamente ramificado y también se compone de monómeros  $\alpha$ -D glucopiranosil. Sus cadenas lineales también se unen por  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4). Alrededor del 5% de las unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo tienen otra cadena lineal vinculada  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) para formar el punto de ramificación como se muestra en la Figura 3b. La amilopectina contiene un mayor número de unidades de glucosa que la amilosa, (Delcour y Hosoney, 2010), con peso molecular de 106 a 108 Da que corresponde alrededor de 5000 a 50000 unidades D-glucosa. El modelo generalmente aceptado para la estructura de la amilopectina es el modelo de clúster (Copeland *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Componentes estructurales del almidón a) amilosa y b) amilopectina (Xie *et al.*, 2013).

## 2.4 Nanotecnología

El término *Nanotecnología* es relativamente moderno. Es la ciencia que estudia los procesos de manipulación de la materia a nivel atómico y molecular en busca de una mejora en la ciencia de los materiales. Su definición consiste básicamente en procesos

de deformación, consolidación y separación de materiales átomo a átomo y molécula a molécula (Taniguchi, 1974). El prefijo nano en la palabra nanotecnología significa una mil millonésima ( $1 \times 10^{-9}$ ) parte del metro (Poole y Owens, 2007). Las estructuras a esta escala han mostrado tener propiedades únicas y novedosas, consecuentemente las investigaciones en torno a esta nueva área se han incrementado en los últimos años.

En general, la biomedicina y la biotecnología son dos campos muy prometedores de potenciales aplicaciones. Los beneficios de la nanotecnología han sido reconocidos por muchas industrias, algunos productos comerciales ya han sido manufacturados, como la industria alimentaria, donde se han usado nanopartículas de almidón como soporte para la elaboración de biopelículas. La evolución de estas industrias es impulsada por el desarrollo de la investigación fundamental de nuevas estructuras, se han trabajado en conjunto con diversas áreas como la física, química, biología y la ciencia de materiales. Actualmente, se han optimizado y desarrollado diversos métodos para la obtención de nanopartículas, con una amplia variedad de sistemas para encapsular materiales funcionales, soluciones simples, emulsiones y biopolímeros en forma de nanodispersiones, nanocápsulas, asociación de coloides, nanoemulsiones, emulsiones múltiples, nanolaminados, nanopartículas, nanocompositos entre otros (Weiss *et al.*, 2006).

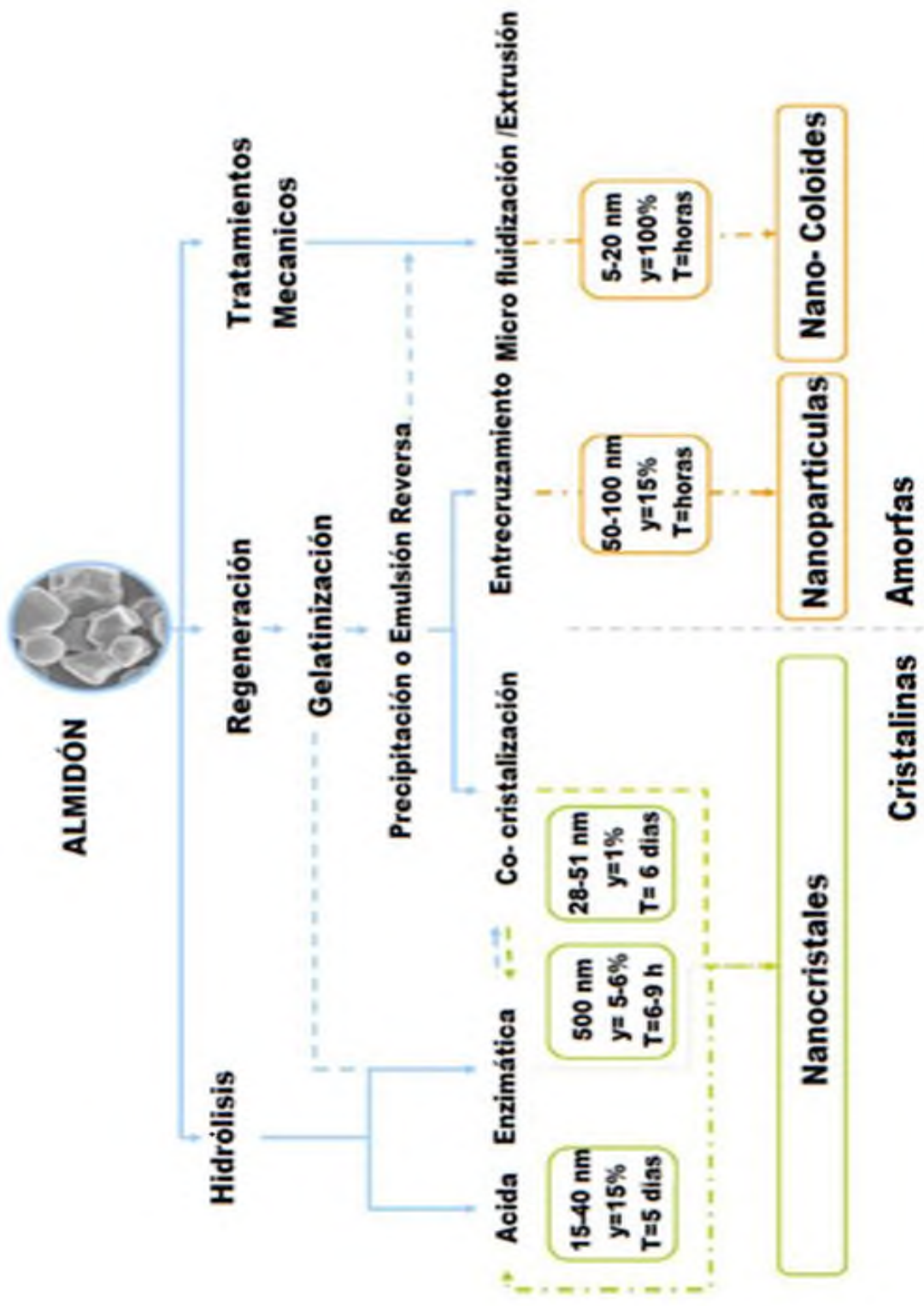
## **2.5. Nanopartículas de almidón**

El término nanopartícula (NP) se emplea para describir partículas con un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm. Estas pueden servir como unidades básicas de construcción para diversas aplicaciones en la nanotecnología. Sus propiedades físicas, químicas y biológicas cambian notablemente con respecto a los materiales macroscópicos. Estos efectos se deben principalmente a dos motivos: en primer lugar, a su alta relación átomos/moléculas en la superficie de la NP en comparación con su interior y, en segundo lugar, al área superficial por unidad de volumen (Nagarajan y Hatton, 2008).

Actualmente se usan diversos métodos de obtención de nanopartículas como son la hidrólisis ácida, microfluidización, regeneración, ultrasonificación, hidrólisis enzimática, entre otros, esto dependiendo del biopolímero a utilizar (almidón, celulosa, quitina).

### **2.5.1 Métodos para obtención de nanopartículas**

El interés industrial y científico sobre el uso de nanopartículas de almidón (npa) ha ido en aumento y con ello también el desarrollo de numerosos métodos novedosos para su obtención, las npa pueden ser obtenidas de diversas fuentes botánicas, la forma tamaño y morfología de estas dependen tanto de la fuente como del método utilizado para la obtención. El método más utilizado para la obtención de npa es la hidrólisis ácida suave puede utilizarse ácido clorhídrico (Putaux *et al.*, 2003) ó ácido sulfúrico (Angellier *et al.*, 2004). Existen también otros métodos químicos como la hidrólisis enzimática, tratamientos mecánicos o físicos como se muestra en la Figura 4. Sin embargo, los rendimientos son mucho más bajo, hasta ahora en comparación con los obtenidos por hidrolisis acida. Otras desventajas es la gran cantidad de residuos tóxicos generados durante este proceso (Le Corre y Angellier, 2014).



**Figura 4.** Métodos de obtención de nanopartículas, nano cristales y nano coloides a partir de almidón. Fuente (Adaptado de Le Corre, 2014).

### **2.5.1.1 Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida se realiza normalmente en suspensiones de almidón del 30 al 40% de sólidos totales, con temperaturas que pueden ir de 40 a 60 °C, por lo general inferiores al punto de gelatinización con la finalidad de no afectar la funcionalidad del gránulo de almidón. Los ácidos más utilizados son el sulfúrico y clorhídrico en una concentración que oscila entre 3M y 5M (Angellier *et al.*, 2004). El proceso de hidrólisis es llevado a cabo en agitación constante por periodos de tiempos que van desde 1 h hasta días (Li *et al.*, 2007; Jayakody *et al.*, 2002; Angellier *et al.*, 2005). Cuando el grado de hidrólisis se alcanza, la reacción es neutralizada y el almidón puede ser recuperado por medio de filtración o centrifugación (Wurzberg, 1986). En este proceso de hidrólisis se obtienen cadenas de bajo peso molecular y menor viscosidad, aumentando el índice de solubilidad y en algunos casos disminución de la firmeza de los geles e incremento de la temperatura de gelatinización (Fenneman, 2000).

### **2.5.1.2 Microfluidización (MF)**

El método de microfluidización, consiste en la manipulación de un flujo continuo de líquido a través de microcanales, utilizando homogenización de alta presión. El accionamiento del flujo de líquido se lleva a cabo por una fuente externa que genera la presión como: bombas mecánicas, microbombas mecánicas, o mecanismos electrocinéticos (Liu *et al.*, 2009). El equipo consta de un sistema que tiene una bomba intensificadora, electrónica-hidráulica la cual genera un cizallamiento en la suspensión de almidón que es pasada a altas velocidades a través de estos microcanales (presión < 207 MPa). Esto genera la reducción del tamaño de partícula, debido a la fractura de las cadenas (amilosa y amilopectina), lográndose algunas veces partículas la reducción de un tamaño que van de 3-6  $\mu\text{m}$  a 10-20 nm. Sin embargo, en este método presenta inconvenientes como, pérdida de cristalinidad, parcial o total, la concentración de sólidos en la suspensión es baja, el rendimiento es bajo también (Hee *et al.*, 2015).

### **2.5.1.3 Regeneración**

El método de la regeneración consiste en gelatinizar el almidón y posteriormente precipitarlo con un disolvente generalmente n-butanol y el almidón es recuperado por centrifugación. Este proceso es uno de los más utilizados para preparar nanopartículas de almidón con carácter amorfo. Una de las desventajas es que requiere ser combinado con otras técnicas para su obtención como son la hidrólisis enzimática y la recristalización, ya que el complejo que se obtiene contiene una gran parte de la matriz amorfa, por lo que es necesaria una extracción selectiva. Otras desventajas es que se tiene un bajo rendimiento (Sun *et al.*, 2014).

### **2.5.1.4 Ultrasonificación**

El método de ultrasonido de alta intensidad es un proceso físico de alimentación oscilante que se utiliza para generar nanopartículas de almidón por las fuerzas hidrodinámicas de ultrasonido.

En él se genera una cavitación ultrasónica, es decir, la formación de micro burbujas en el seno del líquido causada por una rápida caída de presión local por debajo de la presión de vapor del líquido. (Brennen *et al.*, 1995; Sauter *et al.*, 2008). Cuando la presión local supera la presión de vapor, la reducción del volumen de burbujas conduce a un colapso violento, una compresión del contenido de burbujas (en sistemas acuosos en su mayoría una mezcla de vapor y gas) y se acompaña de una alta temperatura local de hasta 786 °C y una presión de 100 MPa (Philipp y Lauterborn, 1998; Suslick y Flannigan, 2008).

El grado de cavitación está relacionado con varios parámetros del campo ultrasónico como la frecuencia, amplitud de la onda de sonido o intensidad (Neppiras, 1980; Lauterborn y Ohi, 1997). La burbuja de cavitación en un campo ultrasónico oscila en una forma estable, esférica correspondiente a la presión oscilante (Brennen, 1995). La burbuja crece a un tamaño crítico en función del tiempo combinado con la difusión no lineal del gas (difusión rectificada) (Neppiras, 1980). Este tamaño crítico de la burbuja depende de la frecuencia de la presión oscilante y por lo tanto a su vez de la frecuencia ultrasónica. Las frecuencias más bajas dan lugar a burbujas más grandes y por lo tanto

un colapso más vigoroso. La cavitación puede ocasionar una depolimerización por rompimiento de enlaces covalentes y no-covalentes. (Weiss *et al.*, 2011).

En este sentido, algunos grupos de investigación trabajan en el procedimientos y técnicas con el uso de ultrasonido de alta intensidad para generar nanopartículas de almidón evaluando algunos factores importantes como: la temperatura, concentración, potencia, amplitud y tiempo de sonicación, ya que se ha observado que el tamaño de las nanopartículas generadas a partir de este biopolímero puede ser muy variada (Haaj *et al.*, 2013).

### 2.5.1.5 Hidrólisis enzimática

Durante la hidrólisis enzimática se rompen los enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6) presentes en el almidón para liberar cadenas más cortas dextrinas, maltosa y glucosa. Las enzimas actúan específicamente sobre un tipo de enlaces o en algunos casos sobre los dos. En el Cuadro 2 se clasifican las enzimas utilizadas en la hidrólisis del almidón (Mercier, 1982).

La hidrólisis enzimática tiene ventajas significativas sobre los métodos químicos, ya que las enzimas utilizadas son obtenidas de fuentes naturales (animales, plantas, microorganismos) y presentan una especificidad muy alta en distintas condiciones de reacción, tales como pH, temperatura y en medio acuoso o no acuoso, son fácilmente biodegradables, lo que reduce el riesgo de la contaminación ambiental (Buchholz *et al.*, 2005; Aehle 2007; Olempska-Beer *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.** Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón.

Enzima	Tipo de enlace	Tipo de ataque	Productos terminales	
			Amilosa	Amilopectina
<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	$\alpha$ (1-4)	Endo	Glucosa Maltosa	Dextrinas
<b><math>\beta</math>-amilasa</b>	$\alpha$ (1-4)	Exo	Glucosa Maltosa	Maltosa Dextrinas
<b>Pululanasa</b>	$\alpha$ (1-6)	Endo	Ninguno	Dextrinas

<b>Isoamilasa</b>	$\alpha(1-6)$	Endo	Ninguno	Dextrinas
<b>Amiloglucosidasa</b>	$\alpha(1-4)$ $\alpha(1-6)$	Exo	Glucosa	Glucosa

Fuente: Mercier 1982

El análisis cinético de numerosas reacciones enzimáticas utilizando sustratos solubles ha demostrado que las reacciones enzimáticas son sistemas dependientes de la concentración. Sin embargo, a diferencia de sustratos solubles en solución, sustratos de tipo granular insolubles tales como gránulos de almidón nativo en agua, reaccionan de manera diferente. Por ejemplo, la amilólisis de almidón nativo por diversas amilasas depende de la concentración específica de la superficie granular en lugar de la concentración de sustrato, expresado en porcentaje de sustrato en un volumen específico de la solución (Kong *et al.*, 2003; Sarian *et al.*, 2012). Los efectos del tamaño de gránulo de almidón en las etapas iniciales de amilólisis han sido bien examinadas y es uno de los muchos factores que influyen en la hidrólisis enzimática de gránulos de almidón nativo, incluyendo el tipo de cristal, la estructura de gránulo, la relación amilosa/amilopectina, el peso molecular medio, la presencia de lípidos y proteínas, condiciones de reacción, y la especificidad de la enzima (Oudejeriouat *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2011). La hidrólisis enzimática de gránulos de almidón nativo tal como papa, maíz, arroz por  $\alpha$ -amilasa implica una reacción entre una enzima en solución y una superficie sólida representada por el gránulo. Por lo tanto, el área de la superficie es accesible para la enzima, y la susceptibilidad de adsorción sobre esta superficie es importante para la hidrólisis enzimática en una etapa inicial (Tawil *et al.*, 2010). Naturalmente, cuanto menor sea el tamaño del gránulo de almidón, mayor será el porcentaje de hidrólisis (Franco *et al.*, 2006).

Kong *et al.*, 2003 reportaron que las cinéticas linealizadas (Lineweaver-Burk) de los efectos de la  $\alpha$ -amilasa en almidones nativos (papa, maíz y arroz) describieron la dependencia de la superficie de los gránulos ya que la forma de esfera de los gránulos de almidón tiene un diámetro medio. Las tasas iniciales de hidrólisis de los gránulos de almidón nativo se asociaron directamente al área superficial en lugar de la concentración de masa, sin tener en cuenta el origen botánico de los almidones. Dado que la concentración de la enzima afecta significativamente la velocidad inicial de la reacción de acuerdo con lo reportado por Tahir *et al.*, (2010). El uso de una enzima a

menor concentración es muy útil en la obtención de la información detallada de amilólisis de almidón y de la superficie granular en la etapa inicial de la hidrólisis.

#### **2.5.1.5.1 $\alpha$ -Amilasas**

Es la enzima más usada en la degradación de almidones, utilizada principalmente en la industria alimentaria, farmacéutica, y textil. (Gupta *et al.*, 2003). La  $\alpha$ -amilasa es la enzima de mayor utilidad a escala industrial y su origen puede ser vegetal, animal o microbiano (bacterias, mohos, y levaduras). Se caracteriza por hidrolizar al azar los enlaces  $\alpha$  (1-4) presentes en las cadenas de amilosa y amilopectina, produciendo como sustancias terminales, en el primer caso, glucosa y maltosa, y en el segundo, además de los sacáridos anteriores cadenas más o menos ramificadas, llamadas  $\alpha$ -dextrinas límite (Mercier, 1985).

Las  $\alpha$ -amilasas comerciales pueden ser de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amiloliquefaciens*) o de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*). Las de origen bacteriano son más termoestables que las fúngicas.

### 3. ANTECEDENTES

Se han realizado diversas investigaciones sobre la obtención de nanopartículas de almidón, con el fin de encontrar la manera más rápida y económica de obtenerlas. A continuación, se enlistan algunos estudios realizados.

Angellier *et al.*, (2004), optimizaron la técnica para la preparación de nanocristales de almidón, y con ello determinaron las condiciones operativas que conducen al tamaño más pequeño del residuo hidrolizado insoluble en el menor tiempo y con el rendimiento más alto. Por lo tanto, los modelos empíricos se elaboraron utilizando un diseño que incluyó a 31 ensayos. Se utilizó metodología de superficie de respuesta, para investigar el efecto de la temperatura, concentración de ácido ( $H_2SO_4$ ), concentración de almidón, tiempo de hidrólisis y velocidad de agitación, en la hidrólisis selectiva de los gránulos de almidón de maíz ceroso. Se demostró que con estos parámetros es posible obtener nanocristales de almidón después de sólo 5 días de hidrólisis de  $H_2SO_4$  con un rendimiento del 15% en peso y que tienen la misma forma que los obtenidos a partir del procedimiento clásico después de 40 días de tratamiento HCl, con un rendimiento de 0,5 % en peso.

Kim *et al.*, (2008) obtuvieron nanopartículas a partir de almidón de arroz ceroso empleando hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa y posteriormente ultrasonificación en etanol. La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) reveló que una hidrólisis suave durante 3 horas produjo un incremento en la entalpía de fusión del almidón, lo que podría indicar que la hidrólisis fue selectiva en las regiones amorfas. Más tarde, en un transcurso de 6-24 horas, la velocidad de hidrólisis se redujo, con disminuciones graduales en la entalpía de fusión medidas por DSC, lo que indica que las regiones cristalinas se erosionaron simultáneamente. Los patrones de difracción de Rayos X revelaron la misma tendencia que los resultados de DSC. El diámetro medio de los gránulos de almidón o partículas se redujo dramáticamente en las dos mediciones en volumen y en número ( $5.94 \rightarrow 1.64 \mu m$ , y  $0,45 \rightarrow 0.18 \mu m$ , respectivamente) durante la primera etapa de hidrólisis rápida (hasta 3 horas). El almidón nativo de arroz ceroso exhibió una distribución de tamaño de partícula con un diámetro promedio de  $5.6 \mu m$ . Después de la hidrólisis durante 3 horas, la distribución del tamaño mostró dos picos donde la mayor población de partículas se encuentra entre

0.5 y 3.6  $\mu\text{m}$ . Presumiblemente la fracción de almidón de 0,5  $\mu\text{m}$  consisten en blocklets cristalinos. Con la hidrólisis excesiva (24 h y ultrasonido, el diámetro de partículas de almidón se incrementó, lo que indicó que las partículas pueden estar hinchadas o agregadas en clusters.

Hajj *et al.*, (2013) obtuvieron nanopartículas de almidón, a partir de gránulos de almidón de maíz ceroso usando ultrasonido de alta intensidad método que es puramente físico. Las partículas obtenidas fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (FE-SEM por sus siglas en inglés), espectroscopia Raman, y la difracción de Rayos X (WAXD por sus siglas en inglés) las cuales se utilizaron para caracterizar la morfología y estructura de las nanopartículas resultantes. Los resultados revelaron que el tratamiento con ultrasonido de la suspensión de almidón al 1.5% en agua, a temperatura baja durante 75 minutos y 80% de poder da como resultado la formación de nanopartículas de almidón entre 30 y 100 nm de tamaño. En comparación con la hidrólisis ácida, que es el proceso más usado, demostraron que este tratamiento tiene la ventaja de ser bastante rápido, presentando un rendimiento más alto y que no requiere ningún tratamiento químico.

Lei Dai *et al.*, (2015) obtuvieron nanopartículas de almidón de Taro (nat) mediante hidrólisis con pululanasa y la recristalización del almidón gelatinizado para ser usadas como agentes de refuerzo en las películas de almidón de maíz. Se investigó la influencia de los contenidos de nat (0.5-15%) sobre las propiedades físicas, mecánicas, térmicas y estructurales de las películas de almidón. Un aumento en la concentración de nat condujo a una disminución significativa en la permeabilidad al vapor de agua (WVP por sus siglas en inglés) de las películas. La adición de nat aumentó la resistencia a la tracción (TS por sus siglas en inglés) de las películas de 1.11 MPa a 2,87 MPa. La temperatura inicial (A) y la temperatura de fusión (Tm) de las películas que contienen nat fueron mayores que las de las películas de almidón puro. La adición de nat mejoró la estabilidad térmica de las películas de almidón.

Majzooobi *et al.*, (2015) evaluaron las propiedades funcionales de almidón de trigo usado para encolado, preparado mediante oxidación, hidrólisis enzimática y sonicación. Los autores observaron que los mejores resultados se obtuvieron al combinar 40 minutos de sonicación y una amilosis con una concentración de 0.4%  $\alpha$ -amilasa, con la cual se observó un aumento en la viscosidad y área superficial.

Brenner *et al.*, (2016) evaluaron la eficacia del proceso de cavitación en la preparación de almidón de maíz utilizado para aumentar la resistencia del papel, comparando este método con la oxidación y la hidrólisis enzimática. Con lo que concluyeron que la degradación del almidón al ser asistida por ultrasonido proporciona un aumento en la viscosidad, área superficial y fuerza durante el encolado.

## 4. JUSTIFICACIÓN

El almidón es utilizado como aditivo para la formulación una gran gama de productos alimenticios y actualmente se estudia su aplicación en materiales biodegradables (películas, empaques y recubrimientos), debido a la gran problemática de contaminación a nivel mundial que es causada por el uso desmedido de polímeros sintéticos. Por tal razón muchas investigaciones han sido enfocadas en la búsqueda u obtención de biopolímeros como el almidón a partir de diferentes fuentes. En la región de la Cuenca del Papaloapan y específicamente en ciudad de Tuxtepec Oax, han proliferado diferentes cultivos agrícolas como lo son la piña, caña de azúcar, litchi, yuca, plátano y malanga. Estos dos últimos son cultivos que están teniendo mucho auge y que contienen un alto contenido de almidón (70 al 80% bs). Sin embargo, estos cultivos (plátano y malanga) no son aprovechados en su totalidad debido a pérdidas por factores como: plagas, inclemencias del tiempo, mal manejo durante su cosecha, empaque y embalaje del producto o bien por ser un fruto climatérico como es el caso del plátano, por lo que, se buscan alternativas para su uso o aprovechamiento. Actualmente, las nanopartículas (np) obtenidas a partir de biopolímeros como celulosa y almidón ha cobrado mucha importancia debido a que éstas pueden ser utilizadas como agente de refuerzo en diferentes matrices poliméricas. Su incorporación a películas biodegradables provee cambios significativos en las propiedades mecánicas, térmicas y permeabilidad al vapor de agua. Durante la obtención de nanopartículas a partir de almidón, la hidrólisis enzimática y ultrasonido tienen ciertas ventajas (obtención de tamaño de partícula específico, no generan residuos tóxicos, tiempos de reacción cortos) comparado con el método tradicional de hidrólisis ácida. En este trabajo, se plantea la combinación de un método enzimático y físico para la obtención de np de almidón. Las np obtenidas a partir de estas dos fuentes botánicas de almidón (plátano y malanga) con tamaños de gránulos y morfologías diferentes, aportarían información básica para entender el proceso de hidrólisis parcial y efecto del ultrasonido en la degradación del almidón.

## 5. HIPÓTESIS

El proceso de hidrólisis enzimática parcial asistida por ultrasonido para la reducción del tamaño de los gránulos de almidón de plátano macho y malanga, facilitará la generación de nanopartículas con una distribución de tamaño estrecho y propiedades distintas a las convencionales.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de sonicación en la hidrólisis enzimática parcial de almidones de dos fuentes (*Colocasia esculenta* y *Musa paradisiaca*) mediante el estudio morfológico y estructural de las nanopartículas obtenidas

### 6.2 Objetivos específicos

- ❖ Obtener nanopartículas a partir de la hidrólisis enzimática de almidón obtenidos de dos fuentes: *Musa paradisiaca* y *Colocasia Esculenta* para establecer las condiciones de obtención de las mismas.
- ❖ Analizar el efecto de la sonicación mediante la medición de las propiedades morfológicas, estructurales y de estabilidad térmica de nanopartículas obtenidas a partir de almidón de plátano (*Musa paradisiaca*) y malanga (*Colocasia esculenta*).
- ❖ Caracterizar morfológica y estructuralmente las nanopartículas mediante técnicas de Microscopia Electrónica de Barrido, Microscopia Electrónica de Transmisión, Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier, Difracción de Rayos X y análisis de EDS.
- ❖ Evaluar la estabilidad térmica de las nanopartículas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Termogravimétrico

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Materia prima

La variedad de plátano empleado como materia prima fue *Musa paradisiaca L.* conocida comúnmente como plátano macho, en estado inmaduro (diez días antes de la fecha de corte). La variedad de malanga que se utilizó fue *Colocacia esculenta*. El plátano y la malanga fueron proporcionados por productores (Finca Mundo Nuevo y Grupo Paisano, respectivamente) del municipio de Tuxtepec, Oaxaca. El almidón comercial utilizado fue almidón de papa de la marca Meyer.

### 7.2 Aislamiento de almidón de plátano

El almidón fue aislado por el método propuesto por Flores-Gorosquera *et al.*, (2004), con modificaciones propuestas por Vergara-Méndez *et al.*, (2012). Los plátanos se pelaron y cortaron en trozos de 5 a 6 cm<sup>3</sup>, inmediatamente después fueron sumergidos en una solución de ácido cítrico (0.3 g/L). Posteriormente, fueron molidos en una licuadora tipo industrial (Marca: Waring, modelo CB15), a una velocidad baja (600 g de fruto por litro de solución) durante 2 min. Enseguida el fruto licuado se tamizó consecutivamente en diferentes tamices de acero inoxidable (Marca: Fisher Scientific Company) con mallas del No. 50 (0.30 mm), 100 (0.15 mm), 200 (0.075 mm) y 400 (0.038 mm). hasta que el agua del lavado fue clara. Posteriormente, se dejó sedimentar durante 24 h a 4 °C. Los sedimentos de las mallas 200 y 400 se maceraron, tamizaron y dejaron sedimentar por segunda ocasión. El almidón se secó en un horno por convección durante 24 h a 50 °C, después de este proceso se molió y tamizó en malla 50 (0.30 mm). Finalmente, el polvo obtenido fue almacenado (bolsas al vacío de ½ kg) para su posterior análisis.

### 7.3 Aislamiento de almidón de malanga

El almidón fue aislado por el método propuesto por Simsek *et al.*, (2012), con algunas modificaciones. Los cormos (tubérculos) se pelaron y cortaron en trozos pequeños,

inmediatamente después fueron sumergidos en una solución de Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (0.015%). Posteriormente, se molieron en una licuadora tipo industrial (Marca: Waring, modelo CB15), a velocidad máxima (en una relación 1:1 de fruto, solución) durante 1.5 min. El homogenizado se tamizó consecutivamente en diferentes tamices de acero inoxidable (Marca: Fisher Scientific Company) con mallas del No. 50 (0.30 mm), 100 (0.15 mm), 200 (0.075 mm) y 400 (0.038 mm), hasta que el agua del lavado fue clara. Posteriormente, se centrifugó a 8000 g durante 10 min. El almidón fue secado por convección durante 24 h a 40 °C. Después se molió y tamizó en malla 50 (0.30 mm) finalmente fue almacenado para su caracterización y uso posterior.

## **7.4 Análisis Químico Proximal**

### **7.4.1 Determinación de humedad**

La determinación de humedad se realizó de acuerdo al método No. 44-19, de la AOAC (1999). Se colocaron 3 charolas de aluminio a peso constante por 24 h. Se pesó 1 g de muestra. Las charolas con la muestra se colocaron en una estufa (Binder GmbH, Modelo FD115, Germany) a una temperatura de 110 °C hasta obtener peso constante, después se dejaron enfriar en un desecador para posteriormente ser pesadas y realizar los cálculos correspondientes.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{PI - PF}{PI - PC} \times 100$$

Dónde:

PI= peso de la charola con muestra fresca (g).

PF= peso de la charola con muestra seca (g).

PC= Peso de la charola sin muestra (g).

### **7.4.2 Determinación de cenizas**

El material mineral se cuantificó mediante la incineración de la muestra hasta la obtención de un residuo inorgánico correspondiente a la fracción de cenizas. La determinación de cenizas se realizó de acuerdo al método No. 08-01, de la AOAC

(1999). En un crisol a peso constante (A) se pesaron 3 g de muestra fresca o deshidratada. Esta muestra se pre-calcinó a fuego directo, posteriormente fueron colocados en una mufla (Wisetherm) a una temperatura de 550-600 °C por espacio de 4 a 5 h. A continuación, la mufla se dejó a temperar a 100 °C. Finalmente los crisoles fueron pasados a un desecador y se esperó a que estos se enfriaran completamente para luego ser pesados (B).

Cálculos:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{B - A}{M} \times 100$$

Dónde:

A= Peso del crisol sin muestra (g).

B= Peso del crisol con cenizas (g).

M= Peso de la muestra.

#### **7.4.3 Extracto etéreo o grasas**

La determinación de grasas se realizó de acuerdo al método No. 30-25, de la AOAC (1999). Se pesó de 1 g de muestra deshidratada en un papel filtro de poro mediano. Este se dobló perfectamente para formar un cartucho y se colocó en el aparato de extracción, utilizando un matraz de fondo plano de 50 mL (con perlas de ebullición) que fue puesto previamente a peso constante. Se colocó éter de petróleo a reflujo en un sistema de extracción Soxhlet durante 5 h, a una velocidad de condensación de 2 a 3 gotas por segundo. Al término de la extracción se recuperó el solvente.

Posteriormente, el matraz se llevó a peso constante en una estufa (Binder GmbH, Modelo FD115, Germany) a temperatura de 100 °C. Finalmente el matraz se enfrió en un desecador y fue pesado.

Cálculos:

$$\% \text{ Extracto Etereo} = \frac{B - A}{M} \times 100$$

Dónde:

A= Matraz a peso constante (g).

B= Matraz con extracto etéreo (g).

M= Peso de la muestra (g).

#### **7.4.4 Nitrógeno total método Kjeldahl**

La determinación de nitrógeno total se realizó de acuerdo al método No. 46-13, de la AOAC (1999). Se pesó 0.05 g de muestra en tubos Kjeldahl y se le agregó 2 g de mezcla catalizadora, (sulfato de potasio y óxido de mercurio) y 5 mL de ácido sulfúrico.

Posteriormente, esta mezcla se puso a digestión hasta que la mezcla se aclarara y a continuación se enfrió para su posterior destilación. Antes se le agregó 10 mL de agua y 20 mL de una solución de hidróxido de sodio y tiosulfato de sodio. Por otro lado, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 10 mL de ácido bórico al 5% con unas gotas de indicador de Wesslow hasta obtener 100 mL de destilado. El destilado se tituló con ácido clorhídrico al 0.1 N.

#### **7.5 Contenido de amilosa y amilopectina.**

La determinación del contenido de Amilosa/Amilopectina se llevó a cabo mediante el kit de ensayo Amylose/Amylopectin Assay Procedure (K-AMYL 04/06 de MEGAZYME International, Ireland LTD). Esta técnica emplea concavalin A (ConA) que forma complejos con amilopectina permitiendo su separación por centrifugación. Se pesaron de 20 a 25 mg de muestra en tubos con tapa de 10 mL. Se adicionó 1 mL de DMSO a los tubos mientras se agitaban a una velocidad baja en un vortex. Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto. Esto se realizó para dispersar la muestra por completo y eliminar grumos o conglomerados de almidón. Se adicionaron 2 mL de DMSO al pellet de almidón y se llevó a baño maría durante 1 h con

agitación suave. Posteriormente se realizaron lavados con 4 mL de solvente ConA (el solvente de ConA se preparó con 30 mL de ConA concentrado y 70 mL de agua). Se mezcló y se transfirió el contenido a un matraz aforado de 25 mL para llevar a aforo con el solvente ConA. A partir de dicha solución, se transfirió 1 mL en un tubo eppendorf de 2 mL y se agregó 0.5 mL de la solución ConA. Se cerró el tubo y se mezcló suavemente evitando la formación de espuma. Se dejó reposar el tubo durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó a 14,000 g por 10 minutos. Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL. También se adicionaron 3 mL de regulador de acetato de sodio (100 mM, pH:4.5). Se mezcló el contenido, se cerró el tubo y se calentó en un baño de agua durante 5 minutos lo cual ayudó a desnaturalizar la ConA. Se colocó el tubo en un baño de agua a 40 °C, se agregó 0.1 mL de la mezcla de enzimas amiloglucosidasa /  $\alpha$ -amilasa y se incubó a 40 °C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 2,000 g por 5 minutos. Posterior a la centrifugación, se tomó una alícuota de 1.0 mL y se adicionaron 4 mL de GODPOD. Esta solución se incubó a 40 °C por 20 minutos al igual que el blanco y el control D-Glucosa. Finalmente se leyó la absorbancia a 510 nm de cada muestra y el control D-glucosa contra el blanco. El blanco se preparó con 1 mL de regulador de acetato de sodio (1.0 mM) y 4 mL de GODPOD y se incubó a 40 °C por 20 minutos. Para el control D-glucosa se utilizó 0.1 mL de solución estándar D-Glucosa (1 mg mL<sup>-1</sup>), 0.9 mL de regulador de acetato de sodio y 4.0 mL de GODPOD. Se utilizaron los valores de almidón total para el cálculo del porcentaje de amilosa en donde se utilizó la siguiente fórmula:

$$Amilosa \left( \% \frac{W}{W} \right) = \frac{Absorvancia \text{ (Sobre nadante ConA)}}{Absorvancia \text{ (Alícuota de almidón total)}} \times 66.8$$

## 7.6 Almidón total.

El contenido de almidón total fue evaluado por el método de Goñi *et al.*, (1997), el cual se fundamenta en cuantificar la glucosa liberada como resultado de la hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa, misma que hidroliza los enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$  de las cadenas de amilosa y amilopectina. Para ello se pesaron 50 mg de muestra, la cual fue dispersada con 3 mL de agua destilada, 3 mL de KOH 4M aplicando agitación

durante 30 min. Posteriormente, se añadieron 5.5 mL de HCl 2M y 3 mL de tampón de acetato sódico 0.4 M. Se ajustó a pH 4.75 y se añadieron 60  $\mu$ L de amiloglucosidasa. Posteriormente, se incubó en un baño de agua a 60 °C durante 45 min con agitación constante. Se centrifugó a 3000 rpm por 15 min y recolectó el sobrenadante en un matraz aforado de 50 mL. Se agregó al residuo 10 mL de agua destilada con el fin de lavarlo, se centrifugó y se recolectó el sobrenadante nuevamente. Finalmente, se tomaron 50  $\mu$ L del aforado para determinar la cantidad de la glucosa liberada por digestión enzimática, mediante el método de glucosa/oxidasa peroxidasa. Se leyeron las densidades ópticas a 510 nm en un espectrofotómetro, Perkin Elmer, Modelo Lamda 25 L600-00B, Estados Unidos.

### **7.7 Tratamiento con ultrasonido del almidón**

El proceso de ultrasonicación del almidón se llevó a cabo en un equipo de ultrasonido Hielscher UP200St (Hielscher Ultrasonics, Germany) de la siguiente manera; primero se pesó 1 g de muestra y se colocó en un vaso de precipitado con 20 mL de agua destilada, este se dejó en agitación (250 rpm) constante por 20 min. Terminado este tiempo la suspensión se colocó en una celda de flujo enchaquetada a una temperatura constante (4°C), se utilizó una potencia de 170 W, una amplitud del 20% y un tiempo de sonicación de 30 min. Utilizando un sonotrodo de 2 mm de diámetro.

### **7.8 Hidrólisis enzimática.**

La hidrólisis enzimática se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Kim *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Se disolvieron 50  $\mu$ L de alfa-amilasa en 50 mL de tampón fosfato de sodio 20 mM, y NaCl 6.7 mM (pH 6.9). Se pesó 1 g de almidón (con pretratamiento por sonicación) (bs) y se dispersó en 50 mL de la solución de enzima. La dispersión se incubó a 37 °C durante 24 h con agitación a 150 rpm. Se añadieron 240 mL de etanol para inactivar la enzima y el almidón hidrolizado se recogió por centrifugación a 2280 x g durante 10 min. El residuo de almidón se lavó tres veces con 300 mL de etanol al 50% y por último se secó a 35 °C en un horno de convección durante toda la noche.

## **7.9 Determinación de azúcares reductores**

La concentración de azúcares reductores liberados en la hidrólisis enzimática del almidón se cuantificó mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1995). Este método se basa en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar y el DNS que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5 nitrosalicílico).

La composición del reactivo (DNS) es la siguiente:

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico 1 g
- NaOH 1.6 g
- Tartrato de sodio y potasio 30 g
- Se ajustó y aforó a 100 mL

Inicialmente se tomaron 50  $\mu$ L de muestra, a ésta se le adicionó 450  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 500  $\mu$ L de DNS, se calentaron en baño de agua a 80-85 °C durante 5 minutos. Posteriormente se introdujeron durante 5 min en un baño de agua fría y se midió la absorbancia a 540 nm.

La concentración de azúcares reductores totales se calculó a partir de una recta patrón determinada previamente con disoluciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1,1.2 y 1.4 g/L. Dicha serie se determinó para cada serie de medidas de azúcares totales.

## **7.10 Estudios morfológicos de los almidones.**

### **7.10.1 Determinación de la distribución de tamaño de partícula.**

El tamaño de partícula se determinó a temperatura ambiente utilizando un Analizador de difracción Láser Malvern Zeta Sizer (Malvern Instruments, Ltd.) modelo ZS90, con una celda de cuarzo (10 mm) y una unidad de dispersión de muestra de volumen pequeño (SVSDU por sus siglas en inglés)

### **7.10.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microestructura de las NP se examinó con un microscopio electrónico de barrido Philips, modelo XL30 ESEM con una microsonda de análisis químico elemental EDS. Las muestras se colocaron sobre un portamuestras de aluminio de 12 mm de diámetro, tipo PIN, previamente depositadas sobre la cinta conductora de carbón de doble cara y adhesiva de plata coloidal. Posteriormente se colocaron en la cámara de vacío (Marca; Denton Vacuum, modelo Desk II, Moorestown, N.J. USA) para eliminar el exceso de humedad y posteriormente se llevaron a su analizaron.

### **7.10.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Las imágenes de TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-2100, TEM,) con filamento LaB6. fueron obtenidas mediante el análisis de las muestras en microscopio un equipo Philips 208, utilizando el software Morgagni 268 en las ampliaciones de 5000-7000. El voltaje de aceleración fue de 90 kV. Las nanopartículas, de almidón (npa) se analizaron con el sistema Análisis (Soft Imaging System GmbH 2003, Munster, Alemania) acoplado a una cámara digital. Todas las suspensiones de Npa fueron homogenizadas vigorosamente antes de ser analizadas para evitar sedimentación y aglomeración.

## **7.11 Estudios moleculares de los almidones.**

### **7.11.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)**

Los estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) se realizaron utilizando un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro DYNASCAN, (Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 serie 82085, Reino Unido). Los espectros se obtuvieron en una resolución de 16 scans, en el rango de 4000-515  $\text{cm}^{-1}$ .

### 7.11.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y posteriormente se analizaron en un difractómetro (Marca; Bruker Axs, modelo; *D8 Advance serie H-X-L4-102*, Alemania) con un generador de radiación de Cu-K $\alpha$  con filtro de Ni y rejilla de 2 mm. Se hicieron barridos en  $2\theta$  de 5 a 40° con una velocidad de barrido de 60 °/s<sup>-1</sup> y con una intensidad de 30 mA y un voltaje de 40 kV. El porcentaje de cristalinidad (%C) se determinó del difractograma, calculando el área correspondiente de los picos cristalinos (Ap) entre el área total bajo la curva (halo amorfo y cristalino) (At) menos el ruido del instrumento (N) de acuerdo a la ecuación:

$$\% C = \frac{A_p}{A_t - N}$$

Dónde:

Ap = Área correspondiente de los picos cristalinos

At = Área total bajo la curva (halo amorfo y cristalino)

N = Ruido del instrumento

### 7.12 Estudios térmicos de los almidones.

#### 7.12.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura y entalpía de gelatinización de los almidones se estudió usando un equipo de calorimetría diferencial de barrido, previamente calibrado con indio. Estos estudios se realizaron en un Calorímetro diferencial de barrido (Marca; TA Instruments, Modelo; Q2000, New Castle, DE). Para realizar el estudio se pesaron 2.2 mg de muestra en base seca en una charola de aluminio y se agregó agua destilada (9  $\mu$ L). Las charolas se sellaron herméticamente y se dejaron equilibrar durante 1 h, antes de realizar el análisis. Como referencia se utilizó una charola de aluminio vacía. Las muestras se sometieron a un programa de calentamiento sobre un intervalo de temperaturas de 30 a 150 °C y una velocidad de calentamiento de 5°C/min.

### **7.12.2 Análisis térmico gravimétrico (TGA)**

Los análisis termogravimétricos de los almidones se realizaron con un equipo de TGA (Marca; Perkin Elmer, Modelo; STA 6000, Estados Unidos), el cual provee medidas continuas de cambio de peso de la muestra sometida a un proceso de calentamiento. Se pesaron aproximadamente 12 mg de muestra, los cuales se calentaron de 30 °C hasta 800 °C, a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min con nitrógeno circulante.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Composición química proximal del almidón de plátano y malanga.

Los resultados del análisis químico proximal se muestran en el Cuadro 3. El almidón de plátano presentó un contenido de humedad de 9.76% valor menor (12.9%) en comparación al reportado por Bello Pérez *et al.*, (2000) para la misma variedad (*Musa paradisiaca*) en estado inmaduro, mientras que el almidón de malanga presentó un contenido de humedad de 9.65% valor muy similar (9.6%) al reportado por Aboubakar *et al.*, (2008). Esta diferencia en contenido de humedad para el caso del almidón de plátano puede ser debida al proceso y condiciones de secado.

**Cuadro 3.** Composición química del almidón de plátano nativo y malanga nativo (g almidón/100 g muestra).

Almidón	Humedad	Cenizas <sup>a</sup>	Lípidos <sup>a</sup>	Proteínas <sup>ab</sup>	Amilosa <sup>a</sup>	Amilopectina <sup>a</sup>
Plátano	9.76±0.14a	0.21±0.00b	0.38±0.09b	0.82±0.25a	23.75±0.51a	76.25±0.34b
Malanga	9.65±0.15a	0.47±0.00a	0.53±0.03a	0.53±0.05b	13.93±0.42b	86.07±0.47a

Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar, reportados en sólidos secos. Letras iguales en la misma columna no son estadísticamente significativos a un nivel de  $\alpha = 0.05$ .

<sup>a</sup>Base seca

<sup>b</sup>N x 5.7

El contenido de cenizas para el plátano fue de 0.21% valor mayor al reportado (0.09%) por Vergara Méndez *et al.*, (2012), y para la malanga fue de 0.47% valor menor al reportado (4.2%) por Agama Acevedo *et al.*, (2011). El contenido de lípidos fue de 0.38% para el caso del plátano valor menor (2.62%) al reportado por Vergara Méndez *et al.*, (2012) y 0.53% para la malanga, valor idéntico (0.53%) al reportado por Aboubakar *et al.*, (2008). El contenido de proteínas para el almidón de plátano fue de 0.82% valor menor (2.03%) al reportado por Bello Pérez *et al.*, (1999), y 0.53% para el almidón de malanga, valor menor (6.9%) al reportado por Agama Acevedo *et al.*, (2011).

El contenido de amilosa para el almidón de plátano fue de 23.75%, este valor es menor a lo reportado por otros autores, 26.13% (Nwokocha *et al.*, 2009), 27.8% (Pelissari *et al.*, 2013), 28% (Núñez *et al.*, 2004), 36.2% (Espinosa-Solis *et al.*, 2009) y 37% (Bello-Pérez *et al.*, 2006). En el caso del almidón de malanga este presentó un contenido de amilosa de 13.93%, valor mayor al reportado por Simsek *et al.*, (2012) por Aboubakar *et al.*, (2008) los cuales oscilan de 16.65% y 30.85%, respectivamente para *Colocasia esculenta* en diferentes variedades.

Se puede observar en los resultados obtenidos que no exceden el 1% en proteínas y lípidos lo cual es un parámetro importante para cualquier modificación del almidón, ya que en caso de exceder estos parámetros es necesario someter el almidón a un tratamiento al momento del aislamiento (Simsek *et al.*, 2012).

Los resultados generados de estos análisis, son atribuidos a la ubicación geográfica y condiciones de cultivo además de la técnica utilizada para el aislamiento y para el caso particular de la humedad a las condiciones de secado.

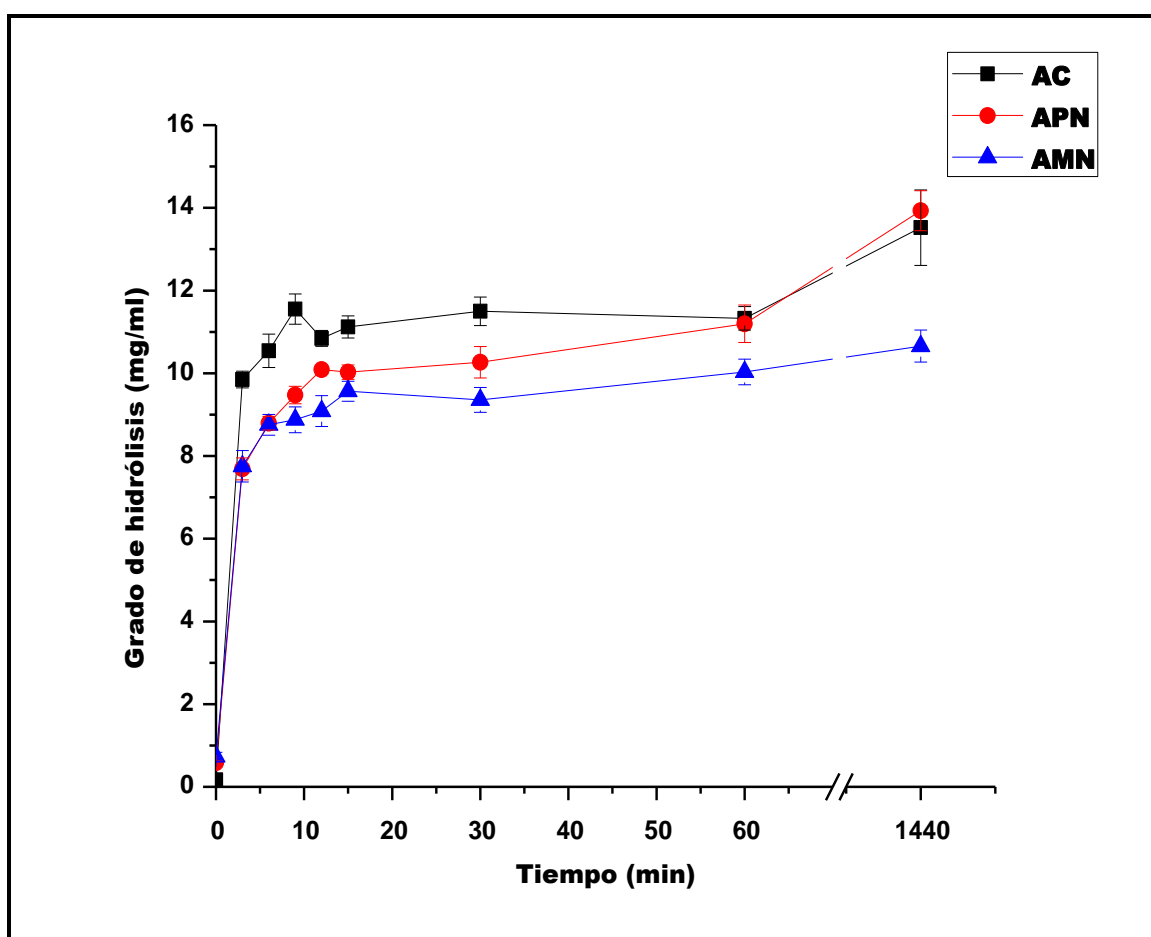
## **8.2 Cinética de hidrólisis del almidón**

El grado de hidrólisis para los gránulos de almidón nativo (comercial, plátano y malanga) se muestran en la Figura 5. El almidón comercial, plátano y malanga muestran un comportamiento muy similar durante los primeros 3 min con una tasa de hidrólisis alta (38%). Después de los primeros 3 min de reacción se observó una diferencia estadística entre las muestras donde el almidón comercial mostró una tasa de hidrólisis más alta seguida del almidón de plátano y malanga. Este comportamiento se mantiene hasta llegar a los 60 min de hidrólisis en donde el almidón comercial mostró una tasa de hidrólisis más baja que el de plátano, el cual presentó una tasa de hidrólisis más alta en comparación con el almidón de malanga.

Durante la primera etapa (0 a 3 min) el mecanismo de hidrólisis enzimática para la liberación de glucosa inició rápidamente en los primeros minutos de la reacción, llegando hasta un porcentaje de hidrólisis del 38%. Esto es debido a que la enzima se difunde a través de pequeños canales o poros, generados por efecto de la degradación enzimática de la  $\alpha$ -amilasa sobre la superficie (inicio el proceso de degradación) y hacia

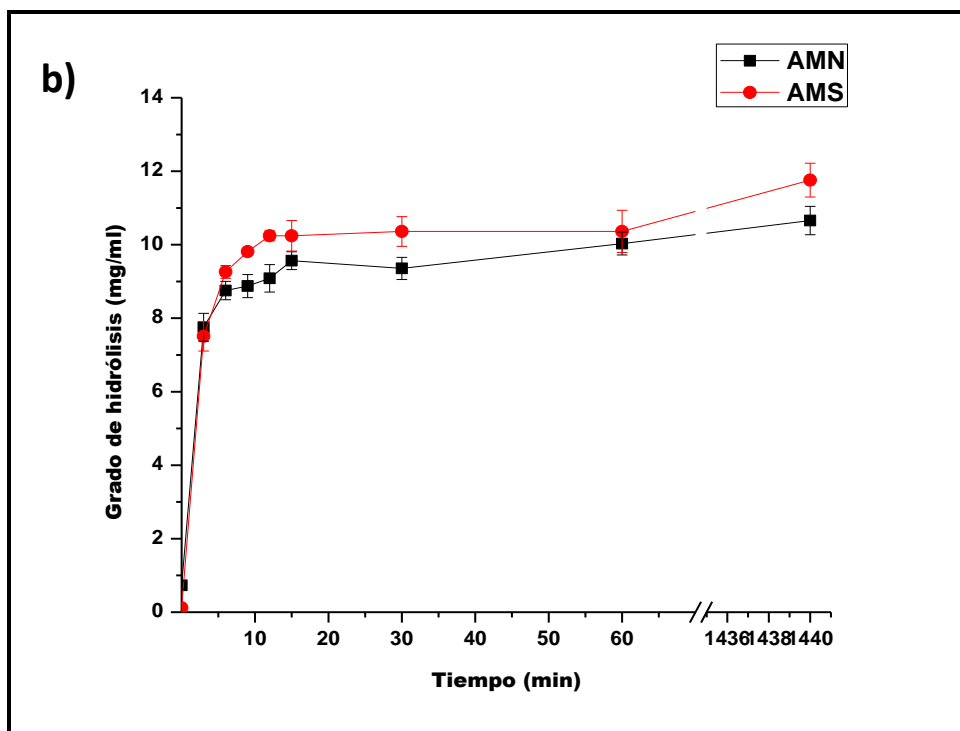
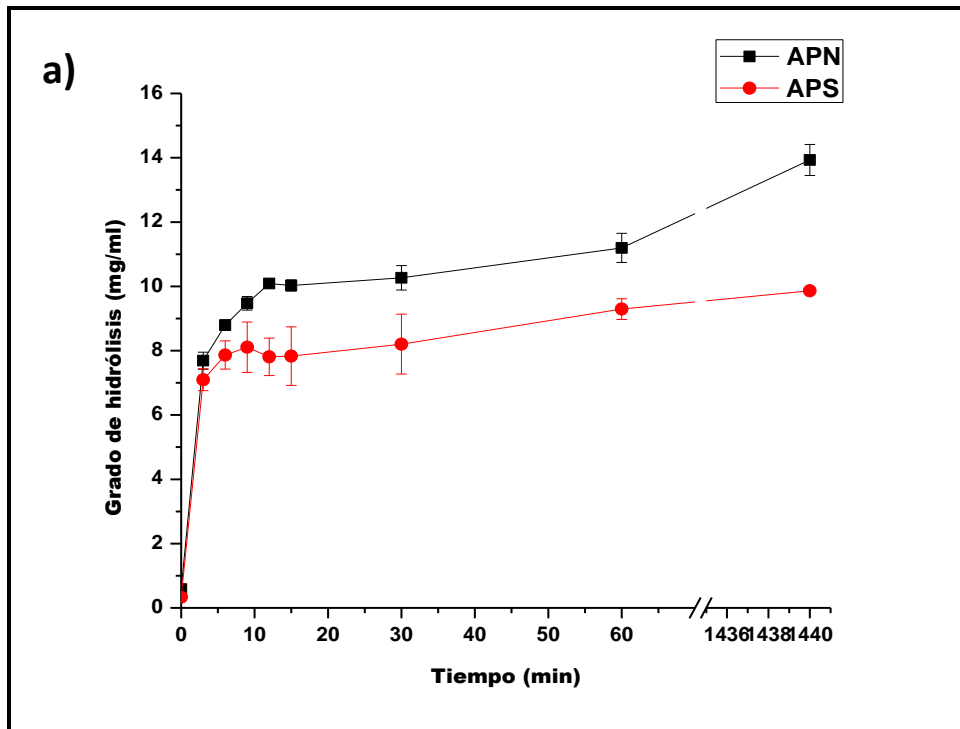
el interior de los gránulos de almidón. La capacidad de hidrólisis de la enzima  $\alpha$ -amilasa para desplegar la estructura de las dobles hélices está influenciada por la distorsión o ruptura de las cadenas paralelas o adyacentes y cuanto menor sea la movilidad mayor será la cristalinidad del gránulo (Oates, 1997).

Se ha reportado que la velocidad de hidrólisis enzimática es más rápida en gránulos pequeños de almidón en comparación de aquellos que son más grandes, como lo demostró Tester and Karkalas (2006), encontrando también que a mayor área superficial mayor es el potencial de adsorción de la enzima y en consecuencia, mayor porcentaje de hidrólisis. Sin embargo, existen otros factores como el arreglo estructural o empaquetamiento y porosidad del granulo sobre la susceptibilidad al proceso de hidrólisis del almidón (Naguleswaran *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Grado de hidrólisis del almidón comercial (AC), almidón de plátano nativo (APN) y almidón de malanga nativo (AMN).

Para analizar el efecto de la sonicación sobre la hidrólisis enzimática, en las Figuras 6a y 6b se presentan las gráficas del grado de hidrólisis para el APS y AMS (almidones de plátano y malanga sonicados previamente) comparados con sus contrapartes (APN y AMN). En ambas fuentes botánicas de almidón tratadas por ultrasonido presentan una disminución en el porcentaje de hidrólisis, esto puede ser debido a la fragmentación más homogénea de los gránulos de almidón produciendo menos extremos reductores, contrario a lo reportado por Hu *et al.*, (2012) trabajo en el cual usan la sonicación y la hidrólisis enzimática simultáneamente, lo cual indica que se pueden tener partículas cristalinas, al momento de ser sometido a la hidrólisis enzimática, estos resultados fueron de gran utilidad para avalar el pretratamiento con ultrasonido.



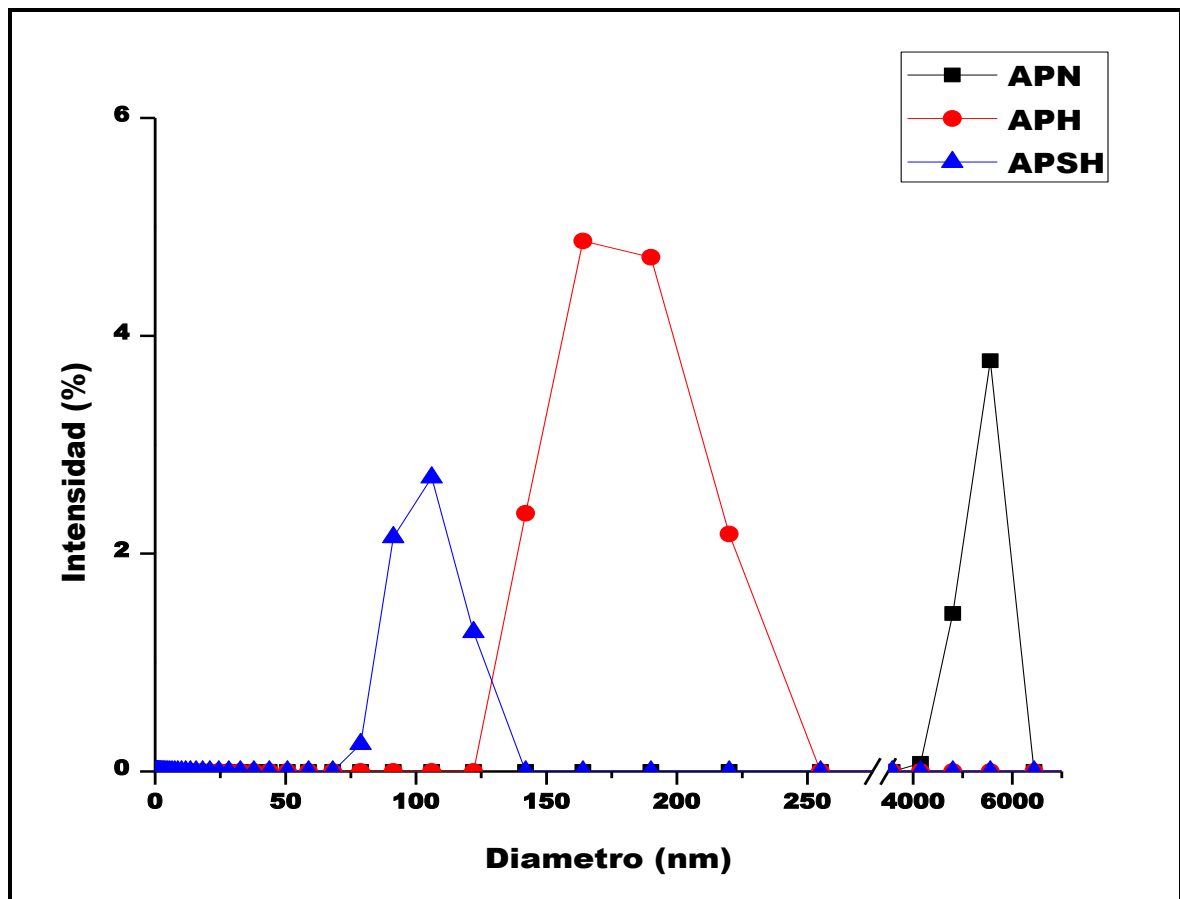
**Figura 6.** a) Grado de hidrólisis (%) del almidón de plátano nativo (APN) y almidón de plátano sonificado (APS) y b) Grado de Hidrólisis (%) del almidón de malanga nativo (AMN) y almidón de malanga sonificado (AMS).

Después de evaluar el grado de hidrólisis de los dos almidones nativos, hidrolizados y sonicados fue necesario realizar un análisis de la distribución del tamaño de partícula a los productos obtenidos durante los tiempos de hidrólisis propuestos (3, 6, 9, 12, 15, 30, 60 y 1440 min). Después de esto y de acuerdo con los resultados obtenidos se eligió la muestra al tiempo de hidrólisis 1440 min, ya que en este tiempo se encontró el tamaño de partícula más pequeño (90 nm).

Posteriormente se realizó la hidrólisis asistida con ultrasonido (sonicación-hidrólisis) y se comparó con las muestras que recibieron solamente tratamiento por ultrasonido en ambos casos (APN y AMN). De aquí las muestras fueron clasificadas de la siguiente forma: APH (almidón de plátano hidrolizado), APSH (almidón de plátano sonificado hidrolizado), AMH (almidón de malanga hidrolizado), AMSH (almidón de malanga sonificado-hidrolizado).

### **8.3 Análisis de la distribución del tamaño de partícula**

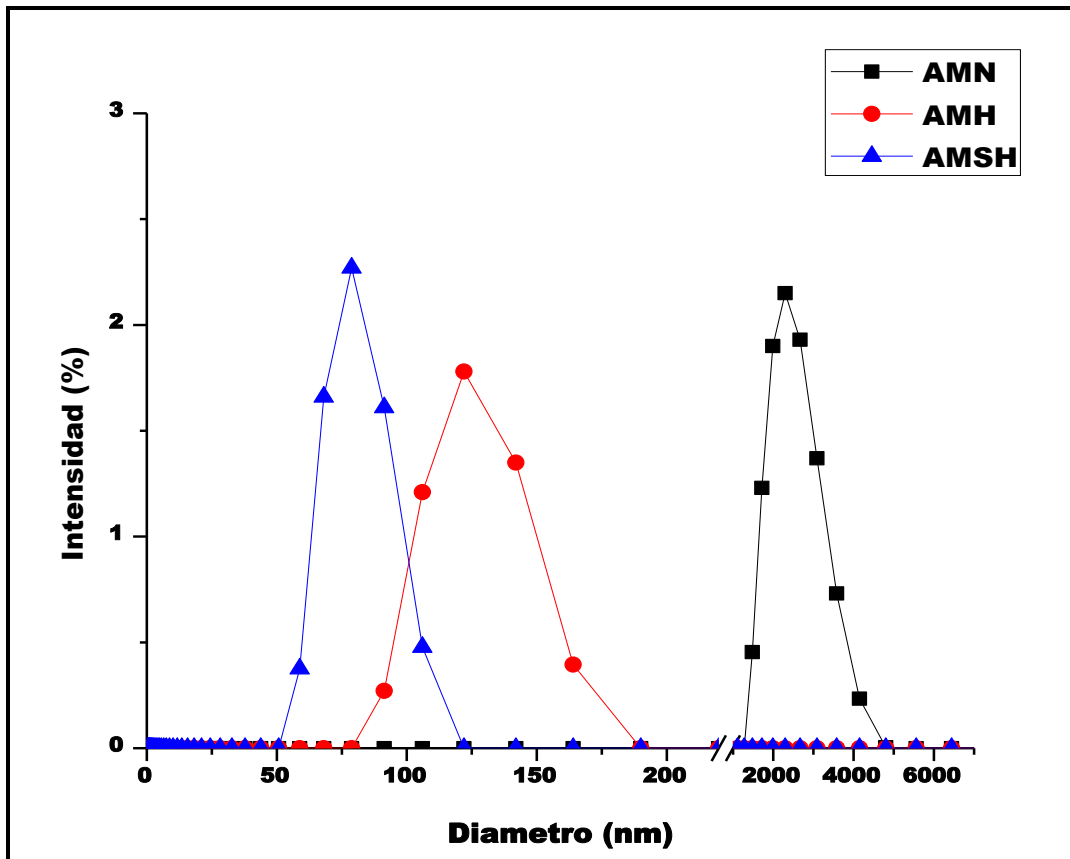
En la Figura 7 se muestra la distribución de tamaño de partícula del APN, APH, y del APSH, se puede observar que el APN presenta una distribución unimodal con tamaños de partícula de 40 a 60  $\mu\text{m}$  y diámetro mediano de 4.80  $\mu\text{m}$ , este valor es menor (7  $\mu\text{m}$ ) al reportado por Núñez-Santiago *et al.*, (2004). Para el caso del APH se observó un promedio en el tamaño de partículas de 179 nm. Hasta ahora no se había reportado la obtención de nanopartículas usando solamente hidrólisis enzimática (Le Corre *et al.*, 2014). Para el APSH se observó un promedio de 99.50 nm valor menor al reportado por Kim *et al.*, (2008), la hidrólisis enzimática con ultrasonicación y obtuvo partículas no menores a 0.5 micras de almidón de arroz ceroso. El tamaño de las partículas de APSH se encuentra en el intervalo de tamaño de las partículas obtenidas por Haaj *et al.*, (2013) quienes obtuvieron nanopartículas usando ultrasonicación logrando un tamaño de partícula de 30 a 100 nm en almidón de maíz ceroso.



**Figura 7.** Distribución de tamaño de partícula de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado-hidrolizado (APSH).

Por otro lado, en la Figura 8 se observa que el AMN presenta una distribución unimodal con tamaños de partículas entre 2 a 5  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de partícula de 2.80  $\mu\text{m}$  valor que cae dentro del intervalo reportado (1-5  $\mu\text{m}$ ) por otros autores (Agama-Acevedo *et al.*, 2011;). Sin embargo, también han sido reportado tamaños de partículas con un promedio de 3 a 20  $\mu\text{m}$  (Aboubakar *et al.*, 2008), como resultado de la asociación de los gránulos (agregados), visibles mediante microscopía electrónica de barrido.

Para el AMH el promedio fue de 125.0 nm y en el AMSH se obtuvo un promedio del tamaño de partícula de 80.6 nm valores menores en comparación a los obtenidos a partir de almidón de plátano con los mismos tratamientos. Esto se puede atribuir al tamaño de los gránulos en estado nativo y a la composición química, principalmente al contenido de amilosa.



**Figura 8.** Distribución de tamaño de partícula de almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonificado-hidrolizado (AMSH).

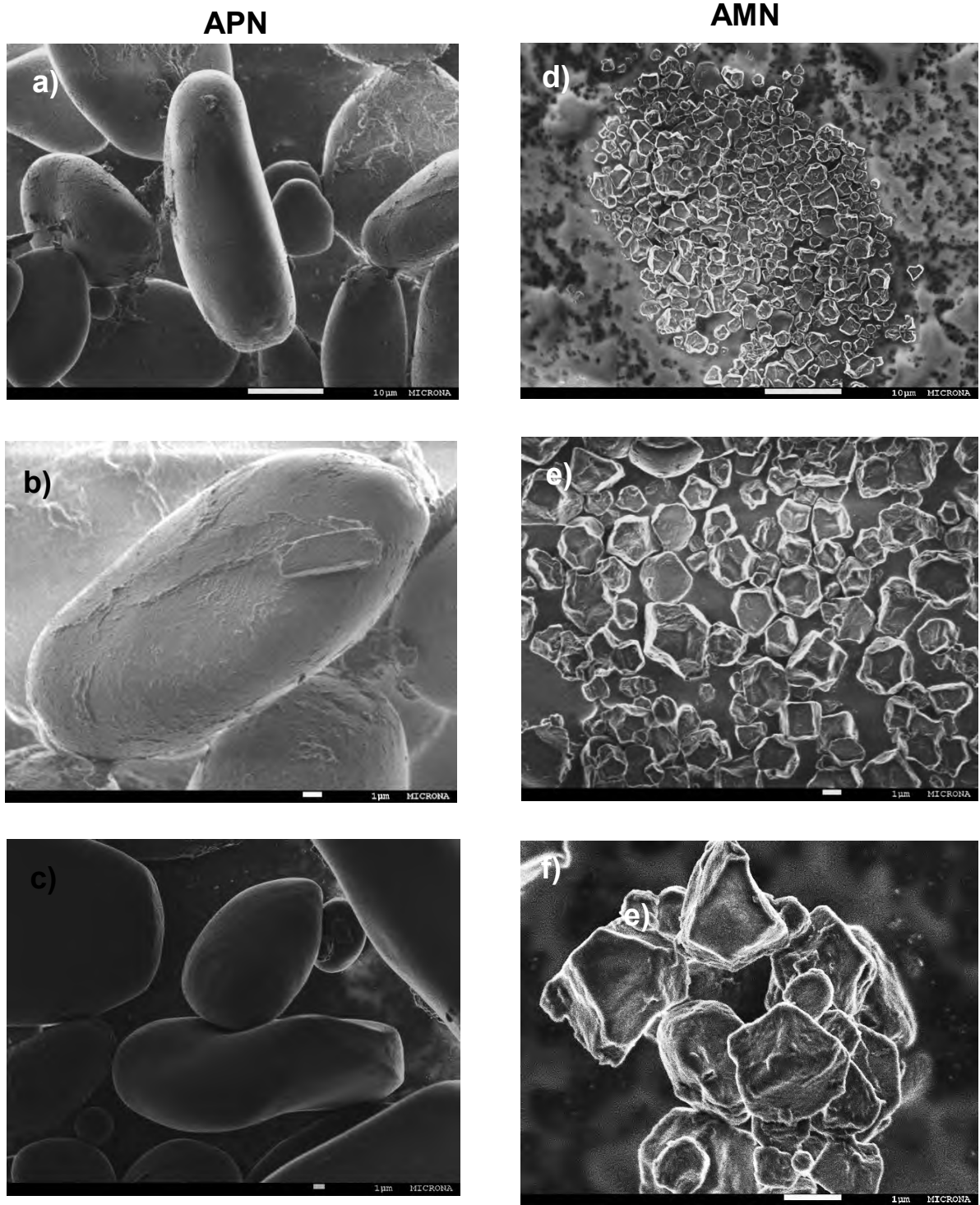
## 8.4 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM)

### 8.4.1 Almidón de plátano y malanga nativos

En la Figura 9 se muestran las imágenes del APN y AMN observadas a través de SEM. En ellas se puede observar para el caso del almidón de plátano una morfología característica (Figura 9a) de esta fuente botánica con gránulos ovalados o elípticos, alargados y planos con superficies lisas (Figura 9b y 9c). También se pueden observar residuos adheridos en la superficie del gránulo los cuales pueden ser residuos de proteínas y celulosa. Zhang *et al.*, (2005), reportaron una morfología muy similar en almidón de plátano de la misma variedad.

El AMN presentó, gránulos de tamaño irregular, de forma poligonal con una superficie de apariencia rugosa (Figura 9d), de un tamaño aproximado en su mayoría de 2  $\mu\text{m}$  semejantes en forma con lo reportado por Aboubakar *et al.*, (2008); y Agama-Acevedo

*et al.*, (2011) en almidón de malanga de la misma variedad. Sin embargo, la morfología del gránulo (Figura 9e y 9f) difiere con lo reportado por Perez *et al.*, (2005) y Mendoza-Castellanos, (2016), ya que ellos reportaron gránulos redondos/esféricos o en forma de cúpula y gránulos truncados. La diferencia en la forma depende de la biosíntesis del almidón, fisiología de la planta, y el tamaño depende del origen biológico (Deepika *et al.*, 2013).

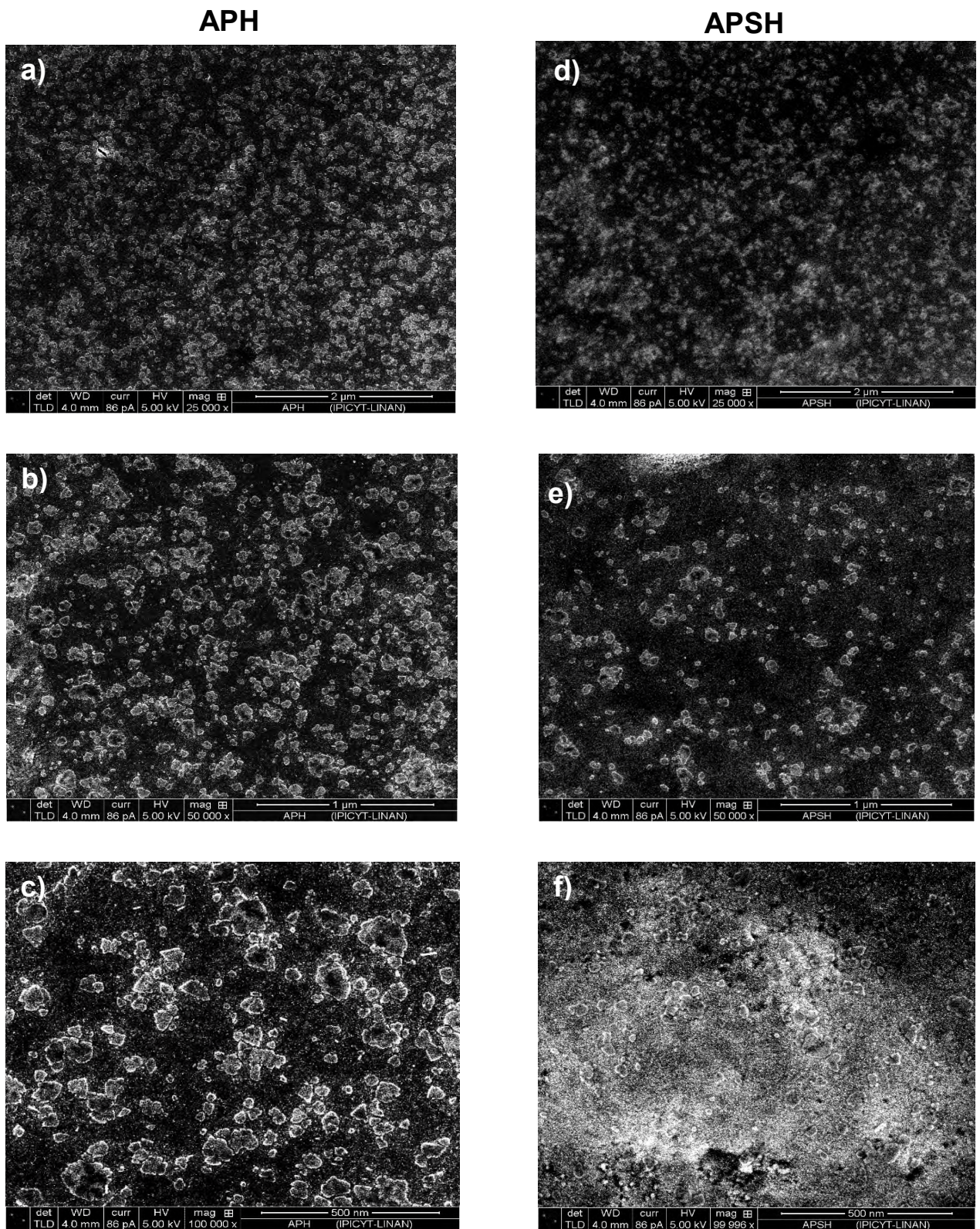


**Figura 9.** Microscopía Electrónica de Barrido del almidón de plátano nativo (APN) (a, b y c) y almidón de malanga nativo (AMN) (d, e y f).

#### 8.4.2 Almidón de plátano hidrolizado y sonificado-hidrolizado

La Figura 10 (a), (b) y (c) muestra las imágenes del APH. Los gránulos presentan una morfología muy diferente al de su estado nativo. Se observan gránulos fragmentados con bordes irregulares. Esta forma es atribuida al rompimiento de las regiones amorfas del gránulo por medio de la hidrólisis enzimática. La enzima penetró a través de los poros de los gránulos de almidón logrando un cambio en la morfología después de las 24 h del tratamiento generando partículas de diámetro mediano de 179 nm, más pequeñas ( $0.5 \mu\text{m}$ ) que las obtenidas por Kim *et al.*, (2008), utilizando almidón de maíz ceroso comercial; Samyang Genex Inc. (Seoul, Korea) con un contenido de amilosa del 70%. Esta diferencia en los tamaños generados después de la hidrólisis enzimática se pueden atribuir a varios factores como; fuente botánica del almidón, morfología, arreglo estructural, tamaño del gránulo y contenido de amilosa/amilopectina. Este último es importante ya que esta enzima es selectiva y rompe específicamente los enlaces  $\alpha$  1-4 que unen a las cadenas de amilosa y puntos específicos de amilopectina (Banik *et al.*, 2003).

Los poros de la superficie y los canales interiores de los gránulos de almidón nativo son aberturas externas de origen natural (Gallant *et al.*, 1997). En la Figura 10 (d), (e) y (f) se muestra la micrografía realizada al APSH en la cual se puede observar que hubo una reducción de tamaño en comparación con el almidón hidrolizado esto es atribuido a que el pre tratamiento con ultrasonido en solución acuosa, provocó fracturas a la pared del gránulo, haciendo más grandes los poros naturales de los gránulos de almidón (Sujka y Jamroz, 2013) lo que permitió que la enzima penetrara fácilmente en el gránulo, degradando así las cadenas poliméricas y generando partículas de tamaño más homogéneo.



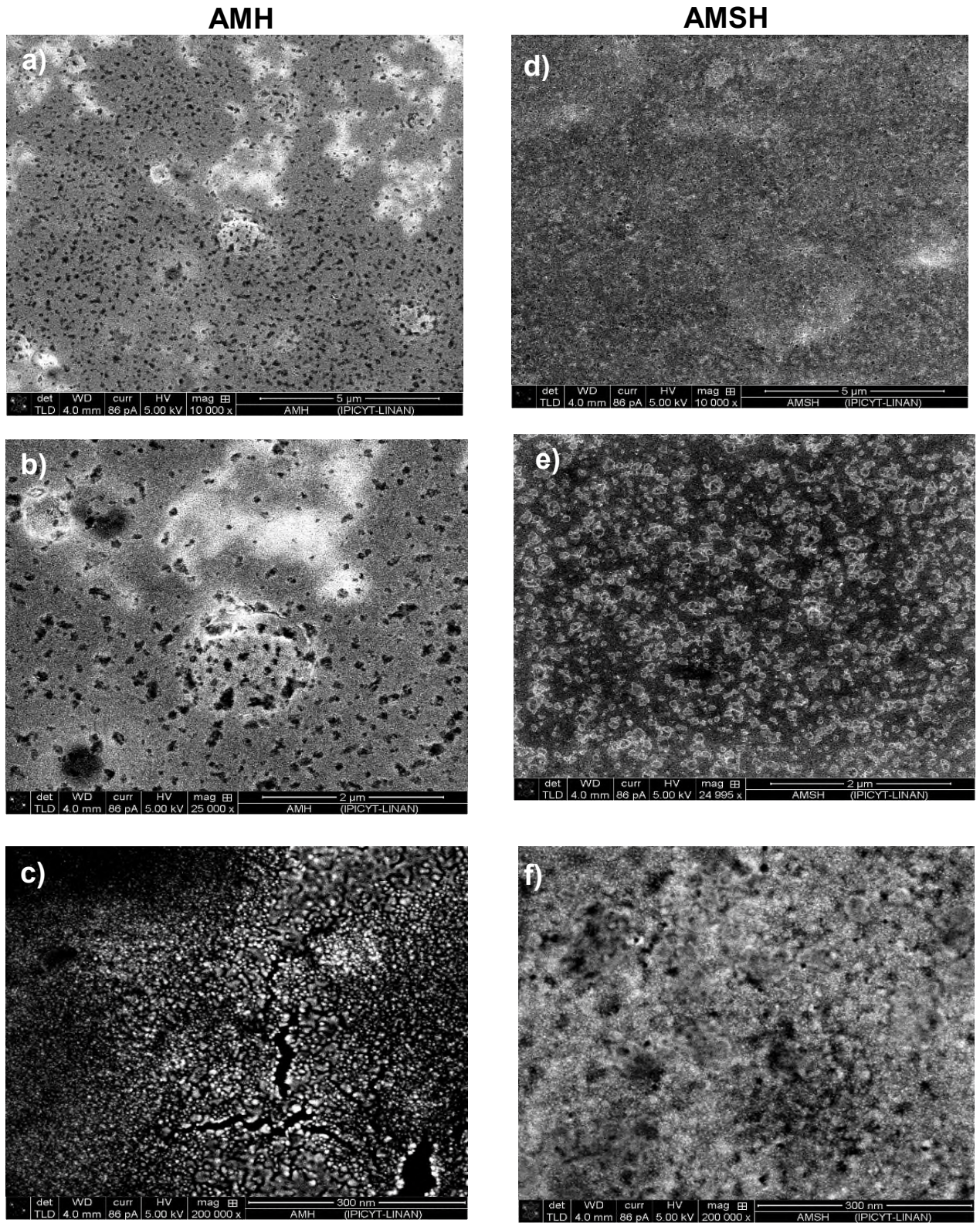
**Figura 10.** Microscopía Electrónica de Barrido del almidón de plátano hidrolizado (APH) (a, b y c) y almidón de plátano sonificado hidrolizado (APSH) (d, e y f).

### 8.4.3 Almidón de malanga hidrolizado y sonificado hidrolizado

En la Figura 11 (a), (b) y (c) se muestran las micrografías del AMH. Los gránulos presentan una forma y tamaño irregulares, esta forma es atribuida al rompimiento de las regiones amorfas del gránulo por medio de la hidrólisis enzimática.

Por otro lado la morfología del AMSH mostrada en la Figura 11 (d), (e) y (f) presenta estructuras poligonales y con un tamaño aproximado de 50 y 100 nm. La disminución de tamaño de este en comparación con el almidón que solo fue tratado con hidrólisis enzimática, se debió probablemente al daño causado a la superficie de los gránulos debido a la cavitación, ya que genera gradientes de alta presión y con ello fuerzas de cizalla que hicieron pequeñas fracturas. (Haaj *et al.*, 2013) y (Brenner *et al.*, 2016) la enzima se difundió a través de estos canales y causó la reducción en el tamaño del gránulo (Kim *et al.*, 2008).

Estos resultados muestran claramente la obtención de partículas con menor tamaño al asistir la hidrólisis enzimática con ultrasonificación.

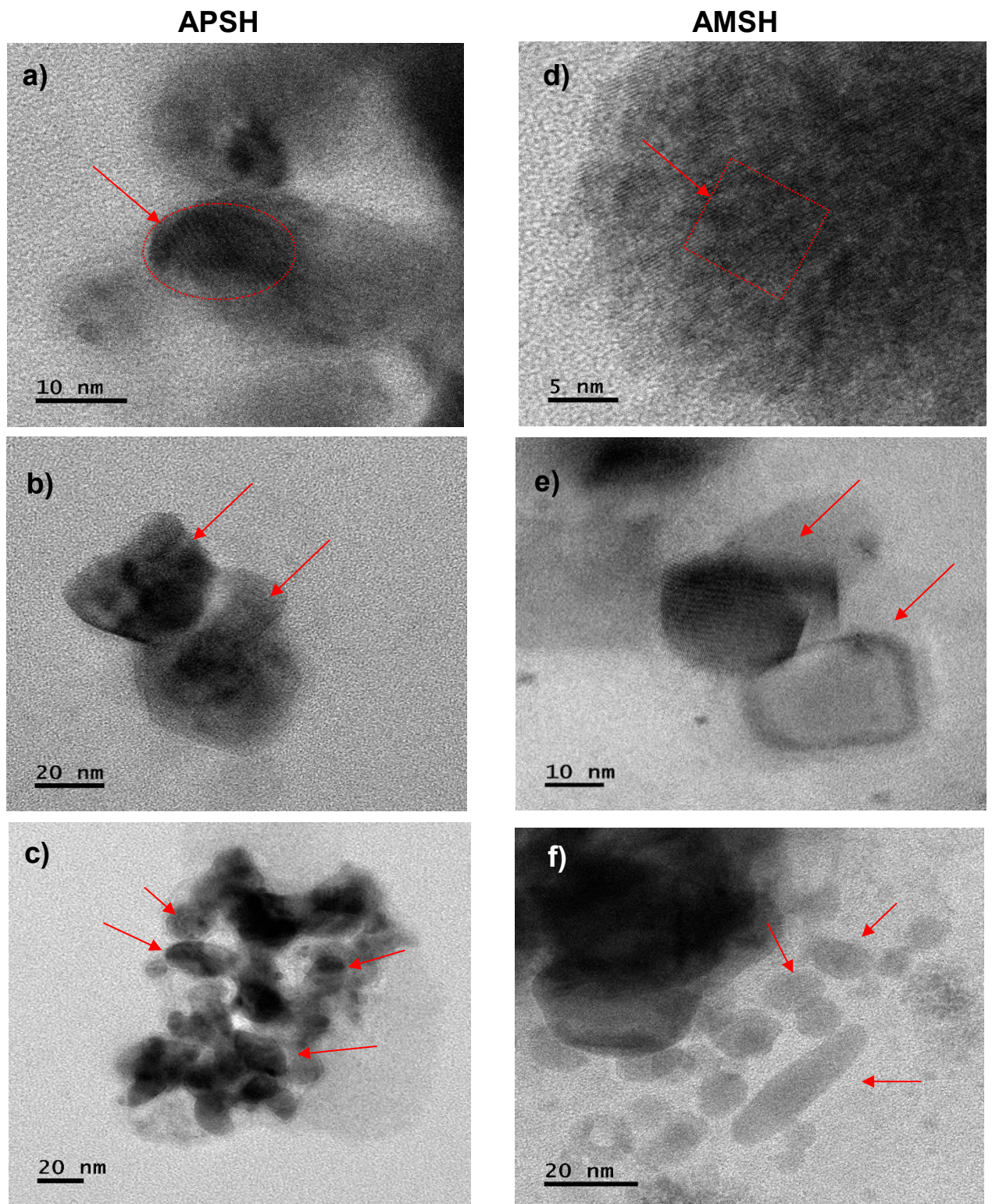


**Figura 11.** Microscopía Electrónica de Barrido del almidón de malanga hidrolizado (AMH) (a, b y c) y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH) (d, e y f).

## 8.5 Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 12 se muestran las micrografías de TEM del almidón de plátano y malanga que fueron sometidas al proceso de sonicación y posteriormente hidrolizadas. Las micrografías de TEM para el almidón de plátano sonicado e hidrolizado (APSH) se muestran en las imágenes 12 (a), (b) y (c), en ellas se puede apreciar la presencia de pequeños agregados de formas irregulares (Figura 12b) y en algunos casos de tipo ovoide o esférico (12<sup>a</sup> y 12c). Estos agregados están conformados por pequeñas partículas del almidón que fueron sonicados e hidrolizados. Un comportamiento muy similar encontró Valodkar y Thakore, (2011). En un proceso de obtención de nanopartículas de almidón (maíz normal, frijol y maíz waxy) Kim *et al.*, (2012) propusieron que estos agregados pueden corresponder a pequeños bloques constituidos de fragmentos del almidón hidrolizado y que estos fragmentos tienden a reorganizarse en lamelas amorfas y lamelas cristalinas tal como puede observarse en la Figura 12a. Por otro lado, en un estudio sobre el proceso de obtención de nanocristales de almidón de maíz Gong *et al.*, (2016) describieron que son el subproducto de degradación insolubles de los gránulos de almidón y presentan morfologías de tipo plaquetas, redondas, cuadradas y ovaladas, con presencia de rejillas cristalinas bien definidas muy similares a las que se pueden apreciar en este estudio (Figura 12a y 12d), para ambas muestras (APSH y AMSH). En estas pueden observarse franjas en forma de rejillas con diferente orientación, cada una de las regiones corresponde a una lámina cristalina que constituye las regiones cristalinas de los anillos de crecimiento semicristalino (Cuthbert *et al.*, 2017).

Las micrografías del almidón de malanga sonicado e hidrolizado (AMSH) presentan en las Figuras 12(d), (e) y (f) una morfología muy diferente en comparación a las imágenes del APSH, ya que en algunos casos se puede observar la presencia de partículas dispersas (Figura 12d) y en otros casos la formación de agregados con una morfología bien definida en forma de cuña (Figura 12e), o bien de forma ovoide y óvalos alargados (Figura 12f).



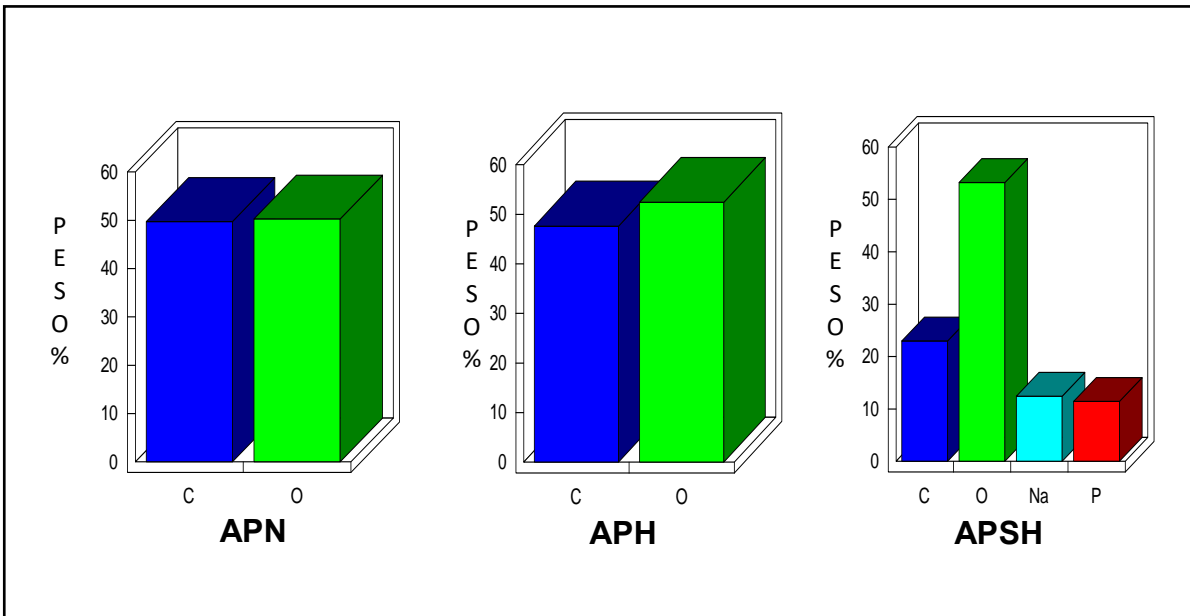
**Figura 12.** Microscopía Electrónica de Transmisión del almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSH) (a, b y c) y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH) (d, e y f).

Los tamaños de los agregados son de mayor tamaño en comparación al APSH. Esto puede ser debido a que el proceso de hidrólisis fue más severo en el caso del almidón de malanga debido al tamaño de partícula que presenta en su estado nativo lo cual facilita el proceso de hidrólisis enzimática obteniendo con esto fragmentos más pequeños, los cuales tienen a reorganizarse con más facilidad (Cuthbert *et al.*, 2017). Tal como se observó en los resultados de distribución de tamaño de partícula, en donde el almidón de malanga presenta un tamaño de partícula menor (50 a 130 nm) en comparación con el de plátano el cual presenta un tamaño de partícula entre 120 a 250 nm.

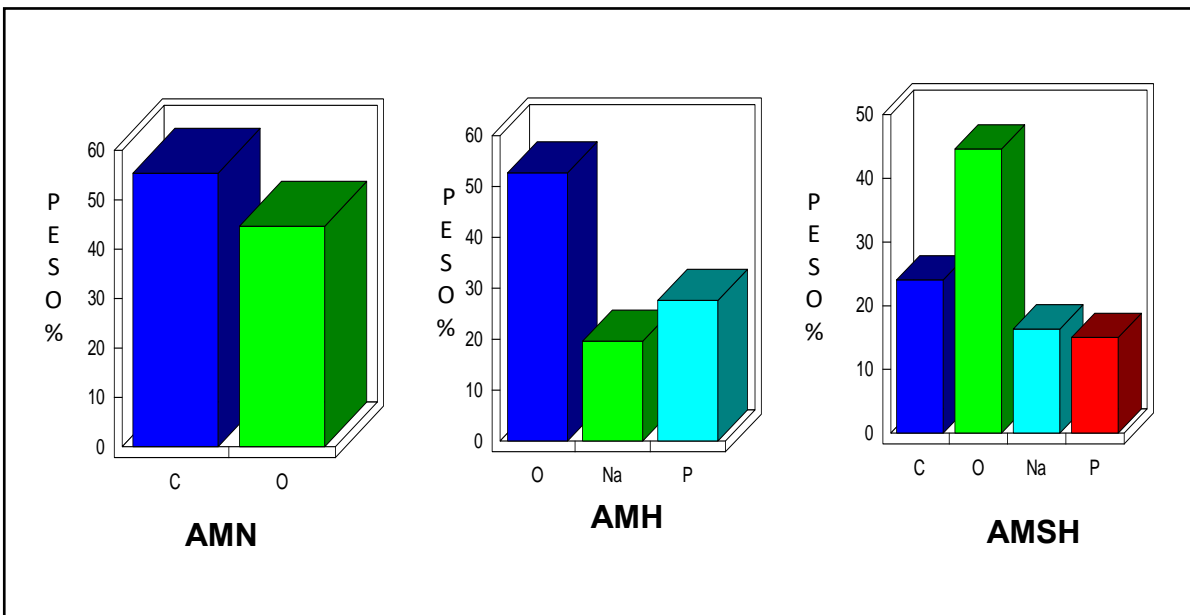
### **8.6 Espectrometría de dispersión de energía de Rayos X (EDS)**

Las muestras control (APN y AMN) y tratadas (APH, APSH, AMH y AMSH) fueron analizadas por EDS, con la finalidad de evaluar y comparar la composición de los residuos del almidón y su contraparte (APN) después del proceso de sonicación e hidrólisis enzimática. Estos resultados se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente. La composición elemental para los almidones nativos (APN y AMN) fue muy similar con presencia de carbono y oxígeno con una diferencia en peso de ambos componentes a favor del APN. Recientemente, Pelissari *et al.*, (2017) reportaron la presencia de estos mismos elementos (C y O) en nanocompuestos a base de almidón de plátano (*Musa paradisiaca*) y celulosa. Como se esperaba estos elementos se encuentran presentes en los almidones nativos de cualquier fuente botánica aun después del proceso de hidrólisis.

Por otro lado, también fueron detectadas pequeñas cantidades de sodio y fósforo en APSH (Figura 13), AMS y AMSH (Figura 14). La presencia del sodio y fósforo es debida al hecho que estos elementos fueron adicionados en la solución reguladora para lograr la estabilidad de la enzima antes del proceso de hidrólisis. Baskar *et al.*, (2015) reportaron también la presencia de fósforo y otros elementos más (C, O, Si, K y Fe) en un estudio para evaluar de caracterización de  $\alpha$ -amilasa como nanobiocatalizador para la hidrólisis del almidón de papa dulce.



**Figura 13.** Análisis de EDS para el almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonificado e hidrolizado (APSH).



**Figura 14.** Análisis de EDS para el almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonificado e hidrolizado (AMSH).

Choudhury *et al.*, (2012) reportaron la presencia de sales de carbono, oxígeno y NaCl por EDS en un estudio sobre el patrón de formación de geles de almidón-NaCl secado sobre diferentes superficies. La alteración del almidón de un estado amorfo a un estado

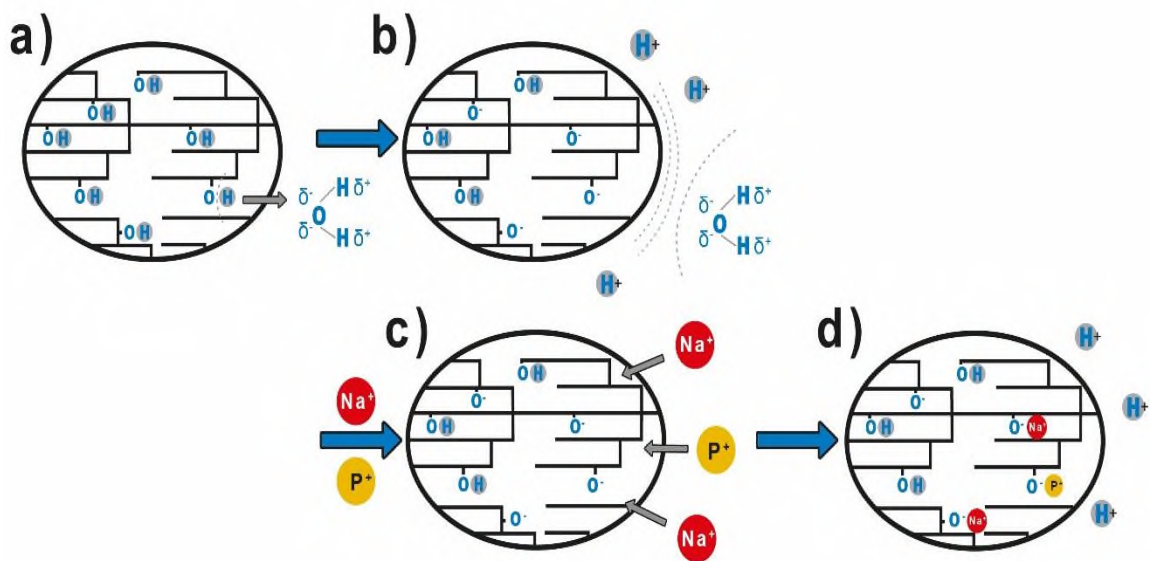
más ordenado o cristalino después de un proceso de gelatinización y almacenamiento, se define como de retrogradación del almidón o reorganización (Liu *et al.*, 2007). Diferentes investigaciones (Biliaderis *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 2011) han demostrado que la reorganización de los componentes del almidón (amilosa-amilopectina) dependen del contenido de agua y algunos ingredientes adicionados como pueden ser: lípidos, azúcar y NaCl.

Khairy *et al.*, (1963) y Beck *et al.*, (2011) ilustraron en una investigación sobre el efecto de diferentes iones (LiCl, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y NH<sub>4</sub>Cl) en la recristalización del almidón y el papel que estos juegan afectando algunas propiedades como el hinchamiento (osmótico y liotrópico), solubilidad, transición térmica. Ellos mencionan que el índice de solubilidad y retrogradación del almidón se ve afectada dependiendo de la naturaleza de sal agregada. Por ejemplo; cationes como el Li<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup> y Ca<sup>+2</sup> proporcionan baja solubilidad del almidón reducen en gran medida la retrogradación, por el contrario, cationes como el K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> proporcionan alta solubilidad del almidón no reducen la retrogradación. Por lo tanto, puede inferirse que si solubilidad del almidón es alta esto facilitara la reorganización o re-asociación de sus componentes (amilosa-amilopectina-sal). Esto puede ser descrito como siguiente: el catión sódico es el contra ión del anión del cloro y viceversa para mantener la neutralidad eléctrica. En la serie de Hofmeister, se da el orden de los cationes de la siguiente forma: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> > Mg<sup>+2</sup> > Ca<sup>+2</sup> > HNC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Hofmeister, 1888). Los primeros miembros (de izquierda a derecha) aumentan la tensión superficial del disolvente, por lo tanto, disminuyen la solubilidad de las moléculas como proteínas y polisacáridos. A este fenómeno se le conoce como: "salting out". Por el contrario, los miembros de la derecha como la Guanidina (HNC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), aumentando la solubilidad de macromoléculas y se le conoce como; salting in, aumentan la solubilidad de las moléculas.

Por otro lado, también se ha reportado la presencia de fosfatos, unidos a la molécula de almidón de papa en comparación con otras fuentes botánicas. La presencia del fósforo (P) proporciona un carácter ligeramente aniónico, alto poder de hinchamiento, temperatura de gelatinización relativamente baja (alrededor de 60°C) y alta viscosidad (Singh *et al.*, 2003; Chuang *et al.*, 2015).

Los resultados de EDS sobre los almidones hidrolizados-sonicados muestran que tanto las especies iónicas de las sales utilizadas pueden permanecer aun después de los

lavados. En la Figura 15 se ilustra el mecanismo de reacción, en el cual se muestra la concentración de iones de hidrógeno (gris) dentro de los gránulos de almidón, a) cuya concentración es más alta que en la fase acuosa. Al momento de la licuefacción, los iones de hidrógeno migraron del almidón a la fase acuosa debido al gradiente de concentración. b) La carga de almidón se volverá negativa y la fase de agua positiva. Por lo tanto, la acumulación de iones de hidrogeno a partir de la molécula de almidón en la fase acuosa se reducirá a un equilibrio en última instancia dinámico. c) Debido al potencial, el almidón tiende a empujar los cationes con una mayor densidad de carga (Na; rojo y P; amarillo) al almidón (d).



**Figura 15.** Esquema del mecanismo de reacción, para ilustrar la interacción de los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{P}^+$ ) con el almidón. Fuente: adaptado de (Beck *et al.*, 2011).

### 8.7 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier

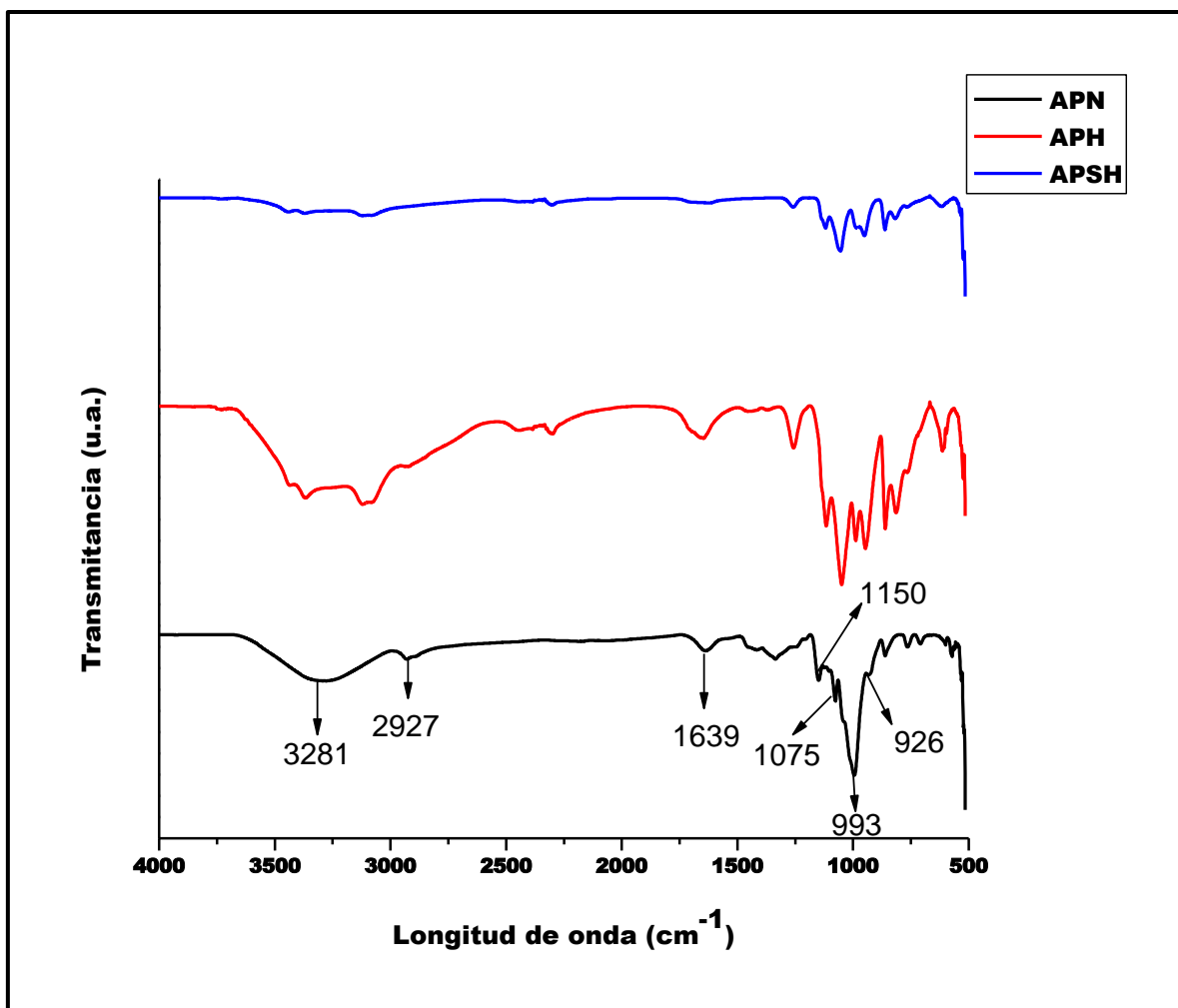
Las muestras de APN, APH y APSH fueron caracterizadas por FTIR, sus espectros de absorción se muestran en la Figura 16. La muestra de APN presentó una banda ancha en el intervalo de  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  misma que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilos (-OH) y al agua libre los cuales contribuyen en las interacciones inter e intra molecular de los OH en la estructura del almidón. Esta es una característica particular que presentan la estructura de los almidones (Fang *et al.*,

2002). El pico que aparece alrededor de  $2927\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de alargamiento del hidrógeno con respecto al enlace carbono (C-H) asociados con el anillo de la glucopiranososa). La señal de vibración del grupo OH correspondiente al agua absorbida se observa a  $1639\text{ cm}^{-1}$ . Las señales de vibración en el intervalo  $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los enlaces C-H.

En la región conocida como la huella dactilar se observan picos característicos del almidón en  $993\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de las uniones  $\alpha\text{-}1\text{-}4$  (–C-O-C–) de la glucopiranososa y picos en el intervalo de  $571\text{-}926\text{ cm}^{-1}$  atribuidos al enlace  $\alpha\text{-}1\text{-}6$  y al anillo piranososa. Estos resultados de infrarojo son similares a los reportados por otros investigadores (Mano *et al.*, 2003; Goheen y Wool.,1991., Lammers *et al.*, 2009; Kacurakova y Wilson, 2001).

Con respecto al espectro de APH se pueden ver importantes cambios en las señales observadas inicialmente en el almidón nativo (APN). En comparación con el almidón nativo, la señal entre  $3000\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  corresponde a aminas primarias y secundarias aportadas por la enzima quedando traslapados en este mismo intervalo la señal de vibración de los hidroxilos. La señal a  $2927\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los metilenos asociados al anillo de la glucopiranososa disminuye en comparación con respecto al espectro de APN. La señal de vibración  $1639\text{ cm}^{-1}$  asociada al agua se hace más intensa. Las señales correspondientes al enlace C-O de  $993\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  se hacen más intensas en comparación con el APN. En la literatura se ha reportado que las bandas a  $993$  y  $1075\text{ cm}^{-1}$  están asociadas a la estructura amorfa y cristalina del almidón, respectivamente (Sevenou *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015). Los resultados de los espectros FTIR sugieren que APH es más hidrofílico y más cristalino como resultado del proceso de la obtención de las nanopartículas. Además, se puede concluir la degradación del almidón fue causada por la hidrólisis.

Para el caso del espectro del APSH se puede observar que hay cambios significativos en comparación con los espectros de APN y APH, por ejemplo, las señales de vibración en el intervalo de  $3000$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  son muy débiles y de igual forma para el resto de las señales. Esto significa que hubo una degradación mayor de los gránulos de almidón al aplicar la ultrasonicación.



**Figura 16.** Espectros de FTIR de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH), almidón de plátano sonificado - hidrolizado (APSH).

Con respecto al análisis de FTIR para el AMN, AMH y AMSH, los espectros se muestran en la Figura 17. El espectro correspondiente a la muestra de AMN presentó una banda ancha en  $3300\text{ cm}^{-1}$  como consecuencia de las vibraciones de estiramientos de los enlaces hidroxilos (O-H) presentes en la molécula de almidón. Esto es debido a la estructura compleja asociada a la unión de grupos hidroxilos libres, inter e intramoleculares, que conforman la estructura del almidón en estado nativo. El pico observado a  $2927\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de los enlaces C-H de los grupos metilenos. La señal de vibración de deformación del agua se observa a  $1644\text{ cm}^{-1}$ , lo que puede estar relacionado con la presencia de agua fuertemente unida al almidón (Alexander, 1992; Jiang *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2004)

Las señales en el intervalo de  $926\text{-}1415\text{ cm}^{-1}$ , son atribuidas a las vibraciones de estiramientos de los enlaces C-O, C-C, C-O-H y C-H. También es interesante observar

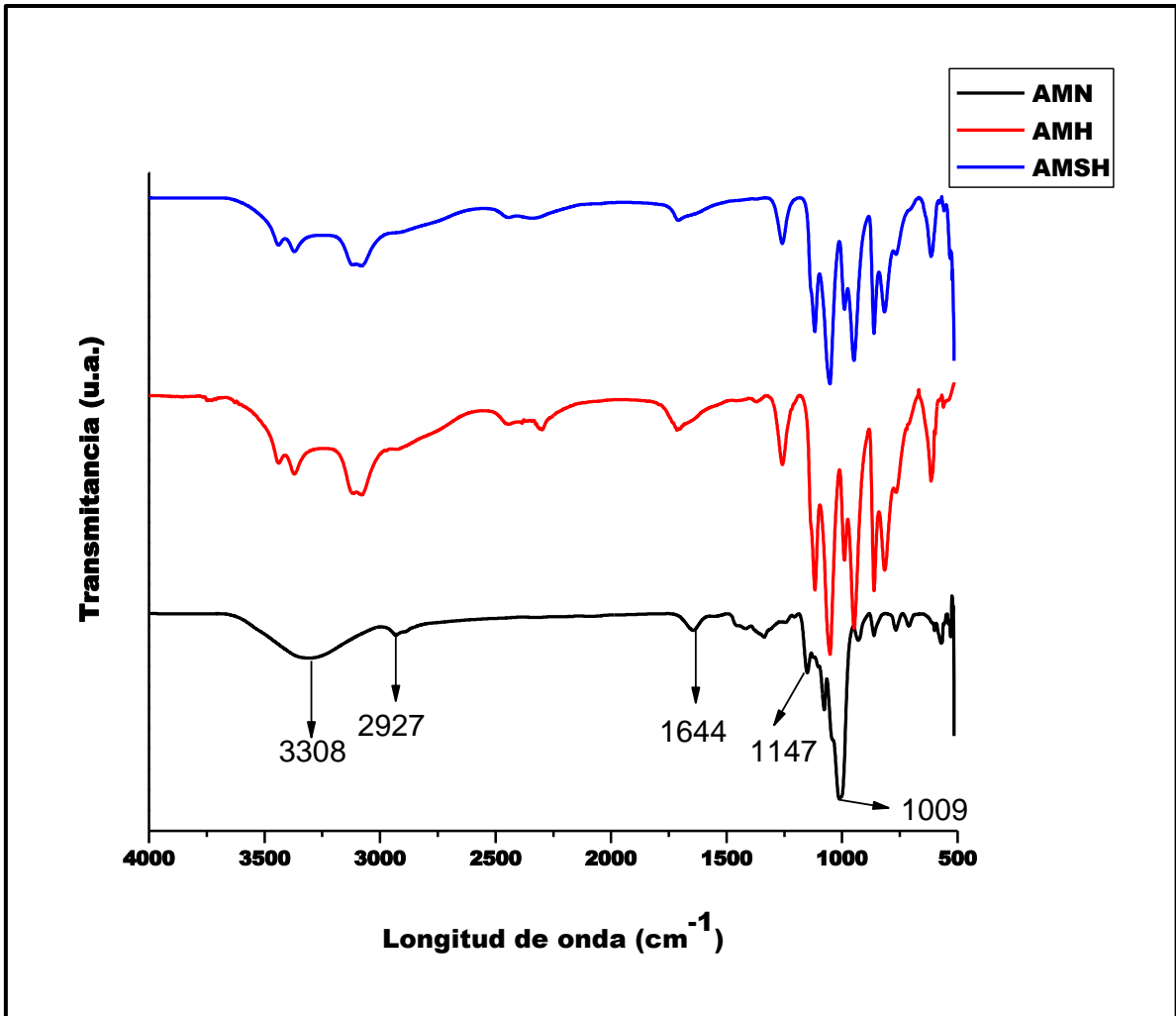
que los almidones nativos tienen una banda prominente a  $926\text{ cm}^{-1}$ , esta señal es sensible al agua y es el índice característico de hidrofiliidad de los almidones tal como se ha reportado en la literatura (Fang *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2014).

La literatura sugirió que los iones de sodio forman complejos en coordinación con grupos de carbohidratos a través de la unión electrostática a grupos hidroxilo o la participación de orbitales de un solo par de electrones de átomos de oxígeno. El efecto del cloruro de sodio y sus interacciones con las moléculas de almidón y agua se pudieron observar dentro del número de onda de  $946$  y  $1158\text{ cm}^{-1}$  (Chuang *et al.*, 2015).

Con respecto al espectro del AMH se pueden observar cambios importantes con respecto al espectro del AMN. Por ejemplo, las señales de  $859$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$  en comparación con almidón nativo se hacen más intensas. De igual forma la señal a  $2927\text{ cm}^{-1}$  disminuye su intensidad, esta corresponde a la vibración del alargamiento del hidrógeno con respecto al enlace carbono (C-H) asociados con el anillo de la glucopiranososa. La señal de vibración de deformación del agua aumenta en intensidad esto se observa a  $1639\text{ cm}^{-1}$ .

Las señales de vibración en el intervalo de  $3000$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  corresponde a aminas primarias y secundarias aportadas por la enzima quedando traslapados en este mismo intervalo los hidroxilos. Cabe mencionar que las bandas a  $1075$  y  $993\text{ cm}^{-1}$  están asociadas a la estructura ordenada y amorfa del almidón, respectivamente tal como se ha reportado en la literatura (Sevenou *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015).

Los resultados de los espectros FTIR sugieren que el AMH es más hidrofílico en comparación con el AMN además de presentar un arreglo más cristalino. Esto como resultado del proceso de hidrólisis seguido para la obtención de las nanopartículas, además de observarse claramente la degradación del almidón causada por el tratamiento.



**Figura 17.** Espectros de FTIR de almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH), almidón de malanga sonicado - hidrolizado (AMSH).

Para el caso del espectro del AMSH en comparación con el AMH se puede observar que no hay cambios significativos en las señales, esto sugiere que la degradación de los gránulos del almidón fue muy parecida para ambos casos.

### 8.8 Difracción de Rayos X

El patrón de difracción de Rayos X obtenido para APN, APH, APSH, se muestran en la Figura 18, en la cual se observa un patrón de difracción tipo C para el APN el cual es una mezcla del tipo A y B. Varios autores reportan diferentes patrones de difracción como es el caso de Bello Pérez *et al.*, (2000) quienes reportan un patrón de difracción

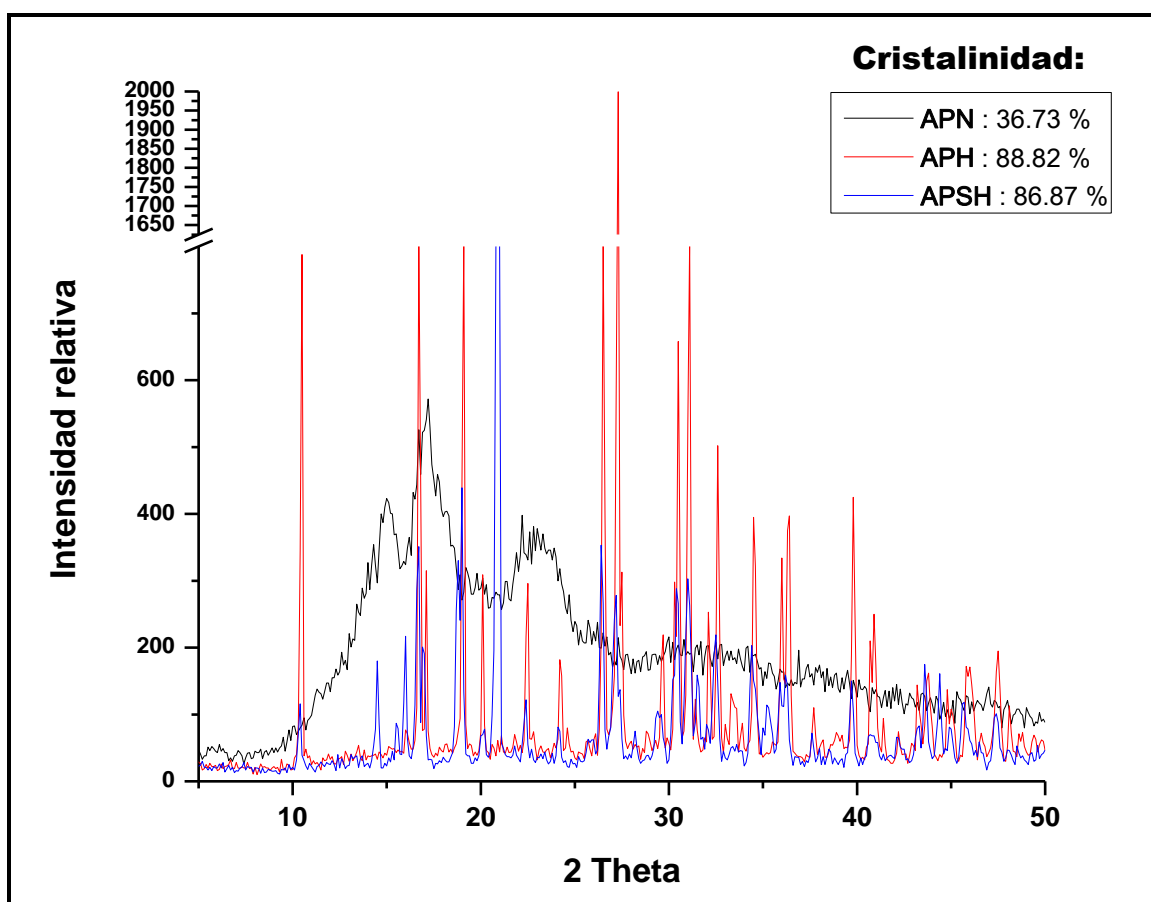
tipo A para el plátano macho mientras que Amaya *et al.*, (2011), reportaron un patrón de difracción de tipo B para el mismo caso, esto puede deberse a las condiciones ambientales del cultivo. En la naturaleza el almidón es semicristalino con niveles de cristalinidad diferentes, valores que van de 15 al 45% dependiendo del origen y la técnica utilizada para el aislamiento (Tester *et al.*, 2006).

Cuando el tamaño de partícula disminuye, la intensidad de los picos y patrón difracción de rayos X del almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSH), también cambia en comparación al APN. Presentando picos muy finos o estrechos y con mayor intensidad. Esto indica que, durante la hidrólisis del almidón, las regiones amorfas (menos ordenados) se hidrolizan más rápida y fácilmente que las regiones cristalinas (más ordenadas) del gránulo (Oates, 1997; Tester *et al.*, 2004; You and Izydorczyk, 2007; Kim *et al.*, 2008). Por otro lado, al combinar la hidrólisis enzimática/ultrasonido es más efectiva para generar nanopartículas de almidón (Liu *et al.*, 2009) de menor tamaño y con mayor cristalinidad (de acuerdo a los patrones de Rayos X). Esto debido al ordenamiento molecular de las cadenas de amilosa y amilopectina con los iones de sales residuales ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), lo cual generó un mejor arreglo cristalino. El grado de cristalinidad de un almidón está relacionado con el grado de orden molecular de sus cadenas. Sin embargo, se ha reportado (Hee-Young, 2013) que el uso de ultrasonido por si solo genera pérdida de la cristalinidad de los gránulos de almidón.

Se observó un cambio significativo en los patrones de difracción del APH y el APSH dejando mostrar un incremento en la cristalinidad y que el almidón ya ha sufrido modificación en su arreglo estructural provocado por el tratamiento de hidrólisis enzimática y la asistencia con el ultrasonido.

La cristalinidad calculada para el APN fue de 36.73% valor mayor (19.40%) al reportado por Rivas-González *et al.*, (2008). Así mismo para el caso del APH la cristalinidad fue de 88.82% y para el APSH de 86.87% dejando ver un aumento significativo en comparación con APN. Una explicación del aumento en la cristalinidad observada en los almidones hidrolizado, e hidrolizado-sonicado es que durante la hidrólisis pudo ocurrir degradación o despolimerización (Kuakpetoon y Wang, 2001). Esto permite obtener cadenas lineales de amilosa que se reorganizan en una estructura ordenada,)

debido a que las cadenas lineales de la amilosa principalmente se unen a través de puentes de hidrógeno formando estructuras mejor ordenadas, por lo que a mayor contenido de amilosa o cadenas cortas mayor interacción (Morrison *et al.*, 1993; Raja, 1994; Hyun-Jung y Quian, 2009; Shifeng *et al.*, 2009). La diferencia obtenida en el porcentaje de cristalinidad del APH y APSH pudo deberse a que, según lo reportado por Kim *et al.*, (2013) la ultrasonicación a menudo interrumpe la estructura cristalina del almidón.

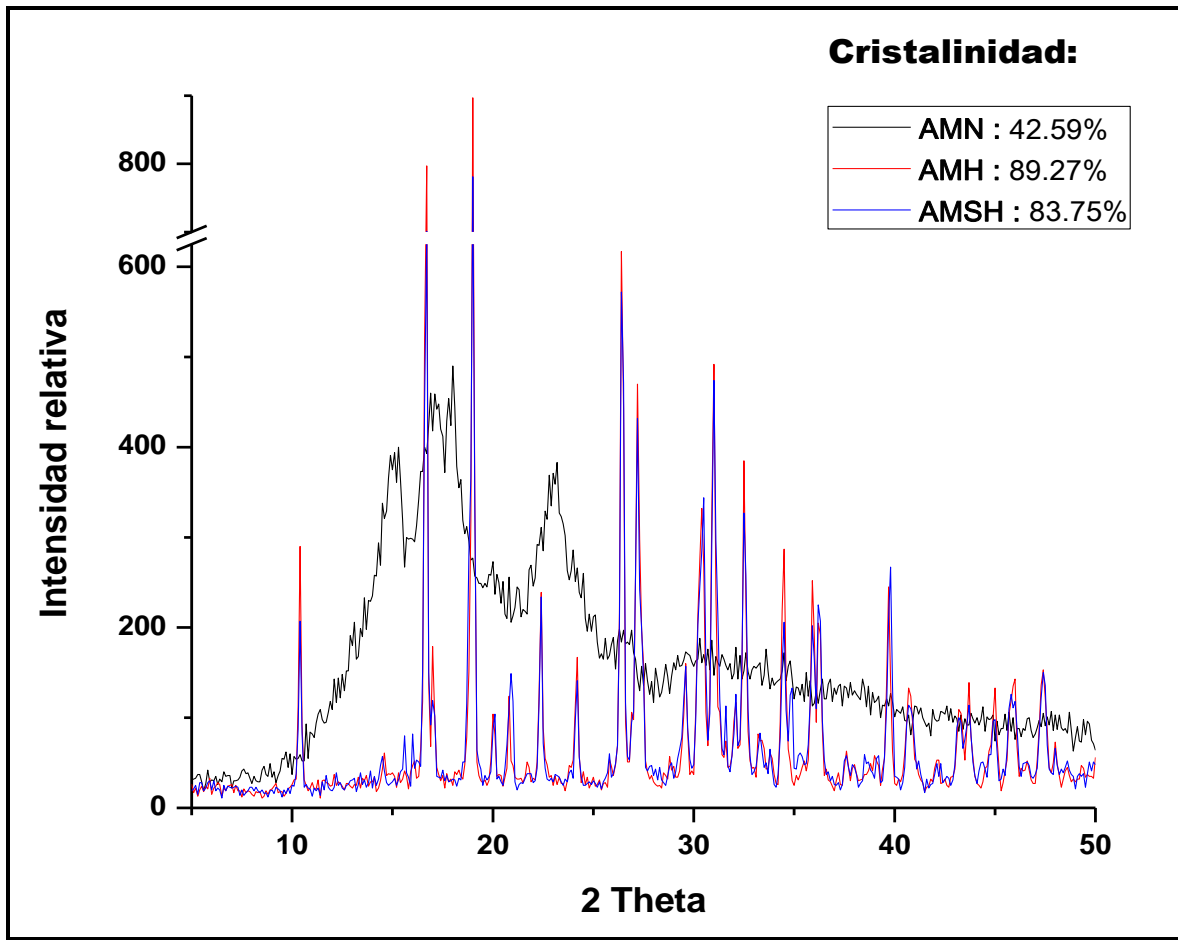


**Figura 18.** Patrones de difracción de rayos X de almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH) y almidón de plátano sonicado hidrolizado (APSH).

El patrón de difracción de Rayos X obtenido para AMN, AMH, AMSH se muestra en la Figura 18, en la cual se observa un patrón de difracción tipo C para el AMN el cual es una mezcla del tipo A y B. Otros autores han reportado que el almidón de malanga presenta un patrón de difracción tipo A (Agama-Acevedo *et al.* 2011; Zeng *et al.* 2014).

El AMN presentó el mismo comportamiento que en el caso del APN. Cuando el tamaño de partícula disminuye, la intensidad de los picos característicos del almidón se pierden y aparecen nuevos picos con mayor intensidad, esto se puede corroborar al comparar el porcentaje de cristalinidad del AMN con el AMH y AMSH. El aumento en la cristalinidad puede ser debido a un mejor arreglo estructural provocado por el tratamiento de hidrólisis enzimática/ultrasonido y iones de ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), tal como en el caso anterior. La cristalinidad calculada para el AMN fue de 42.59% valor mayor al 38.2% reportado por Agama-Acevedo *et al.* (2011), y mayor a lo reportado por Himeda *et al.* (2012) (27%). Las diferencias en el grado de cristalinidad están influenciadas principalmente en la cantidad de regiones cristalinas (contenido de amilopectina y la longitud de la cadena de amilopectina) presentes en el almidón de malanga, así mismo para el caso del AMH la cristalinidad fue de 89.27% y para el AMSH de 83.75% dejando ver un aumento significativo en comparación con AMN. Una explicación del aumento en la cristalinidad observada en los almidones hidrolizado, e hidrolizado-sonicado es que durante la hidrólisis pudo ocurrir un cierto grado de despolimerización (Kuakpetoon y Wang, 2001).

Esto permite obtener cadenas lineales de amilosa que se rearreglan en una estructura ordenada (Morrison *et al.*, 1993; Raja, 1994). La diferencia obtenida en el porcentaje de cristalinidad del AMH y AMSH pudo deberse a que, según lo reportado por Kim *et al.*, (2013) la ultrasonicación a menudo interrumpe la estructura cristalina del almidón. Es importante resaltar que la intensidad de los picos alcanzada por las muestras de APSH y AMSH fueron distintas entre sí, esto debido a las diferencias en tamaño que tienen los almidones en estado nativo tal como lo pudimos ver en los análisis de distribución de tamaño de partícula, realizados a las muestras y de acuerdo a lo reportado por Núñez-Santiago *et al.*, (2004) y por Agama-Acevedo *et al.*, 2011; respectivamente, así como el efecto de la composición química y estructural de los mismos.



**Figura 19.** Patrones de difracción de Rayos X de almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH) y almidón de malanga sonicado hidrolizado (AMSH).

### 8.9 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Las muestras (APN, APH, APSH, AMN, AMH y AMSH) fueron analizadas por CDB para evaluar las temperaturas de gelatinización: temperatura inicial ( $T_i$ ), temperatura pico ( $T_p$ ), temperatura final ( $T_f$ ) y entalpía ( $\Delta H$ ) de la misma con la finalidad de poder observar cambios relacionados con el efecto de los tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras. En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos.

**Cuadro 4.** Temperaturas ( $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$ ) y entalpía de gelatinización ( $\Delta H$ ) del almidón de plátano nativo (APN) y malanga nativa (AMN)\*.

Fuente de almidón	$T_i$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
APN	67.15 ± 0.49b	72.08 ± 0.14b	78.03 ± 0.52b	12.07 ± 0.25b
AMN	77.44 ± 0.35a	82.27 ± 0.44a	87.75 ± 0.54a	15.78 ± 0.39a

\*Promedio de tres repeticiones ± error estándar

Las letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

$T_i$  = Temperatura de inicio de la gelatinización.

$T_p$  = Temperatura de gelatinización

$T_f$  = Temperatura final de gelatinización

$\Delta H$  = Entalpía de gelatinización.

El APN presentó temperaturas de gelatinización que se encuentran en el intervalo de valores reportados (70.38, 76.15 y 85.92 °C y 11.05 J/g) por Amaya *et al.*, (2011). Sin embargo, Carmona-García *et al.*, (2009) reportaron valores ( $T_i$ = 72.4 °C,  $T_p$  de 78.4 °C,  $T_f$  de 89.2 °C) menores de  $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$  y un valor ( $\Delta H$ = 12.07 J/g) para la entalpía de gelatinización.

En el caso del AMN este presentó valores de temperaturas más altos, en comparación con el APN. Mendoza- Castellanos *et al.*, (2016) reportaron valores de  $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$  mayores (66.52, 71.12 y 78.28 °C respectivamente) con un valor de entalpía menor (9.73 J/g). Mweta *et al.*, (2010) realizaron un estudio sobre el aislamiento y caracterización de almidones de malanga (*Colocasia esculenta*) cultivados en diferentes regiones. Ellos reportaron intervalos de valores de  $T_i$ ,  $T_p$  y  $T_f$  de 61.8-75.6 °C,

69.4 - 78.7 °C y 78.6 - 83.7 °C con entalpías de gelatinización de 8.2 - 14.7 J/g. respectivamente. Los valores encontrados en esta investigación se encuentran en el intervalo de valores reportados para temperaturas y entalpia de gelatinización.

En el caso de las demás muestras (APH, APSH, AMH y AMSH) no presentaron las temperaturas de gelatinización ( $T_p$ ) y tampoco la entalpia correspondiente. Esto fue debido a que después de pasar por el proceso de licuefacción (100 °C por 30 min.) ya habían sido gelatinizadas y por lo tanto no mostraron una  $T_p$  y tampoco ningún indicio de una reorganización de sus cadenas a una temperatura más elevada (200 °C). Sin embargo, otros autores (El-Feky *et al.*, 2015) han encontrado transiciones térmicas (115.84°C) por CDB en nanopartículas de almidón (NPa) entrecruzadas con trimetafosfato de sodio ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>3</sub>.

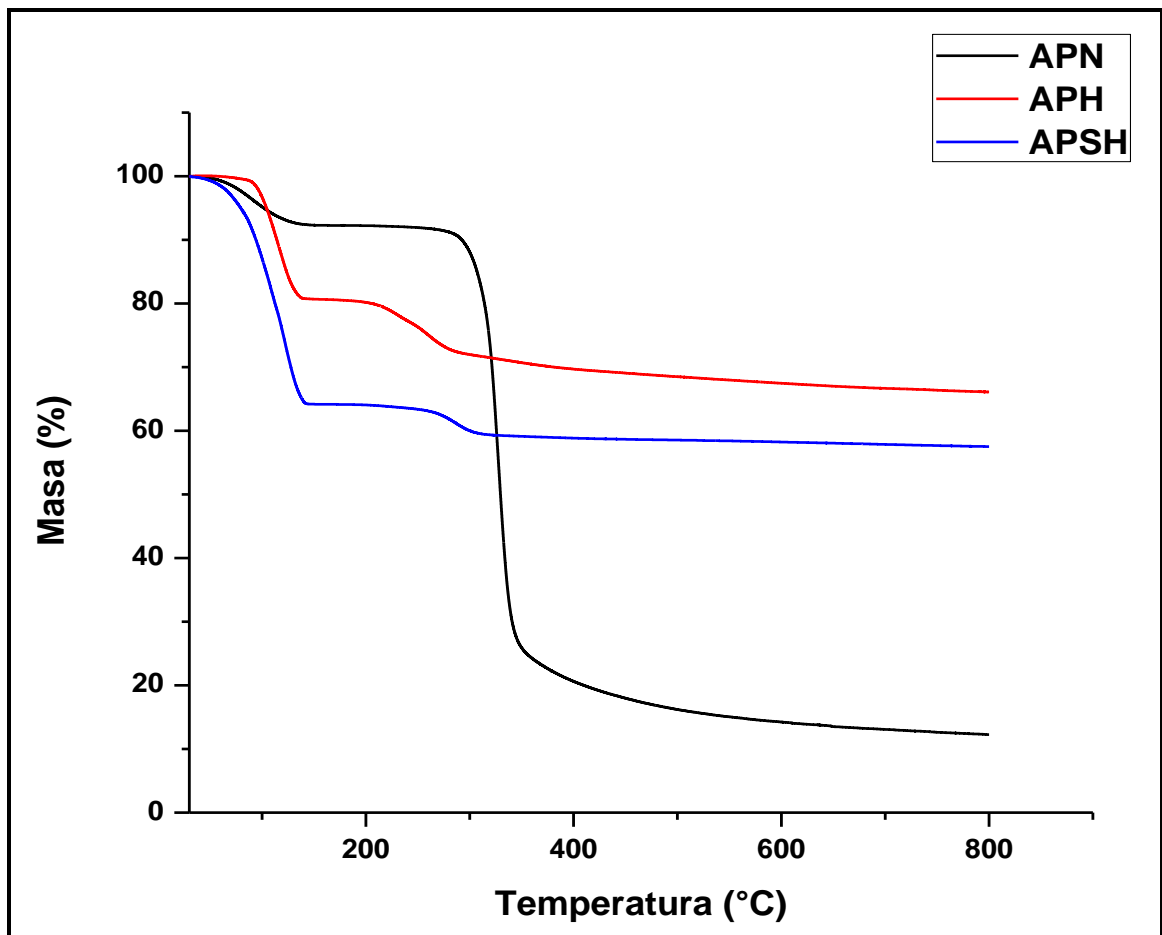
Recientemente Qin *et al.*, (2016) reportaron temperaturas de gelatinización en un intervalo de 67.62 a 73.47 °C con entalpías ( $\Delta H$ ) que van de los 0.96 a 6.16 J/g para NPa obtenidas por hidrólisis enzimática partir de diferentes fuentes botánicas (maíz, chícharo, papa y tapioca).

### **8.10 Análisis Termogravimétrico**

Los resultados de los análisis termogravimétricos del APN, APH, APSH, se muestran en el termograma de la Figura 19. El objetivo principal de este análisis fue examinar los cambios en la estabilidad térmica después de la hidrólisis y la sonicación de las nanopartículas obtenidas.

El APN presentó dos estados de pérdida de peso, el primer estado corresponde a la pérdida de agua que se da en un intervalo entre 70-150 °C, el segundo estado de pérdida de peso corresponde a la descomposición del almidón. Esta temperatura de descomposición inicial ( $T_{di}$ ) se observó en 250 °C y presentó una temperatura de descomposición máxima ( $T_{dmax}$ ) alrededor de los 270 °C con una pérdida en peso de 8.41 %. A partir de los 270 °C el calentamiento de la muestra resultó en la carbonización de la misma y la formación de cenizas por la calcinación de la materia orgánica reportando una pérdida en peso final de 87.76%.

El APH presentó una temperatura de descomposición inicial a los 100 °C y una temperatura de descomposición máxima alrededor de los 150 °C valores que en comparación con el almidón nativo dejan ver una disminución en la temperatura de degradación. Esta disminución puede deberse a la reducción de las partículas y al arreglo de las hélices (Qin *et al.*, 2016), pero se puede observar en la cantidad final de pérdida en peso un mejor arreglo en la estructura cristalina y una mayor resistencia a la degradación térmica, llegando a un valor final de 33.91%. Con respecto al APSH presentó un comportamiento muy similar en cuanto a las temperaturas de descomposición inicial y máxima, pero se observa una pérdida en peso mayor llegando a un valor de 42.49 %.

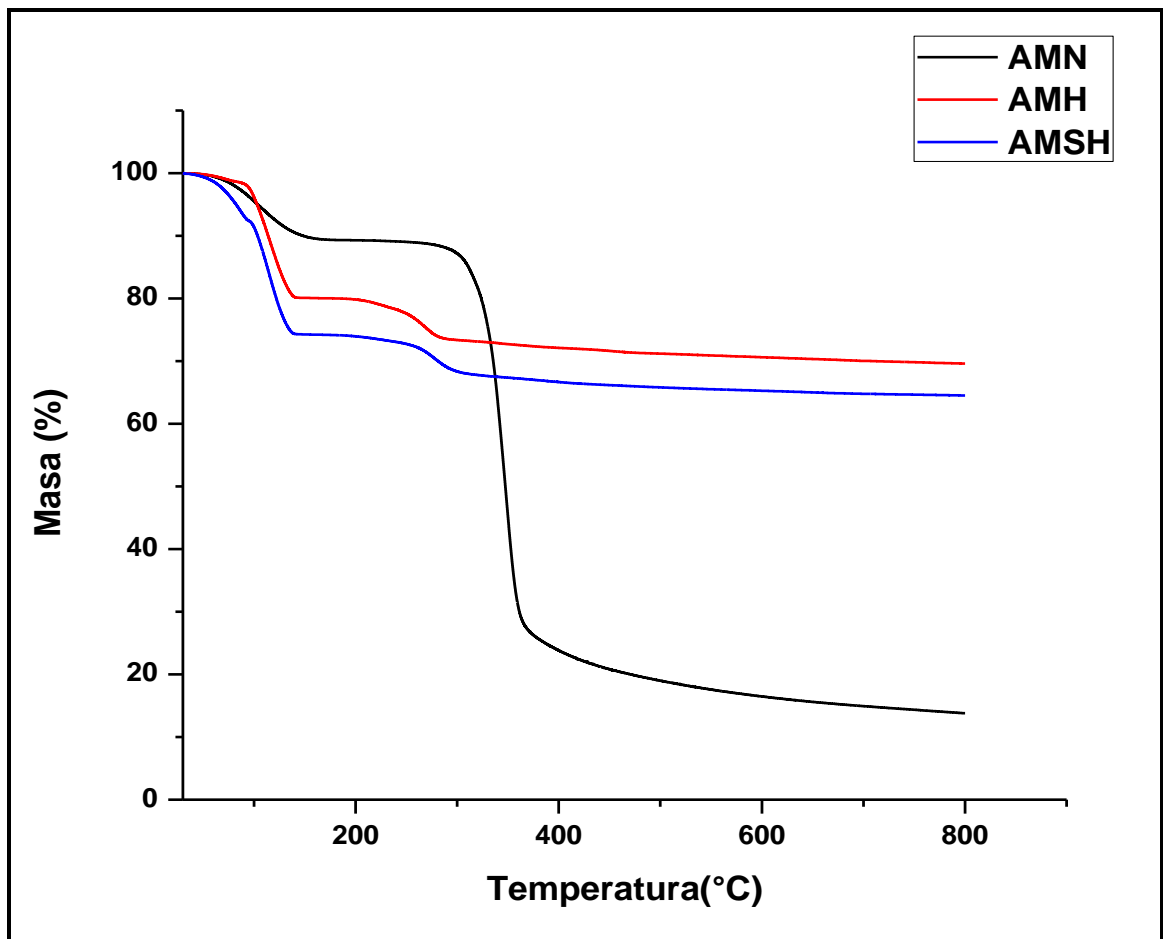


**Figura 20.** Curvas de pérdida de peso (%) obtenidas por análisis termogravimétrico del almidón de plátano nativo (APN), almidón de plátano hidrolizado (APH), y almidón de plátano sonificado hidrolizado (APSH).

Los resultados del análisis termogravimétrico del AMN, AMH, AMSH, se muestran en el termograma de la Figura 20. El objetivo principal de este análisis fue examinar los cambios en la estabilidad térmica después de la hidrólisis y la sonicación.

El AMN presentó dos estados de pérdida de peso, el primer estado corresponde a la pérdida de agua que se da en un intervalo entre 70-100 °C, el segundo estado de pérdida de peso corresponde a la descomposición del almidón. Esta temperatura de descomposición inicial ( $T_{di}$ ) se observó en 300 °C y presentó una temperatura de descomposición máxima ( $T_{dmax}$ ) alrededor de los 350 °C con una pérdida en peso de 54.83 %. A partir de los 350 °C el calentamiento de la muestra resultó en la carbonización de la misma y la formación de cenizas por la calcinación de la materia orgánica reportando una pérdida en peso final de 86.21%.

El AMH presentó una temperatura de descomposición inicial a los 120 °C y una temperatura de descomposición máxima alrededor de los 150 °C valores que en comparación con el almidón nativo dejan ver una disminución en la temperatura de degradación. Esta disminución puede deberse a la reducción de las partículas y al arreglo de las únicas hélices (Qin *et al.*, 2016), pero se puede observar en la cantidad final de pérdida en peso un mejor arreglo en la estructura cristalina y una mayor resistencia a la degradación térmica, llegando a un valor final de 30.39%. Con respecto al AMSH presentó un comportamiento muy similar en cuanto a las temperaturas de descomposición inicial y máxima, pero se observa una pérdida en peso mayor llegando a un valor de 35.5 %.



**Figura 21.** Curvas de pérdida de peso (%) obtenidas por análisis termogravimétrico del almidón de malanga nativo (AMN), almidón de malanga hidrolizado (AMH), y almidón de malanga sonificado hidrolizado (AMSH).

## 9. CONCLUSIONES

La composición química de los almidones de las dos fuentes (plátano y malanga) fue diferente y característico en cuanto al contenido de lípidos, proteínas, cenizas, amilosa y amilopectina. Esto permitió descartar y asegurar que algunos de estos componentes no intervienen en los fenómenos suscitados durante el proceso de caracterización de los almidones sonicados e hidrolizados.

El comportamiento del APN y AMN durante el proceso de hidrólisis enzimática con  $\alpha$ -amilasa permitió observar que el GH fue mayor (13 mg/mL) en el caso del APN (11 mg/mL). Debido principalmente al arreglo estructural, empaquetamiento y porosidad que presenta esta fuente botánica de almidón.

La combinación de hidrólisis enzimática con la sonicación, nos permitió obtener nanopartículas a partir del almidón. En este contexto, el análisis de distribución de tamaño de partícula permitió observar un tamaño menor (80.6 nm) en el AMSH en comparación con el tamaño de partícula del APSH (99.50 nm).

El análisis morfológico realizado por SEM permitió observar el efecto del proceso de hidrólisis enzimática-ultrasonido en la superficie de los gránulos de almidón (fracturas y pérdida de estructura granular) y su fragmentación hasta tamaños nanométricos. Con el análisis de TEM se corroboró la presencia agregados o bloques constituidos de fragmentos del almidón sonificado-hidrolizado en un arreglo estructural diferente al de su estado nativo. El análisis de EDS reveló la presencia de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{P}^+$ , lo cual sugiere su inferencia en el arreglo estructural de dichos agregados.

El análisis DRX, evidenció la pérdida de la estructura cristalina de ambas fuentes de almidón (APN y AMN). Los almidones sonicados-hidrolizados presentaron un patrón de cristalinidad muy diferente al de su estado nativo (mayor arreglo cristalino). El análisis de FTIR permitió observar los grupos funcionales característicos sin cambios sustanciales.

El análisis del comportamiento térmico realizado por CDB y TGA, permitió observar cambios sustanciales en las temperaturas de transición de las nanopartículas obtenidas en comparación con su contraparte el ANP y ANM. Las nanopartículas obtenidas demuestran una mayor estabilidad térmica, esto debido al arreglo estructural y asociación de las partículas de almidón con los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{P}^+$ .

## 10. REFERENCIAS

- Aboubakar, Njintang, Y. N., Scher, J. and Mbofung, C. M. F. **2008**. Physicochemical, thermal properties and microstructure of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flours and starches. *Journal of Food Engineering*. 86:294-305.3
- Aehle W. **2007**. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3th ed. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. 314-320.
- Agama-Acevedo, E., García-Suarez, F. J., Gutierrez-Meraz, F., Sanchez-Rivera, M. M., and Bello-Pérez L. **2011**. Isolation and partial characterization of Mexican taro (*Colocasia esculenta* L.) starch. *Starch/Starke*, 63:139-146.
- Alexander, R. J. **1992**. Maltodextrins: Production properties and applications. In F.W. Scenck, R. A. Hebeda (Eds.), *Starch hydrolysis products, worldwide technology production and applications*. pp. 233-276.
- Amaya-Carlos, F., Orosio-Diaz, P., Agama-Acevedo E., Yee-Madeira, H., and Bello-Perez, L. A. **2011**. Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa Paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:1376-1382.
- Angellier, H., Choisnard, L., Molina-Boisseau, S., Ozil, P., Dufresne, A. **2004**. Optimization of the Preparation of Aqueous Suspensions of Waxy Maize Starch Nanocrystals Using a Response Surface Methodology. *Biomacromolecules*, 5:1545-1551.
- Angellier, H., Putaux, L., Molina-Boisseau, S., Dupeyre, D., Dufresne, A., **2005**. Mechanical Properties of Waxy Maize Starch Nanocrystal Reinforced Natural Rubber. *Macromolecular Symposia*. 221:95–104.
- Antonio-Estrada, C., Bello-Pérez, L.A., Martínez-Sánchez, C.E., Montañez-Soto, J.L., Jiménez-Hernández, J. & Vivar-Vera, M.A. **2009**. Enzymatic production of maltodextrins from taro (*Colocasia esculenta*) starch. *CyTA-Journal of Food*, 7(3): 233-241.
- AOAC (**1999**). *Association of Official Analytical Chemists Vol. 2*. St. Paul, MN.

Aspinal, G. O. **1983**. The Polysaccharides. Vol. 3. New York, Estados Unidos de América Academic Press.126-196.

Banik, G., Cremonesi, P., La Chapelle, A., Montalbano, L. **2003**. Nuové metodologie nel restauro del materiale cartaceo. Edicion II. Prato, Padora 2003, pp. 39-40.

Banks W. and Greenwood C.T. **1975**. Starch and its Components. Edinburgh University Press, Edinburgh. 28: 150-152.

Beck, M., Jekle, M. and Becker, T. **2011**. Starch re-crystallization kinetics as a function of various cations. Starch/Starke. 63: 792–800

Bello-Pérez L. A., Rendón-Villalobos J. R., Agama- Acevedo E. e Islas-Hernández J. J., **2006**. In vitro starch digestibility of tortillas elaborated by different masa preparation procedures. Cereal Chemistry 83: 188-193.

Bello-Pérez L.A., Agama-Acevedo E., Sánchez-Hernández L. and Paredes-López O. **1999**. Isolation and partial characterization of banana starches. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 854-857.

Bello-Pérez L.A., Contreras-Ramos S. M., Jimenez-Aparicio A., Paredes-Lopez O. **2000**. Acetylation and characterization of banana (*Musa paradisiaca*) starch. Acta Científica Venezolana. 51:143-149.

Bello-Pérez, L. A., Roger, P. and Colonna, P. J. **1998**. Laser light scattering of high amylose and high amylopectin materials in aqueous solution, effect of storage time. Cereal Science 27: 267-278.

Brennen, C. E. **1995**. Cavitation and bubble dynamics. S I. New York, Oxford: Oxford University Press. ISBN 0-19-509409-3.

Brenner, T., Kiessler, B., Radosta, S., Arndt, T., **2016**. Processing surface sizing starch using oxidation, enzymatic hydrolysis and ultrasonic treatment methods. Preparation and application. Carbohydrate Polymers.138: 273–279.

Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. **2005**. Biocatalysts and enzyme technology. Wiley-VCH, Weinheim. 226-228.

Carmona-Garcia, R., Aguirre-Garcia, A, Madeira, Yee., Bello-Perez, L.A. **2009**. Dual Modification of Banana Starch: Partial Characterization. *Starch/Stärke* 61:656–664

Copeland L., Blazek J., Salman H. and Tang M. C. **2009**. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloid*, 23: 1527–1534.

Cuthbert, W. O. Ray, S. S., Emmambux, N. M. **2017**. Isolation and characterization of nanoparticles from tef and maize starch modified with stearic acid. *Carbohydrate Polymers*. 168: 86-93.

Deepika, V. Jayaram, Kumar K., Anima, P. **2013**. Isolation and partial characterization of delayed releasing starches of *Colocasia* species from Jharkhand, India. *Carbohydrate Polymers*. 96:253-258.

Delcour J. and Hosney R.C. **2010**. Principles of cereal science and technology. St. Paul, MN: AACC International Press. 28-32.

Donald, A. M. **2001**. Plasticization and self-assembly in the starch granule. *Cereal Chemistry*. 78: 307-314.

Espinosa-Solis, V., Jane, J. I. and Bello-Pérez, L. A. **2009**. Physicochemical characteristics of starches from unripe fruits of mango and banana. *Starch e Stärke*, 61(5), 291-299.

Faisant N., Buleon A., Colonna P., Molis C., Lartigue S., Galmiche J. P., and Champ M. **1995**. Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: Structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition*. 73: 111-123.

Fang J. M., Fowler P. A J. Tomkinson, and C. A. S. Hill. **2002**. The preparation and characterization of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 47: 245-252.

Fang, J. M., Fowler, P. A., Sayers, C. and Williams, P. A. **2004**. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*. 55: 283-289.

FAOSTAT. Database from Food and Agriculture Organization **2001**.

FAOSTAT. Database from Food and Agriculture Organization **2010**.

Fenneman, O. R. **2000**. Química de alimentos Segunda Edición. Zaragoza España. 238-239.

Flores-Gorosquera, E., García-Suárez, F. J., Flores-Huicochea, E., Nuñez-Santiago, M. C., González-Soto, R. A. and Bello-Pérez, L. A. **2004**. Acta Científica Venezolana. 55: 86-90.

Franco, C. ML., do Rio Preto S. J., Ciacco CF. **2006**. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules - effect of the size of the granules. Starch-Starke 44: 422-426.

Gallant, D. J., Bouchet, B. and Baldwin, P. M. **1997**. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. Carbohydrate Polymers. 32: 177-191.

Goheen, S. M. and Wool, R. P. **1991**. Degradation of polyethylene starch blends in soil. Journal of applied polymer science. 42:2961-2701

Goñi, I., García-Alonso, A. and Saura-Calixto, F. **1997**. Nutrition Research. 17: 427-437.

Guerra-Della Valle D., Bello-Perez L. A., Gonzalez-Soto R.A., Solorza- Feria J. y Arambula-Villa G. **2008**. Efecto del tiempo de reacción en la acetilación del almidón de plátano. Revista Mexicana de Ingeniería Química 7:283-291.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Chauhan, B. **2005**. Microbial  $\alpha$ - amilasa: a biotechnological perspective. Process Biochemistry. 38:1599-1616.

Haaj,B.S., Magnin, A., PétrierC., Boufi S., **2013**. Starch nanopartículas formation via high power ultrasonication. Carbohydrate Polymers. 92:1625-1632.

Hee-Young, K., Sung-Soo, Park., Seung-Taik, Lim. **2015**. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. Colloids and Surfaces B. 126: 607-620.

Hu, A., Lu, J., Zheng, J., Zhang, Y., Tong-Cun. Z., Li, Q., Yang L. **2014**. Effects of Dual-Frequency Ultrasound with  $\alpha$ -amylase on the Properties and Structure of Mung Bean Starch. In: Zhang, T. C., Ouyang, P., Kaplan S., Skarnes, B. (eds) Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012). Lecture Notes in Electrical Engineering, Vol 250. Springer, Berlin, Heidelberg.

Instituto Nacional de Nutrición (INN) Salvador Zubirán. **1999**. Tablas de Composición de Alimentos. Instituto Nacional de Nutrición. México.

Jayakody, L. Hoover.R. **2002**. Food Research International. 35: 665–680.

Jiang, Q., Gao, W., Li, X. and Zhang, J. **2011**. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed *Zea mays* L., *Fritillaria ussuriensis* Maxim. and *Dioscorea opposita* Thunb. Starches. Food Hydrocolloids. 25: 521-528.

Jong-Yea, Kim, Dong-June Park., and Seung-Taik, Lim. **2008**. Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis. Cereal chemistry.85: 182-187.

Kacurakova M. and Wilson R. **2001**. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. Carbohydrate Polymers, 44: 291-303.

Kim, H.Y., Lee, J. H., Kim, J-Y., Lim, W-J and Lim, S-T. **2012**. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. Starch/Starke. 64: 367–373.

Kong, BW., Kim, JI., Kim, MJ., Kim, JC. **2003**. Porcine pancreatic  $\alpha$  –amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. Progress in Biotechnology. 19: 1162-1166.

Kuakpetoon, D., and Y. Wang. **2001**. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. Starch/Stärke. 53:211–218.

Lammers, K., Arbuckler-Keil, G., Dighton, J., **2009**. FT-IR study of the changes in carbohydrate chemistry of three New Jersey Pine Barrens leaf litters during simulated control burning. Soil Biology Biochemistry.

Lauterborn, w., Ohi, C. D. **1997**. Cavitation bubble dynamics. Ultrasonics Sonochemistry. 4: 65-75.

Le-Corre, D., Angellier, H., **2014**. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites. Reactive & Functional Polymers.

Lei, Dai. Chao, Qiu. Liu, Xiong. Qingjie, Sun. **2015**. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch. *Food Chemistry*.174: 82-88.

Li, W., Beta, T., Corke, H. **2007**. Kinetics of hydrolysis and changes in amylose content during preparation of microcrystalline starch from high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers*. 69: 398-405.

Lineback, D. R. **1984**. The starch granule. Organization and properties. *Laker Digest*, March. 16-21.

Liu, D. G., Wu, Q. L., Chen, H. H. and Chang, P. R. **2009**. Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*. 339: 117-124.

Liu, H., Yu, L., Chen, L., Li, L., **2007**. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. *Carbohydr. Polym.* 69, 756–762.

Majzoobi, Masha., Hedayati, Sara., Farahnaky, Asgar. **2015**. Functional properties of microporous wheat starch produced by  $\alpha$ -amylase and sonication. *Food Bioscience*.11: 79-84.

Mano, J. F., Konoarova, D. and Reis. R. L. **2003**. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blend with potential biomedical applicability. *Journal of Materials Science*, 14: 127-135.

Manrique-Quevedo, N., González-Soto, R. A., Othaman-Abu-Hardan M., García-Suarez, F. J. and Bello-Pérez L. A. **2007**. Caracterización de mezclas de almidones de mango y plátano pregelatinizados mediante diferentes condiciones de extrusión. *Agrociencia*. 41: 637-645.

Mendoza-Castellanos. M.A. **2016**. Caracterización morfológica, térmica y funcional de nanopartículas de almidón de malanga obtenidos mediante hidrólisis enzimática-ultrasonificación. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Tuxtepec. Oaxaca. México.

Mercier, C. **1982**. L'amidon et les enzymes en sucrochimie. *Industries Alimentaires et Agricoles*. 99: 787-796.

- Mercier, C. **1985**. Les enzymes amylolytiques. En "Hidrolases et depolymerases". C. Gauthier Villars, 109-142.
- Miller, G. **1959**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, 426-431.
- Morrison, W. R., R. F. Tester, M. J. Gidley, and J. Karkalas. **1993**. Resistance to acid hydrolysis of lipid complexed amylose and lipid free amylose in linterized waxy and non-waxy barley starch. *Carbohydr. Res.* 245: 289–302.
- Mweta, D. E., Labuschagne, M. T., Bonnet, S., Swarts, J. and Sakac, J. D.K. **2010**. Isolation and physicochemical characterization of starch from cocoyam (*Colocasia esculenta*) grown in Malawi. *Society of Chemical Industry.* 90: 1886-1896.
- Nagarajan, R. **2008**. Nanoparticles: synthesis, stabilization, passivation and functionalization Symposium Series 996, American Chemical Society, Washington DC. 1:2-14.
- Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover, R., Bressler, D. **2013**. The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starch estoward amylolysis at sub-gelatinization temperatures. *Food Research International.* 51:771-82.
- Neppiras, E. A. **1980**. Acoustic cavitation, *Physics Report:* 61, 159-251
- Núñez-Santiago.M.C., Bello-Pérez.L.A., Tecante.A. **2004**. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Carbohydrate Polymers* 56: 65–75
- Nwokocha Louis M., Williams Peter A. **2009**. Some properties of white and yellow plantain (*Musa Paradisiaca Normalis*) starches. *Carbohydrate Polymers.* 76:133-138.
- Oates C. G. **1997**. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology,* 8:375-82.
- Olempska-Bier Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. **2006**. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms: A review. *Regul Toxicol Pharm* 45:144-158.

Oudjeriouat N., Moreau Y., Santimone M., Svensson B., Marchis- Mouren G., Desseaux V. **2003**. On the mechanism of  $\alpha$ -amylase. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3871-3879.

Paredes-López, O., Schevenin, M. L., Hernández-López, D. and Cárabez, A. **1989**. *Starch/Stärke*. 41:205.

Pelissari. F. M., Andrade-Mahecha. M. M., do Amaral- Sobral. P. J. **2013**. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids* 30: 681-690.

Pérez. Elevina., Schultz. Forrest S., Pacheco de Delahaye. Emperatriz. **2005**. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro). *Carbohydrate Polymers* 60: 139-145

Philipp, A., & Lauterborn, W. **1998**. Cavitation erosion by single laser-produced bubbles. *Journal of Fluid Mechanics*, 361: 75-116.

Poole, C.P and Owens, F. J. **2007**. *Introducción a la Nanotecnología*, Ed. Reverté, 1.

Putaux, J. L., Molina-Boisseau, S., Momaur, T., & Dufresne, A. **2003**. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. *Biomacromolecules*, 4: 1198-1202.

Qin, F., Man, J., Xu, B., Hu, M., Gu, M., Liu, Q., Wei, C. **2011**. Structural properties of hydrolyzed high-amylose rice starch by  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 12667-12673.

Qin, Y., Liu, C., Jiang, S., Xiong L., Sun, Q., **2016**. Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. *Industrial Crops and Products*. 87:182-190.

Raja, K. C. M. **1994**. Modified properties of lintnerized cassava and maize starches. *Carbohydrate Research*. 24: 85-90.

Rivas-González, M., Méndez-Montevalvo, M., Sánchez-Rivera, M., Núñez-Santiago, M. C., Bello-Pérez, L.A. **2008**. Caracterización morfológica, molecular y

fisicoquímica del almidón de plátano oxidado y lintnerizado. *Agrociencia*, 42: 487-49.

Robinson, J. C. **1996**. Distribution and importance; taxonomic classification, cultivars and breeding. In J. C. Robinson (Ed.), *Banana and Plantains*. Wallingford: CAB International, 1-33.

Sanni, L. O., Oyewole, O. B., Adebowale, A. A. and Adebayo, K. **2003**. Current trends in the utilization of roots and tubers for sustainable development. *Food Based Approaches for a Healthy Nutrition*. 11: 23-28.

Sarian, FD., Van der Kaaij, RM., Kralj, S., Wijbenga, DJ., Binnema, DJ., Van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. **2012**. Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium aurum* strain B8. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 645-654.

Sauter, C., Emin, M. A., Schuchmann, H. P., & Tavman, S. **2008**. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrasonics Chemistry*, 15:517-523.

Sefa-Dedeh, S. and Agyr-Sacker, K.E. **2004**. Chemical composition and the effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma gittifolium* and *Colocasia esculenta* cormels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4:479-487.

Sevenou, O., S. E. Hill, I. A. Farhat, and J. R. Mitchell. **2002**. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macrom.* 3: 79-85.

SIAP-SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/>. **2012**.

Simsek, S., and Nehir, S. **2012**. Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L.Schott) corm and determination of its effects on health by in vitro methods. *Carbohydrate Polymers*. 90: 1204-1209.

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, 219–231.

- Singhal, R. S. and Kulkarni, P. R. **1988**. Review: amaranths an underutilized resource. *International Journal of Food Science and Technology*. 23: 125-139.
- Smith, M. A. **2001**. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, 2: 335-341.
- Stover, R. H. and Simmonds, N. W. **1987**. Classification of banana cultivars. (Eds.), *Bananas 3rdEd*. New York: Wiley, 97-103.
- Sujka, M., & Jamroz, J. **2013**. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocolloids*, 31: 413-419.
- Sun, Q., Li, G., Dai, L., Ji, N., Xiong, L., **2014**. The effect of retrogradation time on preparation and characterization of pro so millet starch nanoparticles. *Food Chemistry*. 162: 223-228.
- Suslick, K., & Flannigan, S. D. J. **2008**. Inside a collapsing bubble sonoluminescence and the conditions during cavitation. *Annual Review of Physical Chemistry*, 59: 659-683.
- Tahir A, Zahid S, Mateen B, Farasat T, Mughal T. **2010**. Optimization of cultural conditions for the propagation of *Gliocladiumviridezic 2063* as potential biosorbent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 1: 37-46.
- Taniguchi, N., **1974**. On the Basic Concept of 'Nano-Technology'. *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering*.
- Tawil, G., Jamme, F., Réfrégiers, M., Viksø-Nielsen, A., Colonna, P., Buléon, A., **2010**. In situtracking of enzymatic breakdown of starch granules by synchrotron UV fluorescence microscopy. *Analytical Chemistry*. 83: 989-993.
- Tester, R. F., Qi, X., Karkalas, J. **2006**. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130:39-54.
- Valodka, M., Thakore, S. **2011**. Organically modified nanosized starcha derivates as excellent reinforcing agent for bionanocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 86: 1244-1251

Vergara-Méndez, B. Z. **2012**. Efecto de la modificación química dual del almidón de plátano (*Musa Paradisiaca* L.) sobre las propiedades térmicas, morfológicas y estructurales. Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México. 27.

Waliszewski, K. N., Aparicio, M. A., Bello-Pérez, L. A. and Monroy, J. A. **2003**. Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydrate Polymers*. 52: 237-242.

Weiss, J., Kristbergsson, K., Kjartansson, GT. **2011**. Engineering food ingredients with high- Intensity and bioprocessing. Springer, New York. pp. 239-285.

Weiss, J., Takhistov, P. and Mc Clements, J. **2006**. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*.71: 107-16.

Wurzburg, O.B. **1986**. Modified Starches: Properties and Uses. Boca Raton, Estados Unidos de América. CRC Press. 4-10.

Xie, Fengwe, F., Pollet, E., Halley, P. y Avérous L. **2013**. Nano-biocomposites based on starch. *Advances in Polymer Science*. 38: 10-11.1590-1628.

Zeng, F. K., Liu, H. and Liu, G. **2014**. Physicochemical properties of starch extracted from *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Bun-long taro) grown in Hunan, China. *Starch/Stärke*, 66: 142-148.

Zhang, Pingyi., Whistler, Roy L., Be Miller, James., Hamaker, Bruce R. **2005**. Banana Starch: production, physicochemical properties, and digestibility-a review. *Carbohydrate Polymers*. 59: 443-458.