

# CUANTIFICACION DE ALMIDON TOTAL Y DE ALMIDON RESISTENTE EN HARINA DE PLATANO VERDE (*MUSA CAVENDISHII*) Y BANANA VERDE (*MUSA PARADISIACA*)

Vania Soraya Soto Azurduy

Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Cochabamba – Bolivia

**Keywords:** Cuantificación, método enzimático, almidón total, almidón resistente

## ABSTRACT

The present work is oriented to the quantification of resistant starch in banana and green banana flour using the enzymatic in vitro method, in this method a series of specific amylolytic enzymes participate to digest starch obtaining precise, fast potent and cost-effective results, in the evaluation of the resistant starch. The method used for the determination of total starch in banana and green banana flours was Holms, the main steps include: enzymatic degradation with  $\alpha$ -amilasa *Termamyl 120 L*, which results in a partial hydrolysis, 30 minutes incubation with amyloglucosidase from *Aspergillus niger* obtaining a total hydrolysis. Finally determination of glucose was done with a glucose oxidase and peroxidase reagent. Quantification of resistant starch in banana and green banana flour was done using the Goñi I. method, initially an proteic hydrolysis with pepsine under acid pH conditions was carried out to simulate stomach physiologic conditions, the remotion of proteins increases  $\alpha$ -amilasa accessibility. Digestible starch hydrolysis was followed with swine pancreatic  $\alpha$ -amylase during 16 hours at neutral pH. After centrifugation hydrolysis products were eliminated, in the residue the indigestible starch remained. Finally was dispersed in a basic medium and totally hydrolyzed with *Aspergillus niger* amyloglucosidase, measuring the free glucose with a glucose oxidase and peroxidase reagent. The experimental results showed that the green banana (*Musa paradisiaca*) presented higher amount of total starch (73,42 %) and resistant starch (24,82 %) . A comparison with the green banana flour (*Musa cavendishii*) which show total starch (68,13 %) and resistant starch (21,06 %) was done. The test were done with six repetitions in each sample and each experimental method, a control sample of starch was used. Concluding that banana (*Musa cavendishii*) and green banana (*Musa paradisiaca*) are a good source of resistant starch which is very important and beneficial to the health and its use must be encouraged of these fruits natives from the region.

Corresponding author:

## RESUMEN

El presente trabajo está orientado a cuantificar el almidón resistente en harina de plátano y banana verde utilizando el método in vitro enzimático, en el cual participan una serie de enzimas amilolíticas específicas para la digestibilidad del almidón teniendo los beneficios de obtener resultados más precisos y confiables. El método para la determinación de almidón total en las harinas de plátano y banana verde fue el de Holm J.; entre los pasos principales incluyen la degradación enzimática del almidón con la presencia de una  $\alpha$ -amilasa *Termamyl 120 L* dando una hidrólisis parcial y también una incubación con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* por 30 minutos consiguiendo así una hidrólisis total. Subsecuentemente determinación de glucosa con el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa.<sup>4</sup> Para la cuantificación de almidón resistente en harina de plátano y banana verde se utiliza el Método de Goñi I. ; que contempla primeramente una hidrólisis proteica con pepsina a pH ácido para simular las condiciones fisiológicas estomacales, la remoción de proteínas aumenta la accesibilidad de la  $\alpha$ -amilasa. Seguida de la hidrólisis del almidón digestible con  $\alpha$ -amilasa *Pancreática Porcina* durante 16 horas. Tras una centrifugación se eliminan los productos de hidrólisis, en el residuo permanece la fracción de almidón indigestible, se dispersa en medio alcalino e hidroliza en su totalidad con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* determinándose la glucosa liberada con un reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa.<sup>5</sup> Los resultados de la parte experimental muestran que la harina de banana verde (*Musa paradisiaca*) presenta mayor cantidad de almidón total (73,42%) y de almidón resistente (24,82%) en comparación con la harina de plátano verde (*Musa cavendishii*) que presenta resultados de almidón total (68,13%) y de almidón resistente (21,06%) siendo mas bajos.

Las pruebas se realizaron con seis repeticiones en cada muestra y en cada método experimental, además, se trabajó con muestra control. Llegándose a la conclusión de que el plátano (*Musa cavendishii*) como la banana verde (*Musa paradisíaca*) representan una buena fuente de almidón resistente que pueden ser aprovechados en la preparación de diversos productos propios de la región.

## INTRODUCCION

El plátano es una fruta que se consume bastante en países del Caribe, Centroamérica, y Sudamérica. En Bolivia, sobre todo, se cultiva en la zona oriental, en chapare de Cochabamba, en Alto Beni, en los Yungas y Caranavi de La Paz, con una producción anual bastante alta. El plátano maduro es un alimento muy nutritivo, cuenta con gran cantidad de hidratos de carbono dotando de energía a nuestro organismo por su rápida digestión, su riqueza de potasio ayuda a la eliminación de líquidos y por lo tanto, ayuda a mejorar la hipertensión arterial, además de contener magnesio, ácido fólico, la vitamina C combinada con su riqueza en fósforo resulta ideal para el fortalecimiento de la mente, también contiene sustancias de acción astringente por la cantidad de taninos, sin desprestigiar su elevado aporte de fibra.<sup>1</sup> El plátano y la banana verde contienen una elevada cantidad de almidón resistente, las investigaciones reportan que es muy beneficioso por sus efectos fisiológicos en el organismo como disminución del tiempo de tránsito intestinal, reducción de glucosa en sangre y consecuentemente, la cantidad del nivel de colesterol. El almidón resistente en el proceso de digestibilidad en un individuo sano no se absorbe en el intestino y sirve de alimento para las bacterias duodenales beneficiosas, esta digestión es muy similar a la proporción soluble de la fibra dietética.<sup>2,3</sup> El almidón resistente puede ser considerado como un ingrediente funcional que aumenta la calidad de los alimentos. Se lo llama así porque resiste a la digestión por parte de las enzimas amilolíticas y llega íntegro al intestino donde es fermentado por las bacterias duodenales, esta resistencia a la hidrólisis puede ser explicada por varios factores como grado y tipo de cristalinidad del grano de almidón, contenido de amilosa, morfología del gránulo, la presencia de complejos almidón-lípido y almidón-proteína.<sup>2</sup> Debido a los beneficios que trae el conocimiento sobre este almidón resistente, es importante hacer hincapié en el presente trabajo de cuantificar la cantidad de almidón resistente en dos variedades de plátano verde de la región mediante la utilización de métodos enzimáticos *in vitro* para obtener resultados con precisión y rapidez. De esta manera es importante potencializar sus efectos benéficos con el fin de mejorar el estado de salud de la población en general y aportar alternativas para la prevención y control de enfermedades.

## RESULTADOS

*Valores de composición nutricional en dos variedades de harinas de plátano verde*

Las dos variedades de harinas de plátano verde obtenidas fueron sometidas a análisis de composición nutricional básico.

Parámetros	g %
Humedad	9,45
Proteína	3,32
Lípidos	2,45
Fibra cruda	1,65
Ceniza	2,10
Carbohidratos	81,03

Parámetros	g %
Humedad	5,72
Proteína	2,34
Lípidos	0,57
Fibra cruda	1,13
Ceniza	2,60
Carbohidratos	87,83

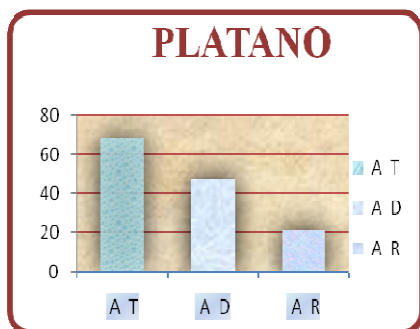
En la Tabla N° 1 y Tabla N° 2 se presenta la composición nutricional de ambos tipos de harina, siendo la harina de banana con mayor cantidad de carbohidratos totales (87,83 %) en comparación con la harina de plátano (81,03%)

*Porcentaje de medias de Almidón Total (AT), Almidón Disponible (AD) y Almidón Resistente (AR) en harina de plátano y banana verde*

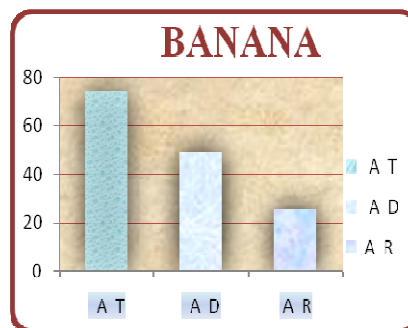
En la Tabla N° 3 se obtuvieron los siguientes resultados de Almidón Total (AT), Almidón Disponible (AD) y Almidón Resistente (AR) en dos variedades de harinas de plátano y banana verde realizándose seis repeticiones. El contenido de Almidón Disponible se obtuvo de una diferencia entre los resultados de Almidón Total y de Almidón Resistente.

Los resultados obtenidos de harina de plátano verde fueron representados a través de diagramas de columnas, donde se muestra el porcentaje de Almidón Total, Almidón Disponible y Almidón Resistente (Figura N° 1) de acuerdo a la Tabla N° 3. Los resultados obtenidos de harina de banana verde fueron representados a través de diagramas de columnas, donde se muestra el porcentaje de Almidón Total, Almidón Disponible y Almidón Resistente (Figura N° 2) de acuerdo a la Tabla N° 3

	AT	AD	AR
<b>PLATANO</b>	68,13	47,07	21,06
<b>BANANA</b>	73,42	48,59	24,82



**Figura N° 1** Porcentaje de Almidón Total (AT), Almidón Disponible (AD) y Almidón Resistente (AR) en harina de plátano verde



**Figura N° 2** Porcentaje Almidón Total (AT), Almidón Disponible (AD) y Almidón Resistente (AR) en harina de banana verde

*Determinación del valor de P en Almidón Total, Almidón Disponible y Almidón Resistente por comparación de medias obtenido de harinas de plátano y banana verde.*

En la Tabla N° 4 se realizó el test - student de comparación de medias entre harina de plátano y banana verde con los datos obtenidos de Almidón Total, determinándose el valor de P ( $\leq 0,05$ ). La desviación estándar es el grado de dispersión del valor de la media, de acuerdo a los datos obtenidos los valores de Desviación Estándar son muy bajos lo cual refleja la precisión de los análisis. Para esta aplicación el valor de P estadísticamente es significativo, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre si. Por lo tanto podemos decir que el Almidón Total contenido en la banana verde a comparación con el plátano verde difiere significativamente. En la Tabla N° 5 se realizó el test - student de comparación de medias entre harina de plátano y banana verde con los datos obtenidos de Almidón Disponible determinándose el valor de P ( $\leq 0,05$ ).

	Media	Desviación Estándar	Valor de P
<b>PLATANO</b>	68,13	0,43	0,006
<b>BANANA</b>	73,42	0,37	

	Media	Desviación Estándar	Valor de P
<b>PLATANO</b>	47,07	0,26	0,017
<b>BANANA</b>	48,59	0,36	

La desviación estándar es el grado de dispersión del valor de la media, de acuerdo a los datos obtenidos los valores de Desviación Estándar son muy bajos lo cual refleja la precisión de los análisis. Para esta aplicación el valor de P estadísticamente es significativo, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre si. Por lo tanto podemos decir que el Almidón Disponible contenido en la banana verde a comparación con el plátano verde difiere significativamente.

En la Tabla N° 6 se realizó el test - student de comparación de medias entre harina de plátano y banana verde con los datos obtenidos de Almidón Resistente determinándose el valor de P ( $\leq 0,05$ ).

<i>Tabla N° 6 Determinación del valor de P en Almidón Resistente Comparación de medias de ambas muestras</i>			
	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Valor de P</b>
<b>PLATANO</b>	21,06	0,22	0,007
<b>BANANA</b>	24,82	0,68	

La desviación estándar es el grado de dispersión del valor de la media, de acuerdo a los datos obtenidos los valores de Desviación Estándar son muy bajos lo cual refleja la precisión de los análisis. Para esta aplicación el valor de P estadísticamente es significativo, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre sí. Por lo tanto, podemos decir que el Almidón Resistente contenido en la banana verde en comparación con el plátano verde difiere significativamente.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en la composición nutricional de ambas variedades de plátano verde refleja elevada cantidad de carbohidratos totales (81-87%), una interesante cantidad de proteínas (2-3%) debido a que es una fruta y un buen aporte en minerales (2% de ceniza). Realizando un análisis de resultados obtenidos de Almidón Total (73%), se asemejan a los resultados obtenidos por Pacheco-Delahaye, 2001 en Venezuela con la misma variedad de *Musa paradisiaca* (81%), teniendo este último trabajo algunas variaciones en el método utilizado para la determinación de Almidón Total como por ejemplo enzimas de diferente industria, menor tiempo de hidrolizado.<sup>2</sup> Los resultados obtenidos de Almidón Resistente (21-24%), difieren un poco con los resultados obtenidos por Pacheco-Delahaye, 2001 con la misma variedad de harina (14%), teniendo diversificaciones en el método utilizado como diferente concentración de algunos reactivos, enzimas de diferente industria.<sup>2</sup> Al realizar la comparación de medias en Almidón Total con el test - student y determinando el valor de  $P \leq 0,05$ ; se define que sus diferencias entre ambas variedades de plátanos, son altamente significativas, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre sí por el valor de  $P \leq 0,006$ . Respecto a la comparación de medias en Almidón Disponible con el test - student y determinando el valor de  $P \leq 0,05$ ; se define que sus diferencias entre ambas variedades de plátanos son altamente significativas, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre sí por el valor de  $P \leq 0,017$ . En relación a la comparación de medias en Almidón Resistente con el test - student y determinando el valor de  $P \leq 0,05$ ; se define que sus diferencias entre ambas variedades de plátanos son altamente significativas, es decir ambas medias tienen diferencia significativa entre sí por el valor de  $P \leq 0,007$ .

## SECCION EXPERIMENTAL

### *Tipo de estudio*

El presente trabajo de investigación corresponde al tipo de estudio Analítico cuantitativo.

Las características y condiciones del problema de la investigación, están enmarcados en un estudio de carácter cuantitativo porque se determinó la cantidad de almidón total y de almidón resistente en harinas de plátano y banana verde procedentes de Cochabamba, tomando en cuenta que el almidón resistente no se digiere en el intestino y actúa como prebiótico para las bacterias duodenales beneficiando de esta manera a la salud gastrointestinal.

Desde el punto de vista metodológico el estudio cuantitativo, permite realizar un análisis a través de la medición, de la cantidad y el porcentaje de los datos obtenidos y posteriormente realizar una interpretación y comparación de los resultados.

### *Análisis estadístico*

Se realizó análisis de varianza para determinar las diferencias significativas entre las medias de los procedimientos, los cuales fueron obtenidos de seis repeticiones, con un nivel de significancia de  $P \leq 0.05$

Se trabajó con el software de PC, utilizando el programa estadístico SPSS 15, para calcular las siguientes medidas estadísticas:

- Media  $\bar{x}$
- Desviación Estándar DE

Los resultados obtenidos fueron representados a través de diagramas de columna.

*Cuantificación del contenido de almidón total mediante Método de J. Holm y colaboradores en las dos variedades de harina de plátano verde*

Este método permite determinar la cantidad de almidón total de una muestra, con una disponibilidad completa del almidón a la degradación enzimática, en este procedimiento la etapa de gelatinización y licuefacción se realizó al mismo tiempo.

Se utilizó enzima *Termamyl 120 L* ( $\alpha$ -amilasa termoestable. Industria Novo Nordisk, Dinamarca.) ; enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* N°A7420 Polvo liofilizado, 30-60 unidades / mg de proteína. Industria Sigma Aldrich; Reactivo enzima Glucosa Oxidasa / Peroxidasa *Glox - Novum*. Industria Kabi Diagnóstica; almidón soluble P.A. N° 101252. Industria Merck Chemicals como control para la prueba.

Se utilizó el siguiente protocolo para la obtención y cuantificación del almidón total: <sup>4</sup>

1. Pesar 250 mg (< 0,8 mm) de una muestra molida de harina de plátano verde, colocar en un tubo de centrifuga de 50 ml.
2. Agregar 15 ml de agua destilada.
3. Agregar la enzima *Termamyl 120 L* una cantidad de 100  $\mu$ l, mezclar la suspensión en un agitador magnético.
4. Colocar el tubo de centrifuga en un baño de agua hirviendo a 97 °C por 15 minutos y mezclar cada 5 minutos.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente y continuar agitando, una vez frio, transferir la muestra a un frasco volumétrico de 25 ml, diluir enjuagando cuidadosamente y enrasar al volumen de 25 ml con agua destilada.
6. Transferir 1 ml de la muestra a un tubo de test.
7. Agregar 2 ml de buffer de acetato de sodio- ácido acético a pH 4.75 a 0.1 M.
8. Agregar la enzima Amiloglucosidasa la cantidad de 50  $\mu$ l (3,5 mg de Amiloglucosidasa x ml de sulfato de amonio 3.2 M.) e incubar la muestra a 60 °C por 30 minutos, mezclando con cuidado cada 5 minutos.
9. Transferir la muestra a un frasco volumétrico de 100 ml, diluir enjuagando cuidadosamente y enrasar al volumen de 100 ml con agua destilada.
10. Transferir 1 ml de la muestra a un tubo de centrifuga.
11. Agregar 1 ml de agua destilada.
12. Agregar 4 ml de reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa a la muestra, al blanco y a los estándares la misma proporción (5,6 g de glucosa oxidasa / peroxidasa en 100 ml de buffer tris-fosfato pH 7,0 a 0,5 M), incubar a 37 °C por 60 minutos, homogenizando cada 30 minutos.
13. Centrifugar a 3000 g durante 10 minutos.
14. Calibrar el espectrofotómetro a cero con el blanco.
15. Leer la absorbancia en un rango de 450 nm de longitud de onda.
16. Utilizar la curva de glucosa anhidra.

$$\% \text{ AT} = \frac{\mu\text{g de glucosa} \times 10^{-3} \times 25 \times 100 \times 0,9}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

*Cuantificación del contenido de almidón resistente mediante Método de I. Goñi y colaboradores en las dos variedades de harina de plátano verde*

Este método determina la presencia de almidón resistente en los alimentos y aparenta en lo más posible las condiciones fisiológicas estomacales. Los propósitos principales de este procedimiento analítico son: eliminación de la proteína, eliminación del almidón digerible, solubilización e hidrólisis enzimática del almidón resistente; y la cuantificación del almidón resistente como glucosa liberada x 0,9. Se utilizó enzima pepsina de Mucosa Gástrica de Cerdo N°107185 industria Merck Chemicals. 0.70 FIP-U/mg ajustado con sacarosa; enzima  $\alpha$ -amilasa Pancreática Porcina N°A3176 Tipo VI-B,  $\geq 10$  unidades / mg. Industria Sigma Aldrich; enzima amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* N°A7420 Polvo liofilizado, 30-60 unidades / mg de proteína. Industria Sigma Aldrich; reactivo enzima Glucosa Oxidasa / Peroxidasa *Glox - Novum*. Industria Kabi Diagnóstica. Se utilizó el siguiente protocolo para la obtención y cuantificación del almidón resistente: <sup>5</sup>

1. Pesar 100 mg (< 0,8 mm) de una muestra molida de harina de plátano verde, colocar en un tubo de centrifuga de 50 ml.
2. Agregar 10 ml de buffer KCl-HCl a pH 1,5 (ajustar el pH con 2 M HCl ó 0,5 M NaOH).
3. Agregar 0,2 ml de solución de Pepsina (1g de Pepsina /10 ml de buffer KCl-HCl pH 1,5). Mezclar, dejar en baño de agua a 40 °C por 60 minutos con un constante batido.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

5. Agregar 9 ml de buffer 0,1 M Tris-maleato a pH 6,9 (ajustar el pH con 2 M HCl ó 0,5 M NaOH).
6. A esta mezcla agregar 1 ml de  $\alpha$ -amilasa (40 mg de  $\alpha$ -amilasa / ml de buffer 0,1M Tris – maleato a pH 6,9), mezclar nuevamente, incubar durante 16 horas en el baño de agua a 37 °C con agitación constante.
7. Centrifugar las muestras por 15 minutos a 3000 g y desechar los sobrenadantes. Lavar al menos una vez con 10 ml de agua destilada, centrifugar y nuevamente desechar los sobrenadantes.
8. Agregar 3 ml de agua destilada al residuo, cuidadosamente humedecer la muestra.
9. Agregar 3 ml de 4 M KOH, mezclar y dejar por 30 minutos a temperatura ambiente en todo este proceso batir constantemente.
10. Agregar 5,5 ml de 2 M HCl y 3 ml buffer 0,4 M de acetato de sodio – ácido acético pH 4,75 (ajustar pH con 2 M HCl o 0,5 M NaOH).
11. Agregar 80  $\mu$ l de enzima Amiloglucosidasa (3,5 mg de Amiloglucosidasa x ml de sulfato de amonio 3,2 M.), mezclar y dejar por 45 minutos en baño de agua a 60 °C con agitación constante.
12. Centrifugar por 15 minutos a 3000 g, recolectar los sobrenadantes y guardar en un frasco volumétrico. Lavar los residuos con 10 ml de agua destilada, centrifugar nuevamente y combinar los sobrenadantes con lo que se obtuvo anteriormente. Trabajar con 25-1000 ml.
13. Preparar una curva estándar de solución líquida de glucosa (10 – 60 ppm).
14. Colocar 1 ml de agua destilada, 1 ml de muestra y 1 ml de los estándares y poner en diferentes tubos de ensayo.
15. Agregar 2 ml del reactivo de glucosa (GOD-POD) (5,6 g de glucosa oxidasa / peroxidasa en 100 ml de buffer tris-fosfato pH 7.0 a 0,5 M) a cada tubo de ensayo. Mezclar y dejar por 30 minutos en un baño de agua a 37 °C.
16. Leer la absorbancia de las muestras y de los estándares a 500 nm. Tiempo de lectura 5-45 minutos
17. Calibrar el espectrofotómetro a cero con el blanco
18. Utilizar curva de glucosa anhidra.

$$\% \text{ AR} = \frac{\mu\text{g de glucosa} \times 10^{-3} \times 700 \times 0,9}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

## REFERENCIAS

1 BOTANICAL – ONLINE SL .

Características de los plátanos – los plátanos unas hierbas muy valiosas. Revista de Botánica [revista en internet] 2010. [acceso 25 de abril de 2010]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/index.html>

2 Pacheco D. E.

Evaluación nutricional de sopas deshidratadas a base de harina de plátano verde. Digestibilidad in vitro del almidón. Acta Científica Venezolana. 2001; 52:283-291.

3 CRECES.

Los alimentos y la salud, a la luz de los conocimientos actuales. Publicado en Revista Creces del Instituto de Nutrición de Venezuela [revista en internet]. 1998. [acceso 10 de marzo de 2009]. Disponible en: <http://www.creces.cl/new/index.asp?tc=3&nc=2&imat=%20%20%20%2068>68&art=68>

4 Holm J, Bjorck I, Drews A, Asp N-G.

Un método rápido para el análisis de almidón. 1986; 38:224-226

5 Goñi I, García-Díaz L, Mañas E, Saura-Calixto F. Análisis de almidón resistente: un método para alimentos y productos alimenticios. Revista de Química Alimenticia. 1996; 56: 445-449.