



Ingeniería de alimentos



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE GLICOPROTEÍNAS OBTENIDAS MEDIANTE REACCIÓN DE MAILLARD UTILIZANDO ALMIDÓN ACETILADO Y AISLADO PROTEICO DE SUERO LÁCTEO

ELABORATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCOPROTEIN FILMS OBTAINED WITH THE MAILLARD'S REACTION USING ACETYLATED STARCH AND WHEY PROTEIN ISOLATED

P.B. Zamudio-Flores¹ y L.A. Bello-Pérez^{2*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD, A. C.). Unidad Cuauhtémoc, Fisiología y Tecnología de Alimentos de la Zona Templada. Avenida Río Conchos s/n, Parque Industrial, Apartado postal 781, C. P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Km. 6.5 Carr. Yautepec-Jojutla, Col. San Isidro, C.P. 62731 Yautepec, Morelos, México.

Recibido 10 de Julio de 2013; Aceptado 17 de Septiembre de 2013

Resumen

Se realizó una acetilación del almidón de avena a dos diferentes niveles (bajo y medio), y se caracterizaron mediante análisis químico proximal, difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido. Los almidones acetilados se sometieron a una reacción de Maillard con aislado proteico de suero lácteo, obteniéndose glicoproteínas con diferente grado de glicosilación (alto, medio y bajo), las cuales se caracterizaron por el método espectrofotométrico del O-ftaldialdehído (OPA). Con las glicoproteínas se elaboraron películas a las cuales se les evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas. La caracterización morfológica y de difracción de rayos X sugieren que las reacciones de acetilación ocurrieron principalmente en las regiones amorfas del gránulo. Las películas de glicoproteínas no mostraron cambios significativos en la propiedad mecánica de tensión a la fractura, a excepción de la película elaborada con el nivel medio de acetilación y alto nivel de glicosilación, presentando mayor tensión a la fractura que el resto de las películas. Los resultados de las pruebas mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua indicaron que las películas de glicoproteínas podrían ser adecuadas como materiales de recubrimiento para controlar la respiración y la senescencia de frutas y vegetales.

Palabras clave: películas compuestas, propiedades mecánicas, grado de sustitución.

Abstract

Acetylation of oat starch was carried at two different levels (low and medium), and characterized by proximate analysis, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. Acetylated starches underwent Maillard reaction with whey protein isolates, yielding glycoproteins with different degree of glycosylation (high, medium and low), which were characterized by the spectrophotometric o-phthalaldehyde (OPA) method. Films were made with the glycoproteins, and their physicochemical properties and mechanical were evaluated. Morphologic and X-ray diffraction analysis suggest that acetylation reaction mainly occurred in the amorphous regions of the starch granule. Glycoproteins films did not show significant changes in the mechanical property of the fracture stress, except the film elaborated with the medium acetylation level and the high level of glycosylation, presenting greater fracture stress than the other films. The results of the mechanical tests and water vapor permeability of the films indicated that the glycoproteins could be suitable as coating materials to respiration control and senescence of fruit and vegetables.

Keywords: composite films, mechanical properties, substitution degree.

*Autor para la correspondencia. E-mail: labellop@ipn.mx
Tel.: +52 735 3942020, Fax +52 735 3941896

1 Introducción

El desarrollo de envases biodegradables se considera una solución alternativa al problema de contaminación ambiental causado por la eliminación de desperdicios de plásticos no biodegradables (Cao *y col.*, 2008; Choi *y col.*, 1999). Existen diferentes biopolímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables entre los que destacan los polisacáridos (alginato, pectinas, celulosa, almidón y quitosano) (García *y col.*, 2004; Laohakunjit y Noomhorm, 2004; Mali *y col.*, 2005; Srinivasa *y col.*, 2004) y proteínas (globulinas, albúminas y seroalbúminas) (Krochta y Hernández-Izquierdo, 2008; Perez-Gago y Krochta, 2001), los cuales pueden ser extraídos de fuentes naturales renovables (Bergo *y col.*, 2010). Los biopolímeros pueden descomponerse más rápidamente en el ambiente que los polímeros sintéticos derivados del petróleo (polietileno, polipropileno y poliestireno), estos últimos utilizados normalmente en la elaboración de envases (Kuorwel *y col.*, 2011). Sin embargo, las películas elaboradas de polisacáridos y proteínas presentan algunos inconvenientes, entre los cuales están su carácter hidrofílico (Mali *y col.*, 2005) y una alta velocidad de transmisión de vapor de agua (Krochta y Hernández-Izquierdo, 2008; Perez-Gago y Krochta, 2001), características que limitan su aplicación.

Con el objetivo de superar dichos inconvenientes, se han realizado investigaciones en películas compuestas de almidón-quitosano (Shen-Li *y col.*, 2010; Xu *y col.*, 2005a) y proteínas-polisacáridos (Brindle y Krochta, 2008). Coughlan *y col.* (2004) evaluaron el efecto en las propiedades físicas de películas compuestas de concentrado de proteína de suero lácteo y distintos polisacáridos (alginato, pectinas, carrageninas y harina de konjac), sus resultados mostraron que las películas que contenían alginato presentaron mejores propiedades mecánicas (tensión a la fractura, porcentaje de elongación y módulo de elasticidad) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua) que las que contenían pectinas, carrageninas o harina de konjac. Las películas compuestas de distintos biopolímeros (por ejemplo, proteínas-polisacáridos) pueden ser menos permeables que las películas elaboradas con uno solo de ellos (películas simples) (Jagannath *y col.*, 2003). Se ha reportado que las películas que contienen almidón nativo en su formulación, presentan limitaciones debido principalmente a su carácter hidrofílico, por tal motivo es necesario someter al almidón a modificaciones físicas o químicas (Rivas-González *y col.*, 2009; Romero-Bastida *y col.*, 2011). Zamudio-Flores *y col.* (2009) elaboraron películas de almidón doblemente modificado por oxidación y acetilación de almidón nativo de plátano, y evaluaron sus propiedades físicas, mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua. Las películas elaboradas con almidón doblemente modificado presentaron mejores propiedades mecánicas que las elaboradas con cada uno de ellos por separado, además de que el carácter hidrofílico del almidón se controló mediante la modificación por acetilación (Shogren, 2003; Nuñez-Santiago *y col.*, 2010; Zamudio-Flores *y col.*, 2010a).

Otra manera de aprovechar las ventajas de las proteínas y polisacáridos para la elaboración de películas (aparte de sus mezclas físicas), es la elaboración de glicoproteínas mediante la reacción de Maillard, la cual se ve favorecida por factores físicos como son la temperatura, la presencia de altas humedades relativas y la relación molar entre grupos funcionales (carbonilos y aminos) (Jiménez-Castaño *y col.*, 2005a; Mine y Yang, 2010; Oliver *y col.*, 2006). Existen diversas investigaciones de películas elaboradas a partir de proteínas, polisacáridos y sus mezclas (Pérez-Gallardo *y col.*, 2012; Ramos *y col.*, 2013; Yoo y Krochta, 2011 y 2012); sin embargo, son escasas las publicaciones en cuanto a la elaboración de películas compuestas de glicoproteínas de almidón modificado por acetilación y proteínas obtenidas mediante la reacción de Maillard. El objetivo de este estudio consistió en obtener glicoproteínas mediante la reacción de Maillard usando almidón acetilado a dos diferentes niveles y aislado proteico de suero lácteo y elaborar películas a las cuales se les evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.

2 Metodología

2.1 Materiales

Se utilizó aislado proteico de suero lácteo (97.7% de proteína con base en materia seca) de la marca BiPRO® (Davisco Foods International, Eden Prairie, MN, EUA). Esta es una proteína no desnaturalizada, compuesta principalmente por β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, con menos de 1% de lactosa. Se utilizó glicerol (Sigma-Ultra, Toluca, Estado de México, México) al 99% de pureza. Se empleó harina de avena (*Avena sativa* L. cv Bachíniva) la cual se obtuvo de acuerdo al método reportado por Bello-Pérez *y col.* (2010), en el cual los granos de avena se remojaron (16-24 h) en una solución amortiguadora de acetato de sodio (0.02 M) la cual contenía cloruro de mercurio (0.01 M, en la relación 1:1 v/v) y después se ajustó el pH a 6.5 con una solución amortiguadora de acetato de sodio 2 M. Se utilizó una relación de grano/solución de remojo de 1:2 (p/v). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) y se agitó de manera ocasional por 24 h. La solución se desechó, y los granos se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se molieron los granos (150 g) en una licuadora (Waring Laboratory, modelo 38BL54, Torrington, Connecticut, EUA) con 500 mL de agua a la máxima velocidad por 1.5 min. La dispersión se tamizó por las mallas estándar ASTM no. 40 (425 μm), 100 (150 μm), 200 (75 μm), 270 (53 μm) y 325 (45 μm) empleando una tamizadora eléctrica (Retsch, modelo AS 200 Control, Haan, Alemania). Finalmente, se secó el filtrado (40°C) en una estufa (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Corneliuss, Oregon, USA) por 24 h.

2.2 Aislamiento del almidón y análisis químico proximal

El almidón se aisló a partir de la harina de avena de acuerdo a la metodología reportada por Hoover y col. (2010) para lo cual se formó una dispersión al 35% (p/v) con agua destilada y se ajustó a pH 9 con NaOH 1 M (en agitación constante a 250 rpm). Se dejó reposar por 4 h y después se realizó un lavado, nuevamente se dejó reposar 4 h y se repitió el lavado con agua destilada. Posteriormente, se filtró a través de un tamiz estándar de 70 μm (US 200) y se desechó el sobrenadante; el filtrado se ajustó a pH 7 con HCl 0.1 N bajo agitación constante (250 rpm) y se dejó reposar por 4 h repitiéndose este paso con 2 lavados más, dejando 4 h en reposo, después se secó en una incubadora (FinePCR, modelo combi-SV12DX, Daigger, Vernon Hills, IL, EUA) a 35°C por 24 h. Se realizó el análisis químico proximal a las muestras de almidón nativo, almidones acetilados y harina y consistió en la determinación del contenido de proteínas, lípidos, y humedad utilizando los procedimientos oficiales de la AOAC (2002) (métodos 954.01, 920.39, 942.05, y 934.01, respectivamente).

2.3 Modificación química del almidón

El almidón se modificó químicamente mediante una acetilación utilizando el método propuesto por Bello-Pérez y col. (2000). El cual consistió en formar una mezcla de 162 g de almidón y 220 mL de agua destilada a temperatura ambiente y se mezcló uniformemente durante todo el tiempo de reacción. Luego se ajustó el pH a 8 con una solución de NaOH al 3% (p/v) y se adicionaron 0.1 mol de anhídrido acético gota a gota y simultáneamente se agregó NaOH al 3% (p/v) para mantener el pH entre 8.0 y 8.4. Al finalizar la adición del anhídrido acético, el pH se ajustó a 4.5 con HCl 0.5 N, la solución se centrifugó durante 15 min a 13000 x g, se decantó el sobrenadante y se re-suspendió en agua destilada, se centrifugó nuevamente y se repitió este procedimiento dos veces más. El almidón obtenido se secó en una estufa (modelo 1350GM, VWR Scientific Inc., EUA) a 45°C durante 24 h, finalmente se molió y se tamizó en malla del número 100 (ASTM). Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico de la marca Sigma-Aldrich (Toluca, Edo. México, México).

2.3.1 Determinación del porcentaje de grupos acetilo

Se utilizó la técnica propuesta por Wurzburg (1964), la cual consistió en pesar 5 g de almidón (base seca) y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionaron 50 mL de agua destilada, unas gotas de fenolftaleína y se neutralizó con NaOH 0.1 N hasta mantener permanente el color ligeramente rosado. Se adicionaron 25 mL de NaOH 0.45 N y la suspensión se agitó durante 30 min. Posteriormente la muestra saponificada se valoró con HCl 0.2 N utilizando fenolftaleína como indicador. Se valoró al mismo tiempo un blanco utilizando almidón nativo. El porcentaje de grupos

acetilos es el porcentaje en peso de grupos acetilo en el almidón en base seca y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{Acetilo} = \left[\frac{\text{mL blanco} - \text{mL muestra}}{\text{gramos muestra (base seca)}} \right] \times N \text{ del HCl} \times 0.043 \times 100 \quad (1)$$

donde 0.043 son los miliequivalentes de grupo acetil.

2.3.2 Determinación del grado de sustitución

El grado de sustitución (GS) es el número promedio de grupos hidroxilos reemplazados por unidad de anhidro glucosa y se calculó de acuerdo al método reportado por Wurzburg (1964). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{GS} = [162(\% \text{de acetilo}/4300) - (42 \times \% \text{de acetilo})] \quad (2)$$

donde 162 es el peso molecular de la unidad anhidro glucosa; 4300 es 100 veces el peso molecular del grupo acetil; y 42 es el peso molecular del grupo acetil menos uno.

2.4 Determinación de almidón total en la harina y los almidones

La determinación de almidón total (AT) en la harina y los almidones (nativo y acetilados) se realizó con el kit de Megazyme (Megazyme International, Irlanda) basada en los métodos oficiales de la AACC 76-13 y 996-11 (AACC, 2000). Para la determinación de AT se pesaron 100 mg de muestra en un tubo de centrifuga y se agregaron 0.2 mL de etanol al 80%, posteriormente se agitó durante 18 h a 4°C y una vez transcurrido ese tiempo se le adicionaron 8 mL del búfer de acetato de sodio 1.2 M (pH = 3.8) con agitación constante (250 rpm) e inmediatamente se agregaron 0.1 mL de α -amilasa termoestable y 0.1 mL de amiloglucosidasa y, se colocaron en un baño de agua a 50°C durante 30 min con agitación constante, en seguida se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se centrifugó la solución a 1,800 x g durante 10 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un matraz y se realizaron dos lavados más con 10 mL de agua destilada y se tomaron alícuotas de 0.1 mL que se colocaron en tubos de vidrio por triplicado. La determinación de glucosa se realizó leyendo las densidades ópticas de las muestras a 510 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic Instrument, Inc. Rochester, NY, EUA). Los resultados se expresaron como g de almidón/100 g de harina, y en el caso de la pureza del almidón como % (g de almidón/100 g de muestra).

2.5 Microscopia electrónica de barrido (MEB) en los almidones

Se empleó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL (modelo JSM5800 LV, Japón). Las condiciones de operación fueron 10 kV como voltaje de aceleración

y la señal de electrones secundarios. Los almidones se dispersaron en acetona y se adhirieron con cinta de grafito de doble adhesión en un portamuestras de cobre, posteriormente se colocaron en una cámara de vacío Polaron PS3 (vacío de 0.1-0.2 torr y una corriente de 42 mA) y se cubrieron con una película delgada de oro para hacerlas conductoras al haz de electrones y finalmente se introdujeron a la cámara del microscopio para su observación. Se midieron entre 15-20 gránulos por campo para determinar el tamaño promedio.

2.6 Difracción de rayos X en los almidones

Se utilizó la técnica de difracción de rayos X reportada por Jovanovich y col. (1992) y modificado por Planchot y col. (1995) para determinar el arreglo de los componentes del almidón después de su aislamiento y modificación química. Se pesaron 20 mg de muestra de los almidones previamente hidratados (10%) y se colocaron entre dos hojas de aluminio, las cuales se sellaron herméticamente. Se utilizó un difractor de rayos X (Analitical X'pert, PRO X' Celerator, Países Bajos) con las siguientes condiciones de operación: una radiación CuK, un voltaje de 40 kV y una velocidad de barrido de 0.0607 °/s.

2.7 Obtención de las glicoproteínas

Para la elaboración de las glicoproteínas se disolvieron en agua Milli-Q (500 mL) cantidades establecidas de aislado proteico de suero y almidón modificado a diferentes relaciones molares y las soluciones se mezclaron durante 1 h a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). Las soluciones obtenidas se ultra-congelaron a -80 °C por 1.5 h. Posteriormente, las soluciones se liofilizaron y se molieron hasta obtener polvos finos. Se colocaron 75 g de cada relación en vasos de precipitado de 250 mL, posteriormente se colocaron en desecadores, con humedades relativas entre 50 y 80% aproximadamente a temperaturas de 50 y 60 °C. Por último los desecadores conteniendo las muestras se mantuvieron a sus respectivas temperaturas durante 48 h para promover la reacción de Maillard (Jiménez-Castaño y col., 2005b).

2.7.1 Determinación del grado de glicosilación e índice de obscurecimiento

Se evaluaron el porcentaje de grupos aminos bloqueados utilizando el método colorimétrico fundamentado en la reacción entre el O-ftaldialdehído (OPA) y los grupos aminos primarios de la proteína (Church y col., 1983). La solución de O-ftaldialdehído se preparó disolviendo 200 mg de O-ftaldialdehído en 5 mL de etanol puro y mezclando dicha solución con 125 mL de solución amortiguadora de tetraborato de sodio al 0.1 M (pH = 9.75), 0.5 mL de β -mercaptoetanol, 12.5 mL de dodecilsulfato sódico al 10% y aforando a 250 mL con agua destilada. La prueba consistió en mezclar 3 mL de solución O-ftaldialdehído (cubierta

con papel aluminio) con 50 μ L de solución de aislado proteico de suero lácteo (1 mg/mL equivalente de proteína) y se midió la absorbancia a 340 nm después de 1 min de incubación a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). Como blanco se utilizaron 50 μ L de agua destilada en lugar de la solución de aislado proteico de suero. Se elaboró una curva de calibración con L-lisina para la cuantificación de grupos aminos, preparando una solución madre de L-lisina (1 mg/mL), diluyéndola a concentraciones de 0.02 mg/mL hasta 0.1 mg/mL. Para calcular el número de grupos aminos disponibles se tomó en cuenta el factor de humedad (FH), el cual, se restó para considerar el peso seco. [FH = 1/100- % Humedad], siendo el % Humedad determinado gravimétricamente. Para la cuantificación de los grupos aminos disponibles se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Grupos amino disponibles} = \left(\frac{X/\text{pml}}{1/\text{pmp}} \right) \times 2 \quad (3)$$

donde X es el valor obtenido de la ecuación; pml es el peso molecular de la lisina; y pmp es el peso molecular de la proteína (18.3 kDa, dato proporcionado por el fabricante). El índice de obscurecimiento (IO) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IO} = \frac{100(X - 0.31)}{0.172} \quad (4)$$

donde $x = a + 1.75(L)/5.645(L) + a - 3.012(b)$. Para la determinación de los valores (L , a , b) se utilizó un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta, Co., Ltd., Osaka, Japón) calibrado con un estándar color blanco. Las lecturas se tomaron en puntos aleatorios sobre la superficie de las muestras (aislado proteico y glicoproteínas). Se registraron un promedio de 4 lecturas por muestra. Las mediciones del color se realizaron por triplicado.

2.8 Elaboración de las películas

2.8.1 Películas de almidón nativo y acetilados

Para la elaboración de las películas se utilizó el método propuesto por Mali y col. (2002), para lo cual se utilizó una concentración de almidón de 4% p/p en base seca con una concentración de glicerol del 2% p/p. El almidón y el glicerol se mezclaron directamente (relación 2:1, almidón/glicerol, v/v) con agua destilada para hacer lotes con un peso total de 100 g y se agregaron 14 mL de la solución formadora de película (solución filmogénica) en cajas de Petri (110 × 20 mm²) las cuales se colocaron en un desecador con una solución sobresaturada de NaBr (45 ± 5 % HR) para después secarse en una estufa (VWR, Scientific Products, modelo 1370GM-2, Corneliuss, Oregon, USA) a 25 ± 3 °C durante 48 h.

2.8.2 Películas de proteínas y glicoproteínas

Estas películas se elaboraron de acuerdo al método propuesto por Hernández-Izquierdo y Krochta (2009) el cual

consistió en formar soluciones de solución proteica al 10% (p/p), se agregaron 4 g de glicerol y se agitaron por 1 h hasta disolver y solubilizar por completo. Posteriormente, se calentaron hasta 90 °C durante 30 min en baño de aceite. Transcurridos los 30 min las soluciones se enfriaron y se agregaron 14 mL de la solución filmogénica en cajas de Petri (110 cm de diámetro) para secarse bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa que en el caso de las películas de almidón durante 48 h. Todas las películas obtenidas se almacenaron en desecadores provistos con NaBr (45 ± 5% HR) y temperatura ambiente (25 ± 3 °C) al menos por 48 h antes de evaluar cualquier propiedad.

2.9 Pruebas mecánicas

Las pruebas mecánicas consistieron en la determinación de la tensión a la fractura (TF), el porcentaje de elongación (%E) y el módulo de elasticidad (ME). Los ensayos se realizaron de acuerdo con la norma D882-95a de la American Society for Testing and Materials (ASTM, 1995) con un equipo para pruebas mecánicas TAXTPlus (Stable Micro Systems, Surrey, UK) utilizando una celda de carga de 30 kg. Para la prueba de tensión, las muestras de películas se cortaron en rectángulos de 7 cm de largo por 1 cm de ancho. Los rectángulos de películas se mantuvieron por al menos 48 h en desecadores con una solución salina saturada de NaBr (57% HR). Se determinó el espesor de cada uno de los rectángulos utilizando un micrómetro electrónico (Mitutoyo, Kobe, Japón) midiendo en 10 posiciones aleatorias a lo largo del rectángulo. El promedio de estas determinaciones se utilizó para calcular el área de sección transversal sobre la cual se ejerció la fuerza de tensión. Una vez determinado el espesor promedio de cada una de las películas, se procedió a colocarlas entre las mordazas de sujeción del equipo en un rectángulo representativo de la película. La separación entre las mordazas fue de 5 cm. Se colocó 1 cm del rectángulo de película en cada una de las pinzas de sujeción. Se utilizó una velocidad de tensión de 24 mm min⁻¹. El esfuerzo de tensión se calculó por la división de la fuerza máxima sobre la película durante la fractura entre el área de sección transversal (área = espesor promedio × ancho de la película). El porcentaje de elongación a la fractura se calculó por la medición de la extensión máxima de la película entre la separación final e inicial de las pinzas. El módulo de

elasticidad se determinó de la pendiente que se obtuvo durante el comportamiento lineal de la curva de esfuerzo-deformación. Se realizaron diez determinaciones por cada tipo de formulación de película.

2.10 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA, se determinó empleando el método gravimétrico estándar E96-80 (ASTM, 1989), conocido como el método de la copa o celda de prueba. Las películas se cortaron en forma circular y posteriormente se colocaron sobre la parte superior de las celdas de prueba (área = 0.00273 m²). En el interior de las celdas se colocó sílica gel (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), previamente activada y colocada en la estufa, para generar una humedad relativa cercana al 0%; cada celda se dispuso en un desecador, el cual contenía una solución saturada de NaCl con una humedad relativa constante del 75%.

Se registraron los cambios en el peso de las celdas cada hora durante al menos 6 h. Se realizó un análisis de regresión lineal con los datos registrados de la ganancia de peso en función del tiempo con lo cual se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua, a partir de la pendiente de la línea recta (g s⁻¹) dividida entre área de la celda de permeación (m²). En todos los casos se obtuvieron coeficientes de regresiones mayores o iguales a 0.97. Después de las pruebas de permeación, se midió el grosor (micrómetro manual electrónico Mitutoyo, Kobe, Japón) de cada película en 10 puntos aleatorios para la determinación de la PVA (g Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹). Todas las pruebas se realizaron a una temperatura ambiente (20 ± 5°C) y por triplicado para cada formulación de película.

2.11 Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron con un diseño completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$). Para la obtención de los resultados se utilizó el programa estadístico SAS System for Windows 9.0. Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey (Walpole y col., 1999).

Tabla 1. Composición química (%) de la muestra de harina de avena, almidón nativo de avena y almidones acetilados de avena a los diferentes niveles.

Muestra	Humedad			
Harina	7.63 ± 0.01 ^a	10.13 ± 0.36 ^a	4.93 ± 0.37 ^a	77.50 ± 3.28 ^a
Nativo	6.93 ± 0.01 ^b	0.52 ± 0.03 ^b	1.73 ± 0.15 ^b	90.13 ± 2.15 ^b
AANB	2.82 ± 0.02 ^c	0.49 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.07 ^c	83.17 ± 1.70 ^c
AANM	4.21 ± 0.05 ^d	0.38 ± 0.03 ^c	0.77 ± 0.07 ^c	81.20 ± 2.25 ^c

Media aritmética de tres determinaciones ± error estándar. Medias dentro de cada columna con letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). ¹Nativo = almidón nativo; AANB = almidón acetilado de nivel bajo; AANM = almidón acetilado nivel medio. ²Factor de $N_2 = 6.25$.

3 Resultados y discusión

3.1 Análisis químico proximal

En la Tabla 1 se muestra el resultado del análisis químico proximal de la harina y de los diferentes almidones. El contenido de humedad fue menor en los almidones acetilados, ya que la modificación disminuyó el carácter hidrofílico del almidón por la introducción de grupos éster hidrofóbicos en la molécula de anhidroglucosa, provocando impedimentos estéricos (Shogren, 1996; Xu y col., 2005b). En el contenido de proteínas y lípidos se observó una disminución en los almidones con respecto a la harina, lo cual puede ser debido a que en la extracción y modificación del almidón se eliminaron restos del grano como pericarpio y pedicelo, los cuales contenían estos componentes en su estructura. Un contenido bajo de proteínas y lípidos en el almidón nativo ayuda a obtener una mejor modificación y por lo tanto un almidón modificado con mejores características fisicoquímicas y funcionales (Nuñez-Santiago y col., 2011). La avena presenta un alto contenido de almidón, el cual es el componente mayoritario de este cereal. El almidón que se aisló de la avena presentó una alta pureza (90%) medida como almidón total (AT), la cual disminuyó cuando se modificó (Tabla 1). La disminución en el contenido de AT en los almidones modificados con diferente grado de sustitución se debe a los cambios que producen los agentes químicos sobre la estructura del almidón, la cual no es reconocida por las enzimas que hidrolizan el almidón durante su cuantificación, disminuyendo su cantidad (Guerra-Della Valle y col., 2009; Mirmoghhtadaie y col., 2009; Zamudio-Flores y col., 2010b).

3.2 Cuantificación del porcentaje de grupos acetilo y grado de sustitución

El porcentaje de grupos acetilo y el grado de sustitución de los almidones modificados se muestra en la Figura 1, en donde se aprecia que el almidón acetilado de nivel bajo (AANB) presentó valores de 2.04 y 0.07 para el porcentaje de grupos acetilo (% GA) y grado de sustitución (GS), respectivamente. Otros investigadores reportaron valores similares en muestras de almidones acetilados (Wang y col., 2012; Kapelko y col., 2012) utilizando anhídrido acético. El almidón acetilado de nivel medio (AANM) presentó valores de GA y GS de 6.43% y 0.25, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Afolabi y col. (2010), quienes encontraron valores de GS de 0.38 en almidón acetilado de mijo africano (Eleusine coracana). Estos resultados comprobaron que se tenían dos almidones acetilados con diferente grado de sustitución (bajo y medio) y por lo tanto con diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales.

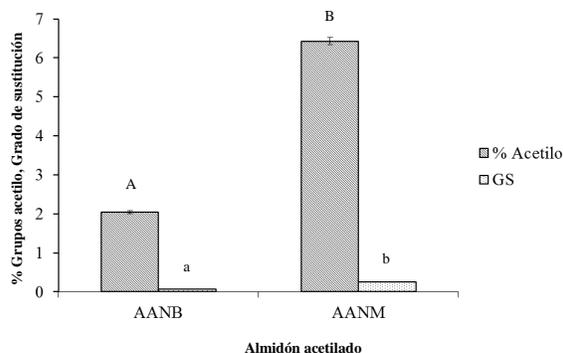


Fig. 1. Porcentaje de grupos acetilo (% Acetilo) y del grado de sustitución (GS) en las muestras de almidones acetilados. Promedios de tres determinaciones \pm barras de error estándar. Letras diferentes (mayúsculas y minúsculas) en las barras de error estándar representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Para identificación de las muestras, ver Tabla 1.

3.3 Caracterización morfológica de los almidones nativo y acetilado

El análisis morfológico de los diferentes almidones se muestra en la Figura 2. Los gránulos del almidón nativo presentaron forma poliédrica, mientras que otros son ovoides o hemisféricos, con tamaños entre 2-8 μm , lo cual es característico de los almidones de este tipo de cereal (Zhou y col., 1998). La superficie de los gránulos nativos se observa lisa, sin la presencia de poros o canales, lo cual pudiera facilitar la modificación química (Kim y Huber, 2008). Estas características morfológicas que presenta el almidón nativo indican que el proceso de aislamiento se realizó en forma adecuada. Los almidones de avena acetilados (bajo y medio) mostraron un ligero cambio en sus características morfológicas, lo cual fue más evidente cuando incrementó el grado de sustitución (Figura 2). Esto es debido a que el proceso de modificación induce cambios en la superficie de algunos gránulos, con salida de algunas cadenas de amilosa que produce la unión de algunos de ellos. La acetilación del almidón nativo de arroz (con un tamaño de gránulo pequeño, similar al de avena) con vinil acetato y anhídrido acético mostró ligeros cambios en la morfología (González y Pérez, 2002). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido también concuerdan con el comportamiento reportado por Sánchez-Rivera y col. (2010), quienes indicaron que a mayor concentración del reactivo utilizado en la reacción de modificación por acetilación con anhídrido acético, mayor fue la fusión de los gránulos del almidón y por lo tanto existió un cambio en su morfología, cambiando la forma ovoide del gránulo al pasar de un nivel bajo de acetilación a un nivel medio de acetilación.

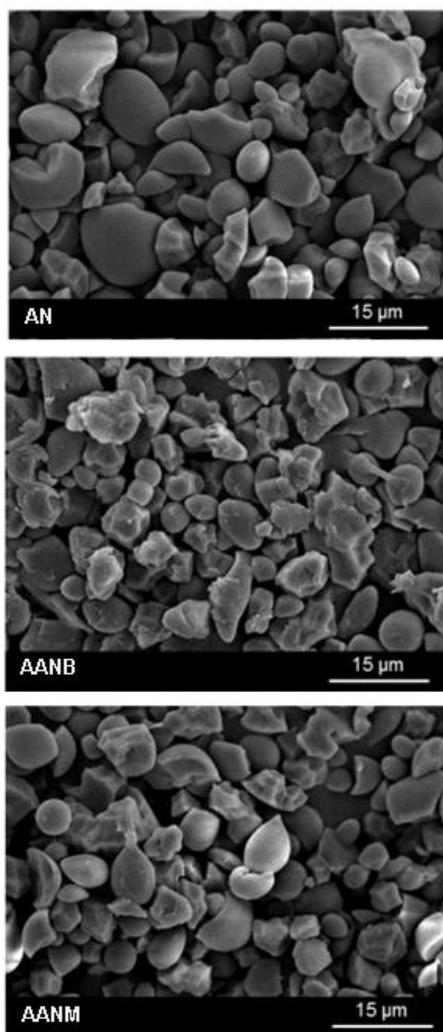


Fig. 2. Micrografías en MEB de las muestras de almidón nativo (AN), almidón acetilado a nivel bajo (AANB) y almidón acetilado a nivel medio (AANM) a 2000X.

3.4 Difracción de rayos X

En todas las muestras se observaron picos de cristalinidad en el ángulo de difracción $2\theta = 14, 17, 18, 20$ y 23° (Figura 3). El almidón nativo y los acetilados mostraron un patrón de difracción de rayos X tipo A, característico de los cereales (Zobel, 1988). El patrón de difracción del almidón nativo muestra que durante el aislamiento el almidón no sufrió ninguna modificación en su arreglo cristalino, con un valor de cristalinidad de 24%. Esto coincide con el estudio morfológico que muestra gránulos intactos o completos, sin daño aparente en su superficie. Una ligera disminución en los picos a $2\theta = 14$ y 20° se observó en los almidones acetilados, la cual fue mayor cuando incrementó el nivel de acetilación, indicando que la acetilación modificó ligeramente el arreglo

de las cadenas de la amilopectina. Prieto-Méndez y *col.*, (2010) reportaron que debido a que la acetilación se lleva a cabo principalmente en la región amorfa, y al no tener un alto grado de sustitución, la región cristalina posiblemente no es dañada, lo cual se observa en el patrón de difracción de los almidones acetilados y en las imágenes de microscopía electrónica de barrido (Figura 2).

3.5 Determinación del grado de glicosilación mediante el OPA (oftadialdehído) e índice de obscurecimiento de las glicoproteínas

En la Tabla 2 se muestra el resultado del nivel de glicosilación para las diferentes glicoproteínas obtenidas. El porcentaje de grupos amino disponibles osciló de 28.9, para la proteína de suero lácteo (APSL), hasta 18.7, para la glicoproteína obtenida de almidón acetilado nivel medio y alto nivel de glicosilación (GMA). La muestra GMA presentó el mayor porcentaje de grupos amino bloqueados, mientras que la glicoproteína GBB mostró el menor porcentaje de grupos amino bloqueados. Esto es consistente con los niveles bajos (GBB) y altos (GMA) de las glicoproteínas. El índice de obscurecimiento mostró un comportamiento inverso con respecto al porcentaje de grupos amino disponibles, observando que a medida que disminuyó el contenido de grupos amino disponibles aumentó el índice de obscurecimiento. Estos resultados indicaron que el grado de la reacción de Maillard fue mínimo, lo cual podría indicar que sólo se llegó a la primera etapa de la reacción, conocida como el re-arreglo de Amadori. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Jiménez-Castaño y *col.* (2005b) quienes observaron, mediante el empleo de un diseño central compuesto, que las condiciones óptimas para alcanzar la máxima formación del compuesto de Amadori entre β -lactoglobulina y un carbohidrato (dextrano) fueron de 60°C , 44 % HR, una relación en peso 2:1 (de dextrano a β -lactoglobulina) con un tiempo de reacción de 48 h.

3.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas evaluadas en las películas fueron la tensión a la fractura (TF), el porcentaje de elongación (%E) y el módulo de elasticidad (ME). En la Figura 4, se muestran los cambios de TF en las películas en función de los distintos almidones, glicoproteínas y mezcla que se usaron para obtenerlas, presentando los mayores valores las películas de APSL seguidas de la mezcla (MAA) y las películas de GMA con valores de 5.83, 3.34 y 2.37 MPa, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Yoo y Krochta (2011) reportaron resultados similares a los obtenidos en esta investigación en películas de APSL (5.1 MPa) y películas de mezclas de APSL con almidón de maíz normal (25 % amilosa) (2.8 MPa).

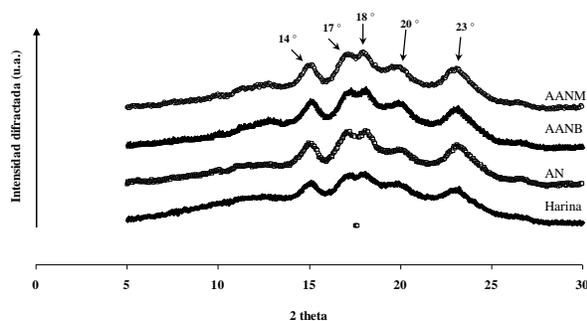


Fig. 3. Difracción de rayos X de las muestras de harina (Harina), almidón nativo (AN) y almidones acetilados (AANB = almidón acetilado nivel bajo; AANM = almidón acetilado nivel medio).

En otro estudio realizado por Brindle y Krochta (2008) se reportaron en películas de mezclas de APSL-hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) valores muy superiores (14 MPa) en comparación con los de la mezcla APSL-almidón de avena de esta investigación. El valor de 2.37 de la película de GMA en esta propiedad pueden ser debidos a que el APSL y el almidón están unidos por enlaces covalentes que son enlaces fuertes difíciles de romper, por lo tanto, no existe una separación de fases entre los biopolímeros, lo que generalmente provoca propiedades mecánicas inferiores. Por lo general cuando existe una buena interacción entre los componentes, se genera un incremento en las propiedades de tensión a la fractura (Shonaik y Simon, 1999). En cuanto al porcentaje de elongación (Figura 5), las películas de la mezcla almidón-APSL (MAA) presentaron el valor mayor (92.30%); sin embargo, no se observaron diferencias significativas con las películas de GBA, GMM y GMA.

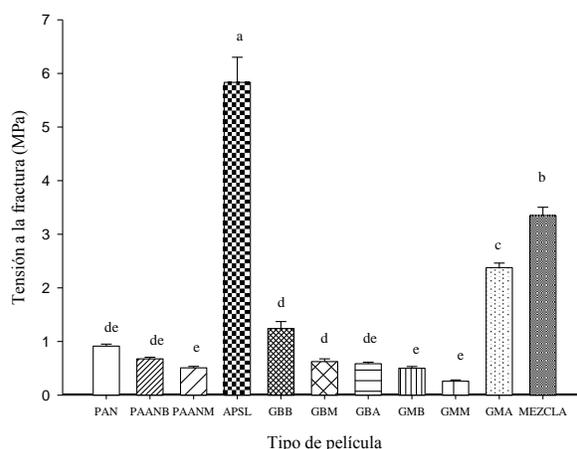


Fig. 4. Tensión a la fractura de las películas. Promedios de diez determinaciones \pm barras de error estándar. Letras diferentes en las barras de error estándar representan diferencias significativas ($p < 0.05$). PAN = Almidón nativo; PAANB = Almidón acetilado nivel bajo; PAANM = Almidón acetilado nivel medio; APSL = Aislado proteico de suero lácteo; GBB = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación bajo; GBM = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación medio; GBA = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación alto; GMB = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación bajo; GMM = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación medio; GMA = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación alto; MEZCLA = Mezcla de almidón-aislado proteico antes de la reacción de Maillard.

Tabla 2. Composición química (%) de la muestra de harina de avena, almidón nativo de avena y almidones acetilados de avena a los diferentes niveles.

Muestra (Nomenclatura ¹)	Grupos amino disponibles	Porcentajes de grupos aminos bloqueados	Índices de obscurecimiento
APSL	28.90 \pm 1.50 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	4.31 \pm 0.30 ^{ac}
GBB	23.72 \pm 0.70 ^b	1.53 \pm 0.20 ^b	5.43 \pm 0.25 ^b
GBM	22.57 \pm 0.56 ^b	1.87 \pm 0.51 ^b	6.18 \pm 0.11 ^b
GBA	23.15 \pm 0.80 ^b	1.70 \pm 0.25 ^b	4.09 \pm 0.21 ^c
GMB	23.30 \pm 0.30 ^c	2.10 \pm 0.10 ^c	7.78 \pm 0.33 ^d
GMM	19.65 \pm 0.50 ^d	2.75 \pm 0.15 ^d	8.90 \pm 0.50 ^e
GMA	18.70 \pm 0.17 ^e	3.30 \pm 0.18 ^e	9.35 \pm 0.20 ^e

Media aritmética de tres determinaciones \pm error estándar. Valores promedio con letras iguales dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). ¹APSL = Aislado proteico de suero lácteo; GBB = Glicoproteína de almidón acetilado nivel bajo y nivel de glicosilación bajo; GBM = Glicoproteína de almidón acetilado nivel bajo y nivel de glicosilación medio; GBA = Glicoproteína de almidón acetilado nivel bajo y nivel de glicosilación alto; GMB = Glicoproteína de almidón acetilado nivel medio y nivel de glicosilación bajo; GMM = Glicoproteína de almidón acetilado nivel medio y nivel de glicosilación medio; GMA = Glicoproteína de almidón acetilado nivel medio y nivel de glicosilación alto.

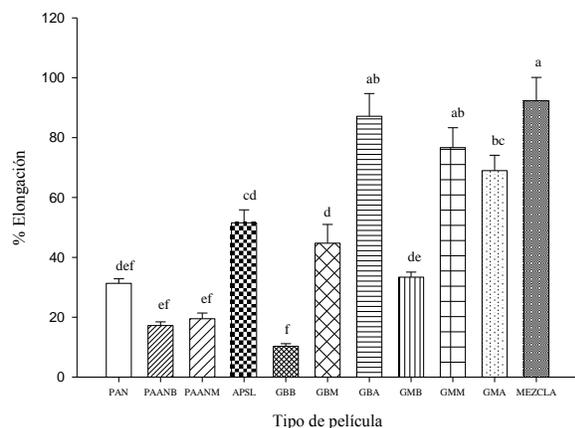


Fig. 5. Porcentaje de elongación de las películas. Promedios de diez determinaciones \pm barras de error estándar. Letras diferentes en las barras de error estándar representan diferencias significativas ($p < 0.05$). PAN = Almidón nativo; PAANB = Almidón acetilado nivel bajo; PAANM = Almidón acetilado nivel medio; APSL = Aislado proteico de suero lácteo; GBB = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación bajo; GBM = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación medio; GBA = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación alto; GMB = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación bajo; GMM = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación alto; GMA = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación alto; MEZCLA = Mezcla de almidón-aislado proteico antes de la reacción de Maillard.

Estos valores son superiores a los reportados en películas de mezclas APSL-almidón de maíz normal (25% amilosa) (APSL-AR) con un valor de 88%, pero inferiores a los valores de las mezclas de APSL-almidón ceroso de maíz (APSL-ACM) con un valor superior al 100% (Yoo y Krochta, 2011). Las películas de las mezclas de APSL-AR y APSL-ACM presentan valores superiores a las mezclas de APSL con otros polisacáridos (metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y alginato de sodio) por lo tanto los valores altos en el porcentaje de elongación de películas de glicoproteínas GBA, GMM y GMA pueden ser atribuidos a la factibilidad del almidón y el glicerol para interactuar con el APSL (Yoo y Krochta, 2011).

Por otro lado, el módulo de elasticidad (ME) es una propiedad que permite conocer el grado de rigidez en un material. Los valores mayores de ME lo presentaron las películas de APSL, seguido por las películas elaboradas de la mezcla física de aislado proteico y almidón (MEZCLA) y las películas GBB, sin que se observaran cambios significativos ($p > 0.05$) entre estas dos últimas (Figura 6). El valor del ME de las películas de APSL fue tres veces superior al reportado (200 MPa) por Yoo y Krochta (2011), este alto

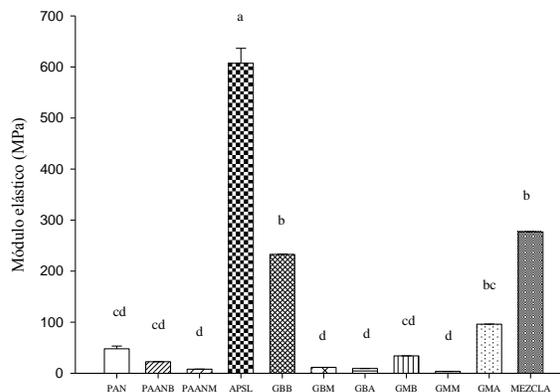


Fig. 6. Módulo de elasticidad de las películas. Promedios de diez determinaciones \pm barras de error estándar. Letras diferentes en las barras de error estándar representan diferencias significativas ($p < 0.05$). PAN = Almidón nativo; PAANB = Almidón acetilado nivel bajo; PAANM = Almidón acetilado nivel medio; APSL = Aislado proteico de suero lácteo; GBB = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación bajo; GBM = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación medio; GBA = Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación alto; GMB = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación bajo; GMM = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación medio; GMA = Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación alto; MEZCLA = Mezcla de almidón-aislado proteico antes de la reacción de Maillard.

valor fue atribuido a la interacción de puentes disulfuro en la matriz de la película. Los valores menores de ME de las películas de glicoproteínas GBB, GMA y la mezcla (MEZCLA) posiblemente se debieron a que no se logró una total desnaturalización de la glicoproteína, además de que en la matriz de las películas pudieron formarse otras interacciones como puentes de hidrógeno entre grupos amino de la proteína y grupos carboxilo del almidón, los cuales, son enlaces más débiles que los puentes disulfuro, por lo tanto disminuyeron el modulo elástico de las películas (Damodaran y Agyare, 2013).

3.7 Permeabilidad al vapor de agua

Los resultados de permeabilidad al vapor de agua (PVA) se muestran en la Tabla 3. En general, las películas mostraron un comportamiento similar en cuanto a la PVA, ya que el valor más bajo se presentó en las películas con la formulación PAANM (almidón acetilado nivel medio) con un valor de 15.14×10^{-11} ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$). No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la transferencia de moléculas de agua con los otros tratamientos. Los valores mayores de PVA los presentaron las película que se obtuvieron de la mezcla física de almidón-APSL y APSL

Tabla 3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.

Película (Nomenclatura)	PVA $\times 10^{-11}$ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Almidón nativo (PAN)	23.81 \pm 3.10 ^{cde}
Almidón acetilado nivel bajo (PAANB)	21.81 \pm 0.10 ^{de}
Almidón acetilado nivel medio (PAANM)	15.14 \pm 1.05 ^e
Aislado proteico de suero lácteo (APSL)	35.15 \pm 1.84 ^{ab}
Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación bajo (GBB)	25.48 \pm 4.93 ^{bcd}
Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación medio (GBM)	20.11 \pm 0.82 ^{de}
Glicoproteína de nivel de acetilación bajo y nivel de glicosilación alto (GBA)	23.07 \pm 1.16 ^{de}
Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación bajo (GMB)	26.98 \pm 0.25 ^{abcd}
Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación medio (GMM)	23.07 \pm 0.88 ^{cde}
Glicoproteína de nivel de acetilación medio y nivel de glicosilación alto (GMA)	24.84 \pm 0.66 ^{cde}
Mezcla de almidón-aislado proteico antes de la reacción de Maillard (MEZCLA)	39.24 \pm 1.23 ^a

Media aritmética de cuatro determinaciones \pm error estándar. Valores promedio con letras iguales dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

(39.24 y 35.15 $\times 10^{-11}$ g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹, respectivamente), lo cual puede ser debido a la naturaleza hidrofílica del aislado proteico de suero lácteo. El valor más bajo de PVA en la película PAANM se puede atribuir al hecho de que el almidón acetilado a nivel medio contiene en su estructura grupos ésteres, los cuales disminuyeron el carácter hidrofílico del almidón y por lo tanto el de la película como fue reportado en almidones acetilados de plátano (Zamudio-Flores y *col.*, 2009 y 2010a).

Conclusiones

Se obtuvieron almidones modificados a dos niveles de acetilación. La caracterización morfológica mostró un cambio ligero en los gránulos de almidón, el cual, fue más notorio cuando incrementó el nivel de acetilación, lo cual se corroboró con el estudio de difracción de rayos X. Fue factible obtener películas de glicoproteínas mezcladas con proteína de suero lácteo, las cuales no mostraron cambios significativos en la propiedad mecánica de tensión a la fractura, a excepción de la película elaborada con el nivel medio de acetilación y alto nivel de glicosilación, presentando mayor tensión a la fractura que el resto de las películas de glicoproteínas. Los resultados de las pruebas mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua indicaron que las películas de glicoproteínas podrían ser utilizadas como materiales de recubrimiento para controlar la respiración y la senescencia de frutas y vegetales, debido a las propiedades mecánicas y de barrera determinadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Arturo Ramos Martínez, Salvador Ramírez Mancinas y Juan Manuel Tirado Gallegos por sus asistencias técnicas. El presente trabajo fue financiado por el CONACYT y el Gobierno del Estado de Chihuahua a través del proyecto FOMIX con clave CHIH-2009-C02-126281. LABP agradece los apoyos de COFAA-IPN y EDI-IPN.

Referencias

- AACC (2000). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemist*. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, EUA. 10 ed.
- Afolabi, T.A., Olu-Owolabi, B.I., Adebowale, K.O., Lawal, O.S. y Akintayo, C.O. (2012). Functional and tableting properties of acetylated and oxidized finger millet (Eleusine coracana) starch. *Starch/Stärke* 64, 326-337.
- AOAC (2002). *Official Methods of Analysis (18th ed.)*. Association of Official Analytical Chemist, Gaithersburg, MA, EUA.
- ASTM D-882-95a. (1995). *Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting*.
- ASTM E-96-80. (1989). *Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form*.
- Bello-Pérez, L.A., Contreras-Ramos, S.M., Jiménez-Aparicio, A. y Paredes-López, O. (2000). Acetylation

- and characterization of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Acta Científica Venezolana* 51, 143-149.
- Bello-Pérez, L.A., Sánchez-Rivera, M.M., Núñez-Santiago, C., Rodríguez-Ambríz, S.L. y Román-Gutiérrez, A.D. (2010). Effect of the pearled in the isolation and the morphological, physicochemical and rheological characteristics of barley starch. *Carbohydrate Polymers* 81, 63-69.
- Bergo, P., Sobral, P.J.A. y Priso, J.M. (2010). Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. *Journal of Food Processing and Preservation* 34, 401-410.
- Brindle, V.M. y Krochta, J.M. (2008). Physical properties of whey protein-hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. *Journal of Food Science* 73, E446-E454.
- Cao, X., Chang, P.R. y Huneault, M.A. (2008). Preparation and properties of plasticized starch modified with poly(ϵ -caprolactone) based waterborne polyurethane. *Carbohydrate Polymers* 71, 119-125.
- Choi, E., Kim, C. y Park, J.J. (1999). Structure-property relationship in PCL/starch blend compatibilized with starch-g-PCL copolymer. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 37, 2430-2438.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using O-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66, 1219-1227.
- Coughlan, K., Shaw, N.B., Kerry, J.F. y Kerry, J.P. (2004). Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science* 69, E271-E275.
- Damodaran, S. y Agyare, K. (2013). Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 30, 12-18.
- García, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers* 56, 339-345.
- Guerra Della, D., Sánchez-Rivera, M.M., Zamudio-Flores, P.B., Méndez-Montealvo, G. y Bello-Pérez, L.A. (2009). Efecto del tipo de modificación en las características fisicoquímicas y reológicas del almidón de plátano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 197-203.
- Hernández-Izquierdo, V.M. y Krochta, J.M. (2009). Thermal transitions of heat-sealing of glycerol-plasticized whey protein films. *Packaging Technology and Science* 22, 255-260.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H.J. y Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches. *Food Research International* 43, 399-413.
- Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K. y Bawa, A.S. (2003). Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science* 88, 64-71.
- Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño R., Olano A. y Villamiel M. (2005a). Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry* 93, 689-695.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Álvarez, P.J., Olano, A. y López-Fandiño, R. (2005b). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 19, 831-837.
- Jovanovich, G., Zamponi, R.A., Lupano, C.E. y Añón, M.C. (1992). Effect of the water content on the formation and dissociation of the amylose-lipid complex in wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1789-1793.
- Kapelko, M., Zieba, T. y Michalski, A. (2012). Effect of the production method on the properties of RS3/RS4 type resistant starch. Part 2. Effect of a degree of substitution on the selected properties of acetylated retrograded starch. *Food Chemistry* 135, 2035-2042.
- Krochta, J.M. y Hernández-Izquierdo, V.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation. *Journal of Food Science* 73, R30-R39.
- Kuorwel, K.K., Cran, J.M., Sonneveld, K., Miltz, J. y Bigger, S.W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science* 76, R90-R102.
- Laohakunjit, N. y Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch/Stärke* 56, 348-356.
- Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrates Polymers* 50, 379-386.
- Mali, S., Sakanaka, L.S., Yamashita, F. y Grossman, M.V.E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers* 60, 283-289.
- Mine, Y. y Yang, M. (2010). *Functional properties of egg components in food systems. En: Handbook of Poultry Science and Technology.* John Wiley and Sons, Inc. New Jersey.
- Mirmoghtadaie, L., Kadivar, M. y Shahedi, M. (2009). Effects of cross-linking and acetylation on oat starch properties. *Food Chemistry* 116, 709-713.
- Núñez-Santiago, C., García-Suárez, F.J.L., Román-Gutiérrez, A.D. y Bello-Pérez, L.A. (2010). Effect of reagent type on the acetylation of barley and maize starches. *Starch/Stärke* 62, 489-497.

- Núñez-Santiago, M.C., García-Suárez, F.J., Gutiérrez-Meraz, F., Sánchez-Rivera, M.M. y Bello-Pérez, L.A. (2011). Some intrinsic and extrinsic factors of acetylated starches: Morphological, physicochemical and structural characteristics. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 501-512.
- Oliver, C.M., Melton, L.D. y Stanley, R.A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 337-350.
- Perez-Gago, M.B. y Krochta, J.M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science* 66, 705-710.
- Pérez-Gallardo, A., Bello-Pérez, L.A., García-Almendárez, B., Montejano-Gaitán, G., Barbosa-Cánovas, G. y Regalado, C. (2012). Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability, solubility, and opacity of films. *Starch/Stärke* 64, 27-36.
- Planchot, V., Colona, P., Gallant, D.J. y Bouchet, B. (1995). Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Cereal Science* 21, 163-17.
- Prieto-Méndez, J., Trejo-Cárdenas C.L., Prieto-García, F., Méndez-Marzo, M.A., Bello-Pérez, L. A. y Román-Gutiérrez, A.D. (2010). Acetilación y caracterización del almidón de cebada. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 6, 32-43.
- Ramos, O.L., Reinas, I., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Cerqueira, M.A., Pereira, R.N., Vicente, A. A., Poças, M.F., Pintado, M.E. y Malcata, F.X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids* 30, 110-122.
- Rivas-González, M., Zamudio-Flores, P.B. y Bello-Pérez, L.A. (2009). Efecto del grado de acetilación en las características morfológicas y fisicoquímicas del almidón de plátano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 291-297.
- Romero-Bastida, C.A., Zamudio-Flores, P.B. y Bello-Pérez, L.A. (2011). Antimicrobianos en películas de almidón oxidado de plátano: Efecto sobre la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 445-453.
- Sánchez-Rivera, M.M., Flores-Ramírez, I., Zamudio-Flores, P.B., González-Soto, R.A., Rodríguez-Ambríz, S.L. y Bello-Pérez, L.A. (2010). Acetylation of banana (*Musa paradisiaca* L.) and maize (*Zea mays* L.) starches using a microwave heating procedure and iodine as catalyst: Partial characterization. *Starch/Stärke* 62, 155-164.
- Shen-Li, X., Wu, J.M., Chen, Y. y Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids* 24, 285-290.
- Shogren, R.L. (1996). Preparation, thermal properties and extrusion of high-amylose starch acetates. *Carbohydrate Polymers* 29, 57-62.
- Shogren, R.L. (2003). Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction. *Carbohydrate Polymers* 52, 319-326.
- Shonaike, G.O. y Simon, G.P. (1999). *Polymer blends and alloys*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R. y Tharanathan, R.N. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering* 63, 79-85.
- Walpole, R.E., Myers, R.H. y Myers, S.L. (1999). *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. 6a. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, México.
- Wang, Y., Ju, B. y Zhang, S. (2012). Viscosity properties of acetylated carboxymethyl starch. *Carbohydrate Polymers* 90, 696-702.
- Wurzburg, O.B. (1964). *Acetylation*. En: *Methods in carbohydrate chemistry Vol. IV*. (R.L. Whistler, R.J. Smith, J.N. BeMiller y M.L. Wolfom, eds.), Academic Press, New York, Pp. 312-320.
- Xu, Y.X., Dzenis, Y. y Hanna, M.A. (2005b). Water solubility, thermal characteristics and biodegradability of extruded starch acetate foams. *Industrial Crops and Products* 21, 361-368.
- Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A. y Nag, D. (2005a). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products* 21, 185-192.
- Yoo, S. y Krochta J.M. (2011). Whey protein-polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2628-2636.
- Yoo, S. y Krochta, J.M. (2012). Starch-methylcellulose-whey protein film properties. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 255-261.
- Zamudio-Flores, P.B., Bautista-Baños, S., Salgado-Delgado, R. y Bello-Pérez, L.A. (2009). Effect of oxidation level on the dual modification of banana starch: The mechanical and barrier properties of its films. *Journal of Applied Polymer Science* 112, 822-829.
- Zamudio-Flores, P.B., Vargas-Torres A., Gutiérrez-Meraz F. y Bello-Pérez L.A. (2010b). Physicochemical characterization of dually-modified banana starch. *Agrociencia* 44, 283-295.

- Zamudio-Flores, P.B., Vargas-Torres, A., Salgado-Delgado, R. y Bello-Pérez, L.A. (2010a). Influence of the oxidation and acetylation of banana starch on the mechanical and water barrier properties of modified starch and modified starch/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 115, 991-998.
- Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M. y Helliwell, S. (1998). Structure and pasting properties of oat starch. *Cereal Chemistry* 75, 273-281.
- Zobel, H.F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke* 40, 44-50.