



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**MODIFICACIÓN DEL ALMIDÓN DE MAÍZ PARA
TRATAMIENTO DE LA GLUCOGENOSIS TIPOS I Y III**

Por:

Ana Lucia Cota Ojeda

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comite designado para la revision de la tesis de Ana Lucia Cota Ojeda, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



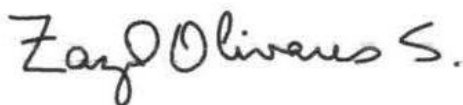
Dra. Ana Maria Calderon de la Barca
Directora de tesis



Dra. Luz del Carmen Montoya Ballesteros
Integrante del comité de tesis



Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Integrante del comité de tesis



M.C. Irma Zazil Olivares Sandoval
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Modificación del Almidón de Maíz para Tratamiento de la Glucogenosis Tipos I y III” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Ana Lucia Cota Ojeda, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del programa.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por abrirme sus puertas y darme un espacio donde seguir preparándome.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana María Calderón, por abrirme las puertas de su laboratorio y la confianza depositada en mí. Gracias por creer en mi capacidad incluso cuando yo no creía en ella, por las incontables tazas de café, anécdotas, risas, regaños, y por una valiosísima amistad.

A los miembros de mi comité de tesis por todas las valiosas aportaciones a este trabajo, Dra. Alma Rosa Islas y Dra. Luz del Carmen Montoya, así como especialmente a la M.C. Irma Zazil Olivares, quien atiende niños con glucogenosis y sugirió la temática de la tesis.

A la Dra. Ofelia Rouzaud, del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, por su aporte sobre las condiciones de procesamiento y su apoyo en calorimetría diferencial de barrido, los cuales fueron clave para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Proteínas, gracias por hacer más ameno el trabajo y el día a día, los festejos, las pláticas y confidencialidades, así como por su ayuda para la realización de esta tesis, la cual es resultado del trabajo en equipo.

A René Valenzuela, gracias por la paciencia y todas las enseñanzas sobre el material y técnicas de laboratorio, por las risas y bromas que siempre sacaban una sonrisa.

A Adriana Bolaños, por su disponibilidad hacia los estudiantes y por recibirnos siempre con una sonrisa, y por su apoyo en la edición de incontables documentos.

A mis maestros y compañeros de CIAD que a lo largo de estos años contribuyeron a mi formación.

A mis hermanos, Francisco, Natalia y Daniel por su apoyo incondicional y enseñarme grandes cosas, cada uno a su manera. Así como a mi cuñado Juan Pablo, que se volvió parte de la familia.

A Ma. del Carmen Ojeda y Gerson Amparán, por ser parte fundamental de mi vida, por sus consejos, y cariño.

DEDICATORIA

A mis padres, Ma. Concepción y Francisco. Mamá, gracias por siempre estar al pendiente de mí, por las comidas, llamadas y ánimos. Papá, eres mi mayor ejemplo de esfuerzo, perseverancia y ética. Este y todos los logros de mi vida son por y para ustedes.

A mi esposo Juan Pablo, por toda tu ayuda, apoyo y amor. Te admiro tanto. Gracias por todo.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, ¡lo logramos! Este trabajo es suyo.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	13
2.1. Glucogenosis Tipos I y III	13
2.2. Tratamiento Dietario.....	17
2.3. Tratamiento.....	19
2.3.1. Sonda Nasogástrica/Gastrostomía	20
2.3.2. Almidón de Maíz Crudo	20
2.3.3. Almidón de Maíz Modificado y Otras Fuentes	22
2.3.4. Otras Terapias	23
2.4. Modificaciones del Almidón	25
2.4.1. Modificación Química	25
2.4.2. Modificación Enzimática.....	26
2.4.3. Modificaciones Físicas	26
2.4.3.1. Modificaciones no térmicas	27
2.4.3.2. Modificaciones térmicas	27
2.5. Planteamiento del Problema	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo General.....	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Materiales	32
5.2. Análisis de los Productos Comerciales.....	32
5.2.1. Contenido de Amilosa y Amilopectina.....	32
5.2.2. Velocidad de Hidrólisis	33
5.3. Diseño y Aplicación de los Tratamientos.....	35
5.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido	35

CONTENIDO (continuación)

5.3.2. Modificación del Almidón con Calor Húmedo	35
5.4. Análisis de Digestibilidad de Almidón.....	36
5.5. Escalamiento de la Modificación del Almidón	37
5.6. Evaluación del Almidón Modificado Térmicamente en Humanos	38
5.7. Análisis de Datos	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Contenidos de Amilosa y Amilopectina en Fuentes de Almidón.....	40
6.2. Selección de Condiciones para el Tratamiento Térmico	41
6.3. Selección de Condiciones y Características de los Productos	42
6.3.1. Condiciones de Tratamiento Térmico.....	42
6.3.2. Tipos de Almidón en los Productos Obtenidos	44
6.4. Almidón Modificado Masivamente	48
6.4.1. Almidón de Rápida y Lenta Digestión	48
6.4.2. Contenido de Amilosa y amilopectina.....	48
6.4.3. Cambios en Transición Térmica	49
6.4.4. Evaluación en Humanos Adultos.....	50
7. CONCLUSIÓN	55
8. REFERENCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolismo del glucógeno hepático.....	13
2	Principales métodos térmicos de modificación de almidones.....	27
3	Cambios en la transición de fase del almidón de maíz a diferentes porcentajes de humedad.....	41
4	Cambios en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo para Maizena®, Glycosade® y producto de Maizena tratada 5 h a 90°C	43
5	Dendograma de los tipos de almidón de los diferentes tratamientos.....	47
6	Cambios en transición de fase del almidón de maíz (Maizena ®) sin modificar y almidón de maíz modificado, a 30% de humedad.....	50
7	Concentración de glucosa (mg/dL) en sangre de los participantes después de la toma de almidón modificado durante 5 h de ayuno.....	52
8	Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) tras la toma de Glycosade y almidón modificado.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales tipos de glucogenosis asociadas a hipoglucemia.....	15
2	Porcentajes de amilosa y amilopectina de los productos analizados.....	40
3	Porcentajes de almidón de cada tipo de digestión de muestras de almidón de maíz modificadas a diferentes condiciones de calor y humedad.....	45
4	Matriz de distancias euclidianas incluyendo las medias y desviaciones estándar de los almidones de rápida y lenta digestión, total digerible, resistente y total	45
5	Matriz de distancias euclidianas incluyendo las medias y desviaciones estándar solo de los almidones de rápida y de lenta digestión.....	47
6	Porcentajes de almidón de rápida y lenta digestión de 3 tipos de almidón de maíz.....	48
7	Contenido de amilosa y amilopectina de almidón modificado masivamente, Maizena y Glycosade.....	49
8	Características de los participantes del protocolo de evaluación de los niveles de glucosa sérica posterior a la ingesta de dos tipos de almidón de maíz modificado térmicamente, así como Glycosade.....	51

RESUMEN

Las glucogenosis son enfermedades congénitas, algunas de ellas con deficiencia enzimática que impide degradar el glucógeno endógeno, causando hipoglucemia severa en ayuno. Las de tipo I y III, se tratan con almidón de maíz cada 2-3 h, incluso durante la noche, para mantener glicemia normal; un producto comercial importado, el Glycosade[®], la mantiene por hasta 7 h, pero es caro y no disponible en nuestro país. El objetivo de esta tesis fue modificar físicamente almidón de maíz, para hacerlo similar en tipos de almidón digestible al Glycosade[®], manteniendo la glicemia de adultos al menos 5 h. Se analizaron Maizena[®], Argo[®], maíz ceroso y Glycosade[®] para amilosa, amilopectina y velocidad de hidrólisis *in vitro*; encontrando similitud entre los dos primeros, por lo que se trabajó con Maizena[®]. Por calorimetría diferencial de barrido, el almidón con 30% de humedad, soportó temperaturas de hasta 100°C sin cambios notables en transición de fase. Se modificó el almidón a 90, 95 y 100°C, con humedad de 30% durante 2 y 5 h en horno de convección forzada, obteniendo 6 productos. Se les analizó velocidad de hidrólisis y proporción de cada tipo de almidón. En un análisis por conglomerados, el tratamiento 5 h a 90°C fue similar al Glycosade[®] en cuanto a velocidad de hidrólisis; así también, fue comparable en proporciones de almidón de rápida y lenta digestión. Se escaló el proceso para obtener suficiente material para ensayarlo *in vivo*. Participaron 9 voluntarios con HbA1c 5.0-5.4%, tras ayunar 10 h, en la evaluación de glicemia posterior a la ingestión de 100 g/300 mL de agua, de almidón modificado, y una semana después, de Glycosade[®]. Se les practicó punción del dedo periódicamente durante 5 h y evaluó con un glucómetro. En la última medición, su concentración de glucosa promedio fue de 91.4 ± 5.4 mg/dL, sin diferencia significativa ($p < 0.05$) al Glycosade[®] con 97.3 ± 6.8 mg/dL. Así, se cumplió el objetivo de mantener la glicemia normal, durante al menos 5 h, con el almidón de maíz modificado por tratamiento térmico con baja humedad. El producto, podría utilizarse durante la noche en niños con glucogenosis I o III, después de su valoración intrahospitalaria.

Palabras clave: glucogenosis, almidón de maíz, almidón de maíz modificado, glucosa

ABSTRACT

Glycogen storage diseases (GSD) are genetic conditions caused by deficiency of enzymes involving glycogen degradation, and some of them inducing severe fasting hypoglycemia. GSD type I and III treatment consists of uncooked cornstarch every 2-3 h, also at nighttime, to maintain normal blood glucose levels. A foreign commercial product, Glycosade[®], has proven to prolong euglycemia for as long as 7 h, but it is expensive in México. The aim of this thesis was to modify physically cornstarch, to obtain similar proportions of digestible starch types to Glycosade[®], allowing normal levels of blood glucose for at least 5 h in healthy adults. The ratio of amylose/amylopectin of two different brands of cornstarch (Maizena[®] and Argo[®]), a waxy maize cornstarch and Glycosade[®] were analyzed, finding similarity between Maizena[®] and Argo[®], so the first one was chosen to work with. By differential scanning calorimetry, cornstarch with 30% humidity was able to resist temperatures of up to 100°C without phase transitions. Starch was modified in a convection oven at 90, 95 and 100°C for 2 and 5 h, with 30% humidity, resulting in 6 modified cornstarch products. We analyzed *in vitro* hydrolysis and percentages of each kind of starch. A cluster analysis showed similar *in vitro* behavior between the starch modified for 5 h at 90°C and Glycosade[®], as well as for percentages of rapidly and slowly digestible starch. We modified cornstarch on a full-scale, to obtain enough material for an *in vivo* clinical trial. We run a trial with 9 volunteers with HbA1c 5.0-5.4%. After 10 h fasting, we measured blood glucose following a cornstarch treatment intake of 100g/300 mL water, of modified cornstarch or Glycosade[®] (one week later). Blood by capillary puncture was analyzed with a glucometer every hour for 5 h. In the last hour, the average blood glucose concentration was 91.4±5.39 mg/dL, significantly comparable ($p>0.05$) to Glycosade[®], with 97.3 ± 6.8 mg/dL. In conclusion, the objective was met, euglycemia was prolonged at least 5 h, after a dose of the modified cornstarch. This treatment could be used at nighttime in children with GSD type I or III, after its clinical assessment.

Key words: glycogen storage disease, cornstarch, modified cornstarch, glucose

1. INTRODUCCIÓN

Los errores innatos del metabolismo, son enfermedades congénitas que producen defectos enzimáticos, afectando diversas rutas metabólicas. Dichas alteraciones incluyen el acúmulo o el déficit de sustancias en el organismo (Ferreira y Van Karnebeek, 2019). Según la SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism), los errores innatos del metabolismo pueden clasificarse en errores del metabolismo de aminoácidos y péptidos, de carbohidratos, de ácidos grasos y cuerpos cetónicos, y de las purinas, pirimidinas y nucleótidos. Dentro de los que afectan el metabolismo de carbohidratos, está la glucogenosis.

Las glucogenosis son un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una deficiencia en los sistemas enzimáticos que metabolizan al glucógeno (Ozen, 2007). Una de las funciones principales del glucógeno, es mantener la concentración de glucosa en sangre estable en periodos de ayuno, por lo que el principal síntoma, de algunas glucogenosis, es la hipoglucemia severa en ayuno, causando secuelas graves en infantes y retraso en el crecimiento.

Las glucogenosis de los tipos I y III, pueden tratarse con dieta basada en carbohidratos de absorción lenta y comidas frecuentes. Para mantener la concentración de glucosa estable durante la noche, se utiliza almidón de maíz (Chen *et al.*, 1984), especialmente el que ha sido modificado para ralentizar su hidrólisis, tales como el *Glycosade*®. Aunque es eficiente hasta por 7 h, si se importara este producto a México sería muy caro, lo que lo haría inaccesible para la población atendida por servicios públicos de salud en el país.

La modificación de los almidones de diversas fuentes, es una práctica común en la industria de los alimentos, en la búsqueda de funcionalidad diversa, para cuyo fin, se usan técnicas físicas, químicas o enzimáticas (Zia-ud-Din *et al.*, 2017). Las técnicas físicas son las más económicas y se podrían aplicar para modificar el almidón y tratar la glucogenosis. Por lo tanto, se hipotetizó que la modificación física del almidón de maíz, es una opción accesible, para elaborar un producto de digestión lenta que ayude a mantener la glicemia en niños con glucogenosis tipo I y III, y que sea comparable en eficiencia a un producto comercial diseñado *ad oc*.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Glucogenosis Tipos I y III

Aproximadamente uno de cada 20,000 a 43,000 recién nacidos vivos en el mundo, padece glucogenosis, un conjunto de trastornos congénitos que involucran el metabolismo del glucógeno (Figura 1) (Ozen, 2007). Éste, es una de las reservas energéticas más importantes en los animales, en hígado y músculo. Una de sus funciones principales, es mantener la concentración de glucosa en sangre estable en periodos de ayuno. Las glucogenosis (GSD, por sus siglas en inglés, *Glycogen Storage Diseases*), se caracterizan porque las enzimas que metabolizan al glucógeno, no se expresan o no funcionan correctamente. Éstas varían, y su severidad dependerá del tipo de glucogenosis que se padezca. Aunque es más común detectarlas en edades tempranas, específicamente en niños lactantes con glucogenosis que se asocie a hipoglucemia (Cuadro 1), una vez que éstos espacian más las tomas, la edad de inicio puede variar hasta la edad adulta (Ochoa-Andrade *et al.*, 2019)

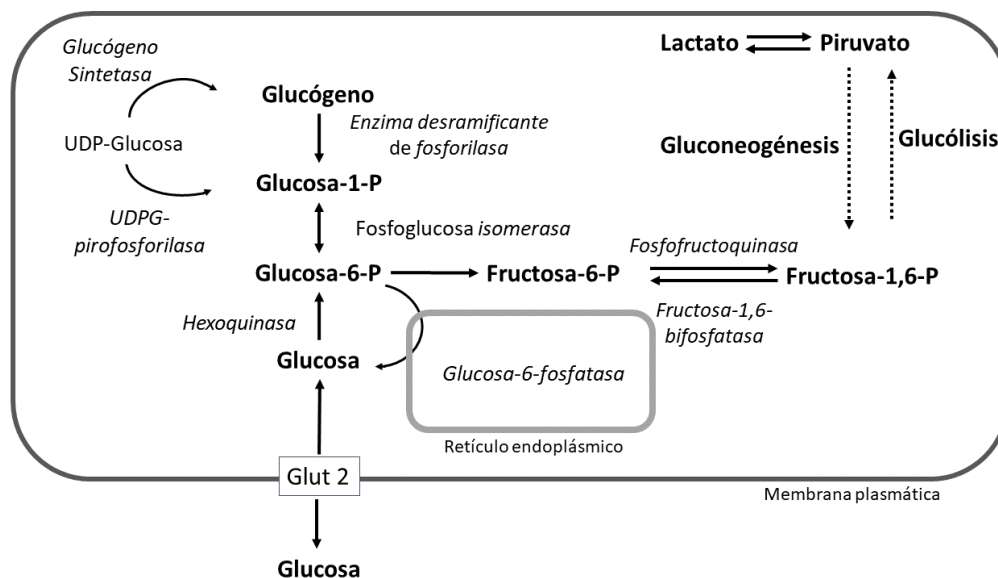


Figura 1. Metabolismo del glucógeno hepático (Modificado de Chen, 2001)

Para nombrar los distintos tipos de glucogenosis, se utilizan números romanos, en orden cronológico de cómo fueron descubiertos. El primero en ser diagnosticado fue el tipo I, o enfermedad de Von Gierke, en 1928. Actualmente, se conocen más de 10 tipos, que se pueden clasificar en diferentes categorías, dependiendo del defecto enzimático y según los órganos afectados. De acuerdo a los órganos afectados, hay diversas glucogenosis como las hepáticas, que aunque son las más comunes, en algunas ocasiones los daños ocurren simultáneamente en hígado y músculo. Otros tipos de glucogenosis involucran además a otros tejidos, como riñones, corazón y mucosa intestinal (Chen *et al.*, 2001).

Es importante identificar y tener un diagnóstico oportuno sobre el tipo de glucogenosis, debido a que no sólo los síntomas y signos clínicos varían en cada clasificación; también lo hacen el pronóstico, las complicaciones y el tratamiento. Por ejemplo, los síntomas principales de las glucogenosis hepáticas son la hepatomegalia e hipoglucemia, mientras que las glucogenosis que afectan al músculo, también incluyen miopatías y dolor muscular. Para diferenciar entre los tipos de glucogenosis, es necesario un perfil bioquímico, especialmente datos de glucemia, perfil de lípidos, pruebas de función hepática, lactato, y el análisis de cuerpos cetónicos (Castillo *et al.*, 2020). Una característica en común de todos los tipos de glucogenosis, es que ponen en riesgo el estado nutricional del paciente, ya que sus requerimientos específicos no están bien establecidos (Szymanska *et al.*, 2017; Humphrey *et al.*, 2014).

Para los fines de este estudio, se centrará la explicación en glucogenosis tipos I y III, que conllevan tratamiento nutricional similar, para el control de la glicemia.

CUADRO 1. Principales tipos de glucogenosis asociadas a hipoglucemia

Tipo	Nombre común	Enzima deficiente	Órganos afectados	Manifestaciones clínicas
I	Von Gierke	Glucosa-6-Fosfatasa	Hígado, riñón	Hipoglucemia, retraso de crecimiento, baja tolerancia al ayuno, elevación de ác. láctico, ác. úrico y colesterol, hepatomegalia
III	Enfermedad de Cori-Forbes	Amilo-1-6-glucosidasa (Enzima desramificadora de glucógeno)	Músculo, hígado, corazón	Hipoglucemia, hepatomegalia, hiperlipidemia, retraso en el crecimiento
VI	Enfermedad de Hers	Glucógeno fosforilasa	Hígado	Hepatomegalia, retraso en crecimiento sin o con hipoglucemia (los síntomas pueden remitir en edad adulta)
IX	Deficiencia de fosforilasa cinasa	Fosforilasa cinasa (FBK)	Hígado, músculo	Hipoglucemia, hepatomegalia, retraso en crecimiento (los síntomas remiten en edad adulta)
XI	Síndrome de Fanconi-Bickel	Lactato deshidrogenasa	Músculo	Fatiga, dolor muscular, intolerancia al ejercicio, hipoglucemia en ayuno, hepatomegalia
0	Deficiencia de glucógeno sintasa hepática	Glucógeno sintasa hepática	Músculo, hígado, corazón	Hiperglicemia postprandial, hiperlactatemia, hipoglucemia en ayuno, letargia, debilidad muscular

La enfermedad de Von Gierke es causada por una anomalía en el sistema de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por lo que se ven afectadas tanto la glucogenólisis como la gluconeogénesis. En esta glucogenosis que también se denomina tipo I, los síntomas se presentan durante los primeros meses de vida, usualmente cuando el niño comienza a dormir durante periodos más largos, sin ser alimentado. Los síntomas principales se señalan en el Cuadro 1. Con el paso del tiempo, se incluye aspecto de “cara de muñeca”, por depósito de grasa en las mejillas.

Se sospecha de glucogenosis tipo I cuando un infante presenta los signos clínicos ya citados, principalmente hipoglucemia, hepatomegalia y retraso de crecimiento. Para su diagnóstico es importante realizar exámenes de laboratorio, en los cuales la hiperlactatemia e hiperuricemia

pueden ayudar a diferenciarla entre otras patologías e incluso otros tipos de glucogenosis, así como el aumento de enzimas hepáticas y/o fibrosis (Ochoa-Andrade *et al.*, 2019). La prueba definitiva hace algunos años era la medición de la enzima G-6-fosfatasa y el análisis de una biopsia hepática, a la cual se debería proceder si los demás exámenes sugieren la enfermedad. Actualmente, se practican análisis genéticos para confirmar el diagnóstico, encontrando mutaciones en la secuencia del gen que codifica para la enzima (*G6PC*) o del que causa déficit en el transportador de la enzima *G6PT* o *SLC37A4* (Kishnani *et al.*, 2010). Al día de hoy, se han encontrado hasta 13 mutaciones en el gen *SLC37A4*, que ayudan a distinguir entre glucogenosis tipo Ia o Ib (Zhang *et al.*, 2019)

Dependiendo del gen afectado, hay dos subtipos principales de la enfermedad de Von Gierke, y aproximadamente 80% de los pacientes presentan tipo Ia. En el tipo **Ia** es el sistema enzimático el que se encuentra deficiente, mientras que en el tipo **Ib** es el transportador de la glucosa-6-fosfatasa. Sus diferencias son casi indistinguibles, pero los pacientes con el subtipo **Ib** presentan neutropenia, además de los síntomas clásicos, por lo que sufren de infecciones recurrentes. Una característica de ambos subtipos que los diferencian de otros, es la baja tolerancia al ayuno. Los pacientes que sufren glucogenosis tipo I deben consumir alimentos cada 2-3 h, con el fin de mantener la concentración de glucosa por encima de los 70 mg/dL (Bali *et al.*, 2016).

Además de la glucogenosis tipo I, la de tipo III responde bien al tratamiento nutricional. Se hace referencia a ella como la enfermedad de Cori o de Cori-Forbes, y es producto de un defecto en la enzima que rompe las ramificaciones del glucógeno. La enzima es necesaria para la conversión de glucógeno a glucosa-1-fosfato, por lo que este defecto impide la degradación completa del glucógeno, y así, se almacena con una estructura anormal en hígado y músculo. Es similar en síntomas a la enfermedad de Von Gierke (Cuadro 1), excepto que no se alteran las concentraciones de lactato y ácido úrico (El-Karakasy *et al.*, 2014), y generalmente los síntomas son más leves, por ejemplo, hay mejor tolerancia al ayuno (Ellingwood and Cheng, 2018).

La deficiencia de la enzima amilo-6-glucosidasa puede ocurrir tanto en tejido muscular/cardíaco como en hígado, creando así 2 subtipos de la enfermedad de Cori. El tipo **IIIa** conforma aproximadamente el 80% de los casos de glucogenosis tipo III, presenta signos y síntomas en ambos tejidos, mientras que el tipo **IIIb** solamente en hígado (Sentner *et al.*, 2016). Se han descubiertos otros tipos de glucogenosis tipo III, **IIIc** y **IIId**, en los cuales la actividad de la enzima está disminuida, pero en más de 50 años desde que se conocen, se han encontrado muy pocos casos.

En la glucogenosis tipo III, el tratamiento dietético es parecido al de la enfermedad de Von Gierke. Sin embargo, en la tipo III al conservarse la gluconeogénesis, hay mejor tolerancia al ayuno.

2.2. Tratamiento Dietario

Para las glucogenosis de tipo I o III, se recomienda la ingestión fraccionada de alimentos en pequeñas cantidades, para evitar una sobrecarga de carbohidratos que propicie el almacenamiento de glucógeno. Así mismo, hay que realizar las comidas de manera frecuente (en pacientes pediátricos en intervalos de hasta 3 a 4 h). Es importante preferir hidratos de carbono de absorción lenta, como cereales y tubérculos poco procesados (maíz, avena, arroz y papa, por ejemplo) y evitar azúcares simples (jugos de frutas, mermeladas, postres, etc).

Otra característica exclusiva de la enfermedad de Von Gierke, es que dentro de su tratamiento dietético se encuentra la restricción de hidratos de carbono simples como sacarosa, lactosa y fructosa (frutas, lácteos y azúcar simple). Al verse bloqueadas vías metabólicas importantes, estos azúcares favorecen el almacenamiento de glucógeno y pueden aumentar la concentración de lactato en sangre, ya de por sí elevado. La glucogenosis tipo I, además de ser la más frecuente, se considera la más restrictiva debido a lo anterior.

Como en la glucogenosis tipo III, la gluconeogénesis está intacta, no es necesario restringir los alimentos que aportan azúcares simples. En cuanto al aporte energético de los macronutrientes, hay controversia, pero generalmente rondan en 60-70% de carbohidratos, 10-15% de proteínas, y las calorías restantes proveniente de lípidos para el tipo I (Kishnani *et al.*, 2014). En la glucogenosis tipo III, se pueden utilizar aminoácidos para producir glucosa, y como esta enfermedad afecta también al músculo, el aumento en el consumo de proteínas mejora la función muscular, por lo que se han visto beneficios en la evolución clínica de pacientes con cardiomiopatías con una dieta más baja en carbohidratos, y alta en proteínas y lípidos (aprox. 45% de carbohidratos, 30% de lípidos y 25% de proteínas (Brambilla *et al.*, 2014; Valayannopoulos *et al.*, 2011). Por el contrario, en la glucogenosis tipo I, el consumo elevado de proteínas se ha asociado con fallas renales (Heller *et al.*, 2008; Kishnani *et al.*, 2010). Recientemente, se han estudiado los efectos de una dieta hiperlipídica en pacientes pediátricos con diagnóstico de glucogenosis tipo III, haciéndose

inferencias sobre un posible beneficio a aquellos con cardiopatías. Sin embargo, los pocos casos publicados, y la falta de monitoreo sobre posibles complicaciones a largo plazo de esta modificación en la dieta, hacen concluir que dicha intervención no es, por el momento, segura (Rossi *et al.*, 2019).

Es importante vigilar el consumo de vitaminas y minerales en pacientes con ambos tipos de glucogenosis. Se recomienda realizar un plan alimenticio que cubra las recomendaciones de la OMS, en caso de que eso no sea posible, deberá considerarse un multivitamínico que incluya calcio y vitamina D, debido a que la osteoporosis es una de las principales complicaciones a largo plazo, especialmente en la glucogenosis tipo III. Aunque la razón de la asociación entre la falta de balance metabólico de la glucogenosis tipo III y la pérdida importante en la densidad mineral ósea todavía no está clara, se cree relacionada a varios factores involucrados en la enfermedad como hiperlipidemia, desequilibrio hormonal y la falta de actividad física debido a los síntomas (Melis *et al.* 2016). Como en la glucogenosis tipo III no hay restricción de lácteos ni frutas, la suplementación es recomendable solo en casos específicos, dependiendo de las necesidades individuales de cada paciente.

A pesar de la constante necesidad de los pacientes con alteraciones en el metabolismo del glucógeno de consumir carbohidratos, es importante notar que su exceso podría llevar a obesidad a largo plazo, especialmente cuando se llega a una edad adulta, puesto que hay una disminución tanto en la tasa metabólica como en los requerimientos del tratamiento. Sin una alimentación equilibrada, la obesidad puede convertirse en un efecto secundario de la terapia nutricional para la glucogenosis tipos I y III con almidón de maíz, ya sea convencional o modificado (Dahlberg *et al.*, 2019). Dado que la terapia con almidón suele comenzar en edades tempranas y se mantiene durante toda la vida, es importante tomar las precauciones necesarias y seguir una dieta correcta. Además, el exceso de almidón debido a una dosificación incorrecta es contraproducente, al propiciar el almacenamiento de más glucógeno.

2.3. Tratamiento

La base del tratamiento para pacientes con glucogenosis se centra en un manejo nutricional adecuado. Aunque los lineamientos no están bien establecidos, el propósito general del tratamiento

para glucogenosis tipos I y III son los mismos: mantener la glucemia en valores normales, y evitar el almacenamiento de glucógeno en hígado. Siguiendo las pautas recomendadas, se puede lograr un adecuado control metabólico de las concentraciones de transaminasas hepáticas, ácido úrico y láctico, y así prevenir complicaciones a largo plazo como la falla renal, osteoporosis, miopatías y adenoma hepatocelular (Steunenbergh *et al.*, 2018; Damska *et al.*, 2017).

2.3.1 Sonda Nasogástrica/Gastrostomía

En 1976, Greene *et al.* demostraron que la administración continua de glucosa por sonda nasogástrica o gastrostomía durante la noche, controla hipoglucemias en pacientes con glucogenosis, al cubrir las necesidades de glucosa exógena. La velocidad de la infusión depende de la edad del paciente, encontrando valores de hasta 6-8 mg/kg/min en niños menores de 6 años, 5-6 mg/kg/min en adolescentes y 3-4 mg/kg/min en adultos (Rake *et al.*, 2002). Esta terapia resultó especialmente útil al utilizarla en horario nocturno, cuando el periodo de ayuno es más largo, junto con la alimentación oral recomendada durante el día.

A pesar de ser una buena opción como terapia nocturna, la sonda nasogástrica tiene desventajas: es invasiva, ocurren fallas técnicas en los aparatos utilizados u oclusiones, y la mala colocación de la sonda y malas prácticas de higiene en casa, pueden poner en riesgo al paciente (Szymanska *et al.*, 2017; Heller *et al.*, 2008). Debido a la grave neutropenia de los pacientes con glucogenosis tipo **Ib**, y el peligro de infección que representan, las gastrostomías están contraindicadas. Al utilizarse en niños, además de causar irritación y molestia, se corre el peligro de que quieran retirarse la sonda por sí solos y se lastimen. Es importante tomar precauciones para evitar este tipo de problemas.

2.3.2 Almidón de Maíz Crudo

El almidón es un polisacárido de reserva en las plantas. Está constituido por dos tipos de moléculas: amilasa y amilopectina. La amilopectina es la que le confiere la característica de interés como

tratamiento para pacientes con glucogenosis, ya que es más difícil de digerir porque se comporta como un carbohidrato complejo. La mayoría de los alimentos que forman parte de la dieta habitual, contienen almidón, por lo que es una fuente principal de energía. Algunas fuentes importantes de almidón son los cereales como el trigo, el arroz y los tubérculos. A nivel alimentario e industrial, la principal fuente de almidón es el maíz, especialmente en la dieta mexicana (Agama *et al.*, 2004). En pacientes con glucogenosis tipos I y III, comenzó a utilizarse el almidón de maíz como terapia alternativa a la sonda nasogástrica o en conjunto con ella, desde mediados de 1980. Continúa actualmente como el principal tratamiento a nivel mundial, lo que ha mejorado indescriptiblemente la calidad y expectativa de vida de los pacientes (Hijazi *et al.*, 2019). El almidón crudo de maíz se digiere lentamente y provee una liberación constante de glucosa. Así, logra mantener la concentración de glucosa estable durante unas 2-3 horas.

El almidón de maíz se mezcla con agua a temperatura ambiente, u otros líquidos permitidos para el paciente, y es fácil de administrar. La dosis de almidón de maíz dependerá del tipo de glucogenosis que se padezca, y la edad del paciente. Se recomienda comenzar con una dosis baja de 0.25 g/kg de peso e ir aumentando lentamente a tolerancia. Se ha logrado mantener concentraciones normales de glucosa con 1.75 y hasta 2.5 g/kg de peso en niños (Heller *et al.*, 2008); normalmente los adultos requieren menos cantidad de almidón de maíz (Kishnani *et al.*, 2019). El tiempo promedio que mantiene la glucemia en valores normales el almidón crudo, es de 2-3 h, por lo que se requiere repetir dosis después de ese tiempo (Lee *et al.*, 1996). Tal periodo varía considerablemente entre pacientes.

Además de ser una alternativa menos invasiva, el almidón de maíz es también una opción más económica que la sonda, y se pueden encontrar distintas marcas en el mercado a precios accesibles. En México, el precio del almidón de maíz de la marca *Maizena*[®] es de aproximadamente \$34.00 MXN por 425 g de producto (al 18 de agosto del 2020). Esta terapia también tiene sus limitantes; algunos pacientes desarrollan síntomas como inflamación intestinal y flatulencias, el periodo de ayuno no pasa de 3 h, y su sabor no es agradable para algunos pacientes, especialmente niños (Kishnani *et al.*, 2014).

El principal riesgo de la terapia con almidón de maíz es que depende del paciente, o de los padres en los niños, el tomar la dosis a la hora adecuada. Al mantener la glucemia en valores normales por sólo alrededor de 3 h, deben realizarse tomas frecuentes durante las 24 horas del día, incluso nocturnas, por lo que es necesario interrumpir el sueño para preparar y administrar la toma. Además

de la baja calidad de sueño que esto genera, tanto para pacientes como para padres o cuidadores, el saltarse una dosis puede llevar a hipoglucemia severa e incluso la muerte.

2.3.3 Almidón de Maíz Modificado y Otras Fuentes

En el 2007, Vitaflo[®] desarrolló un producto de almidón de maíz ceroso modificado llamado *Glycosade*[®], con el objetivo de aumentar el periodo de mantenimiento de la glucemia, en pacientes con glucogenosis y con esto, mejorar su calidad de vida. Este producto, modificado por temperatura y humedad, tiene un mayor contenido de amilopectina que el almidón de maíz crudo. La presentación de *Glycosade*[®] es en paquetes de 60 g, equivalentes en contenido de carbohidratos a 55 g del almidón de maíz crudo. Este tipo de almidón modificado fue aprobado en Europa como tratamiento para la glucogenosis desde el 2009, pero en Estados Unidos salió al mercado en el año 2012 (Ross *et al.*, 2015; propaganda de la misma compañía). Su precio varía entre 8 a 12 dólares por paquete (sin impuestos de importación), por lo que se requerirían al menos dos paquetes por noche para un adolescente, lo cual no es una opción económicamente accesible para algunos pacientes en México. Además, dicho producto aún no está a la venta en nuestro país, volviéndolo además de caro, difícil de conseguir.

A pesar de su costo, el almidón de maíz modificado es una buena alternativa para los pacientes, debido a sus beneficios ya descritos. Entre sus resultados positivos, está el mantenimiento de las concentraciones de glucosa estables durante más tiempo que el almidón de maíz crudo, y evita una caída abrupta de glucosa después de la toma (Bhattcharya *et al.*, 2007). Esta característica lo hace más seguro para los pacientes, al disminuir el riesgo de una hipoglucemia severa inmediatamente después de saltarse una toma por equivocación. Además, sus características organolépticas hacen que tenga mejor aceptación que el almidón de maíz crudo (Correia *et al.*, 2008).

Además del almidón de maíz modificado, se han estudiado otras fuentes de almidón para el tratamiento de las enfermedades del metabolismo del glucógeno. El *Polvilho doce*, un producto originario de Brazil, parece una opción llamativa. Se trata del almidón proveniente de la mandioca o yuca, un tubérculo importante en la cocina brasileña. El *polvilho doce* tuvo buenos resultados en un estudio de digestibilidad *in vitro* al compararse con otros productos; una liberación de glucosa

más lenta y estable, que ayuda a mantener la normoglicemia en los pacientes con glucogenosis (Nalin *et al.*, 2015). Actualmente, se realizan ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia del almidón de mandioca como tratamiento. La búsqueda de opciones de fuentes de almidón locales, que tengan resultados prometedores en el control metabólico de los pacientes, podría dar como resultado productos más económicos.

Recientemente, se ha estudiado el almidón de maíz ceroso, o *waxy*, como alternativa de tratamiento. Se pensaba podría tener mejor digestibilidad, así como una liberación de glucosa más lenta que el almidón de maíz crudo, siendo una buena opción para espaciar más las tomas de tratamiento y mejorar la calidad de sueño al prevenir la hipoglucemia. Ha tenido buenos resultados, sin embargo, la información sobre la administración de este tipo de almidón en niños es muy limitada (Hijazi *et al.*, 2019). Otra desventaja es que, en México, su precio es bastante más elevado que el almidón de maíz crudo, y es más difícil de conseguir, como se mencionó antes.

2.3.4 Otras Terapias

Aunque las terapias paliativas basadas en la nutrición tienen buenos resultados, no mejoran todas las posibles complicaciones a largo plazo que pueden causar descontrol metabólico. Por eso, actualmente se buscan terapias curativas. Algunas se encuentran en fase de estudio, como por ejemplo la terapia enzimática de sustitución. Las glucogenosis, se caracterizan por la falla en la expresión o actividad de enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno. El objetivo de la terapia enzimática, es corregir esa deficiencia al administrar una enzima activa. Esta terapia ha sido probada únicamente en glucogenosis tipo II, o enfermedad de Pompe, teniendo buenos resultados en la forma infantil de la enfermedad (Angelini *et al.*, 2009).

Además de los estudios sobre terapias enzimáticas, se han encontrado efectos positivos preliminares de la terapia génica con vectores virales adeno-asociados, en animales, sobre el almacenamiento de glucógeno en hígado en la glucogenosis I y II (Kishnani *et al.*, 2019). Actualmente, se completó la primera fase para un ensayo de terapia génica en la enfermedad de Pompe (desarrollo tardío), que consistió en la búsqueda de pacientes adultos elegibles. Esta fase de

reclutamiento inició en noviembre de 2017 y terminó en agosto, 2019 (ClinicalTrials.gov, 2018 disponible en:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03285126?term=%22gene+therapy%22+OR+%22gene+transfer%22+OR+%22virus+delivery%22&recrs=a&rank=11>).

Un estudio precedido por resultados prometedores en modelos animales (Koeberl *et al.*, 2007), se inició en julio del 2018 en la Universidad de Connecticut, EUA. Se trata de la terapia génica para glucogenosis tipo **Ia** o enfermedad de Von Gierke, en adultos, a cargo del Dr. David Weinstein. Los ensayos clínicos están en Fase 1^a, y se planea terminar con esa fase en Diciembre, 2020 (ClinicalTrials.gov, 2019 disponible en:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03517085?term=Type+1+glycogenosis&cond=Von+Gierke+disease&cntry=US&state=US%3ACT&rank=1>).

Aunque muy prometedoras, las terapias génicas hasta el momento se están estudiando para solo dos tipos de glucogenosis (**Ia** y II), están apenas iniciando y se podrían llevar decenas de años para que sean accesibles. Así, se requiere buscar soluciones prácticas y de bajo costo para la población que no puede acceder a los productos comerciales utilizados en el tratamiento.

El trasplante hepático es otra propuesta para corregir la deficiencia enzimática congénita que genera la glucogenosis. Para llegar a esto, es importante contraponer los riesgos de los beneficios; por ejemplo, en aquellos pacientes con neutropenia, el riesgo de una infección podría ser suficiente para no ser candidatos a un trasplante, teniendo en cuenta que, en las glucogenosis I y III, el estado del hígado no se ha mencionado como factor importante de morbilidad, si no las complicaciones de un pobre manejo metabólico. Se han realizado varios trasplantes en pacientes con glucogenosis tipo IV, en los cuales se han obtenido resultados positivos en cuanto a la intolerancia a glucosa, pero hace falta seguimiento a largo plazo (Shimizu *et al.*, 2019).

2.4. Modificaciones del Almidón

Industrialmente los almidones de diversas fuentes se modifican con el objetivo de aumentar su funcionalidad tecnológica. Esto puede realizarse por medio de diferentes métodos, principalmente técnicas físicas, químicas, o enzimáticas. Dependiendo de la técnica utilizada, se pueden impactar aspectos importantes del alimento, como por ejemplo su digestibilidad. A continuación, se explican los métodos de modificación de almidón más usuales en las diferentes industrias.

2.4.1 Modificación Química

La modificación química de los almidones se lleva a cabo mediante reacciones como oxidación, esterificación, hidrólisis y otras reacciones. En algunas ocasiones, se mezclan varios tipos de reacciones, que dan lugar a técnicas nuevas, para obtener los resultados deseados. La modificación química sí altera las características nutricionales del almidón, a diferencia de la física.

La reacción de oxidación consta de la formación de grupos aldehído o carboxilo, al oxidar los grupos hidroxilos en el almidón con reactivos químicos. Los más comunes son peróxido de hidrógeno, el cual no suele utilizarse en la industria alimentaria, hipoclorito de sodio, y yodato de sodio. El uso de estos agentes puede producir sustancias tóxicas de desecho, por lo que continúan los esfuerzos para encontrar métodos físicos más amigables con el medio ambiente, que cumplan con los requerimientos de la industria alimentaria y textil (Lewicka *et al.*, 2015).

Otra reacción de modificación química, es la esterificación del almidón con ácidos orgánicos, la cual mejora su hidrofobicidad. Para esto, se emplean agentes como ácido acético, anhídrido succínico y anhídrido maleico (Solorzano *et al.*, 2011). Se utiliza también la técnica de entrecruzamiento para modificar químicamente el almidón. Ésta da como resultado enlaces cruzados entre las cadenas de almidón, manteniendo su integridad y mejorando su resistencia. Para el entrecruzamiento se utilizan reactivos como el trimetafosfato de sodio, epiclorhidrina y anhídrido acético (Peñaranda-Contreras *et al.*, 2008).

2.4.2 Modificación Enzimática

La modificación de almidón con catalizadores enzimáticos tiene ventajas sobre la química. Puede evitar desechos tóxicos, disminuir el costo y acelerar el proceso; su objetivo principal, es hidrolizar el almidón. Las enzimas más comúnmente empleadas son: α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasa e isoamilasa (Arenas y Pedraza, 2017). Dependiendo de la enzima utilizada, su concentración, la temperatura y el pH, serán los cambios en la hidrólisis del almidón. Por ejemplo, la α -amilasa tiene afinidad por los enlaces α -1,4, mientras que otras enzimas tienden a romper otros (Calderón de la Barca *et al.*, 2016). En algunas ocasiones, la modificación enzimática del almidón se realiza después de haberlo sometido a algún otro proceso tecnológico de modificación, lo cual puede mejorar la acción enzimática (Martín y López, 2009).

2.4.3 Modificaciones Físicas

Las modificaciones físicas alteran la estructura y tamaño del gránulo de almidón, resultando en cambios en solubilidad, propiedades funcionales y capacidad de hinchamiento, buscando ciertas propiedades fisicoquímicas de interés (Nawaz *et al.*, 2020). Esto se lleva a cabo principalmente a través del calor y la humedad. La mayoría de los procesos de transformación física intentan evitar que se afecten las propiedades químicas del almidón nativo, para no tener que ser etiquetado como almidón modificado. Las técnicas de modificación físicas son más económicas, al no utilizar ningún agente químico, y pueden ser térmicas o no térmicas.

2.4.3.1 Modificaciones no térmicas. Las modificaciones no térmicas incluyen el ultrasonido, la molienda o desgaste mecánico y alta presión. En el tratamiento con ultrasonido se utilizan ondas de alta frecuencia, las cuales viajan a través del alimento y modifican sus características estructurales a través de la cavitación (Ríos-Romero *et al.*, 2015). El procesamiento a través de la molienda utiliza fuerza mecánica para cambiar las características del gránulo de almidón. Esta técnica es utilizada principalmente para la fabricación de harinas.

Dentro de los tratamientos de modificación no térmicos, suelen utilizarse aquellos de alta presión (mayores a 400 megapascuales). En este caso, los resultados del tratamiento dependerán de la presión utilizada y del tipo de almidón. Los almidones tratados a alta presión tienden a gelatinizarse de manera distinta que en los tratamientos térmicos y cambia la cristalinidad (Wang *et al.*, 2016). Los efectos de estos tratamientos en el almidón resistente, no son consistentes (Zhang *et al.*, 2009).

2.4.3.2 Modificaciones térmicas. Las principales modificaciones físicas se realizan a través del calor, y se agrupan como lo muestra la Figura 2. Dentro de las técnicas térmicas, está la pre-gelatinización. Ésta, se basa en solubilizar el almidón y luego exprimirlo en rodillos previamente calentados, dando como resultado un polvo con menor contenido de humedad que el almidón tradicional. Este polvo es soluble a temperatura ambiente, y se hidrata rápidamente, pero a temperaturas altas tiende a volverse más viscoso (Biliaderis *et al.*, 1980).

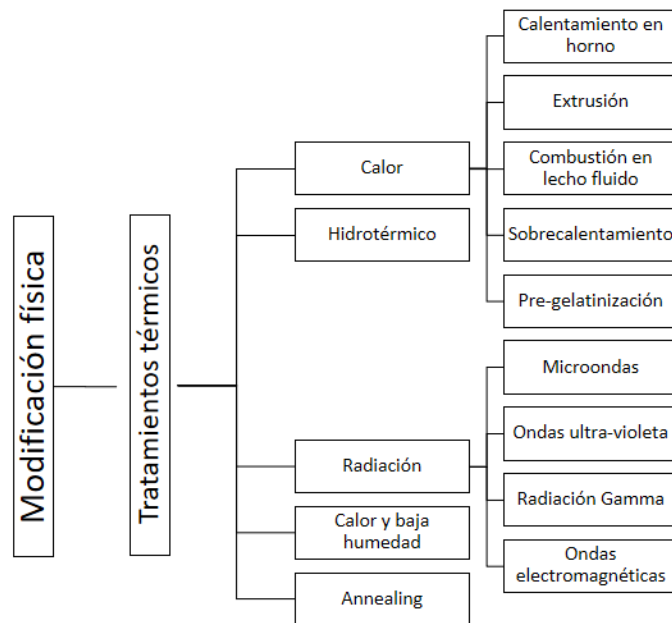


Figura 2. Principales métodos térmicos de modificación de almidones (Modificado de Newaz *et al.*, 2020)

La técnica llamada *annealing* o cocimiento, consiste en incubar el almidón en un exceso de agua a altas temperaturas, sin llegar a los 100°C, durante un tiempo determinado. El *annealing* no produce

cambios importantes en la estructura externa del gránulo, pero comparte con la técnica de calor húmedo los beneficios de solubilidad y poder de hinchamiento. También mejora la cristalinidad (Linares *et al.*, 2015).

Otra técnica de modificación térmica de almidones son los tratamientos de calor húmedo o *heat-moisture (HMT*, en inglés). Es una técnica de bajo costo que ayuda a modificar el almidón para mejorar su estabilidad térmica y disminuir el hinchamiento y la retrogradación (Veyna-Torres *et al.*, 2016). Consiste en calentar el almidón a temperaturas más altas que las necesarias para gelatinizar (90-120°C), pero sin la humedad suficiente para formar geles (Zavareze y Días, 2011). Esta técnica se ha utilizado para modificar almidón de maíz, resultando en un producto con mayor resistencia a la acción enzimática, al compararse con el almidón de maíz nativo, lo cual podría deberse a un aumento en la proporción de almidón de lenta digestión y almidón resistente, valores que varían dependiendo del porcentaje de humedad (Wang *et al.* 2016). El producto de almidón modificado *Glycosade*, refiere haber sido modificado por esta técnica.

2.5 Planteamiento del Problema

Las glucogenosis tienen la suficiente frecuencia como para procurar atender a quienes la padecen y preservarles la vida con la mejor calidad posible. En particular las glucogenosis I y III, se pueden tratar nutricionalmente desde la infancia y evitar consecuencias graves para la salud de los pacientes e incluso fatalidades.

Tiene especial énfasis el problema del ayuno nocturno ya que el organismo de los pacientes con glucogenosis, no es capaz de usar el glucógeno de reserva en su cuerpo. Por esto, se les trata con almidón crudo de maíz en agua, hasta con tres tomas cada noche. La alternativa, es un producto comercial de almidón de maíz modificado, de lenta digestión, que se usa en países desarrollados, y podría costar importarlo a México, alrededor de \$500 pesos por paciente por noche, a lo largo de la vida.

Es vital para pacientes con glucogenosis en países en desarrollo como el nuestro, el contar con un producto accesible que les ayude a mantener la glucemia durante varias horas por la noche, para que, tanto pacientes como sus familiares, disfruten de sueño continuo especialmente cuando son

niños, atendidos por sus padres.

La tecnología de los alimentos ofrece diversas alternativas de tratamiento del almidón, para modificarlo e influir en sus propiedades fisicoquímicas. Con algunas de éstas, se podría modular la digestión en el tracto gastrointestinal de los pacientes con glucogenosis. Una de las más sencillas y de menor costo, es el tratamiento con calor en presencia de bajas proporciones de humedad. Usando dicho tratamiento, la presente tesis, se aboca en resolver el problema tecnológico y probar que la modificación realizada, es viable para mantener la glicemia en ayuno durante varias horas.

3. HIPÓTESIS

La modificación física del almidón de maíz con calor húmedo, es una opción viable para obtener un producto con las proporciones adecuadas de tipos de almidón digestible, para mantener la glicemia al menos durante 5 h, en adultos en ayuno previo a su ingestión. Así en un futuro, sería factible usarlo en niños con glucogenosis tipo I o III.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Modificar físicamente con calor húmedo una fuente de almidón de maíz comercial para hacerlo similar en proporciones de tipos de almidón (rápida digestión y lenta digestión) a un producto comercial de diseño, para mantener la glicemia al menos durante 5 h, en adultos en ayuno previo a su ingestión.

4.2. Objetivos Específicos

Analizar contenidos de amilosa y amilopectina en diversas fuentes de almidón de maíz comercial, así como su velocidad de digestión para seleccionar la fuente de almidón a modificar.

Diseñar y aplicar tratamientos térmicos con baja humedad, para modificar físicamente un almidón comercial, haciéndolo similar en proporciones de los diversos tipos de digestibilidad *in vitro* del almidón (rápida y lenta), a un producto comercial de diseño, efectivo en el tratamiento de glucogenosis I y III.

Evaluar el almidón modificado con composición óptima, en voluntarios adultos, para probar el mantenimiento de la glicemia, durante 5 h. en forma comparable a un producto comercial de diseño, efectivo en el tratamiento de glucogenosis I y III.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Se utilizó como referencia el producto de almidón de maíz modificado Glycosade®, de la empresa Vitaflo®, comparándolo con dos marcas de almidón de maíz crudo comerciales, Maizena®, producto mexicano, y Argo® de EUA; además se comparó con un almidón de maíz ceroso (*waxy*), con alto contenido en amilopectina. Para los análisis de composición y tipos de almidones, se utilizaron juegos de reactivos de Megazyme® y todos los demás reactivos químicos fueron grado analítico de Sigma-Aldrich.

5.2 Análisis de los Productos Comerciales

5.2.1 Contenido de Amilosa y Amilopectina

Se analizó la proporción amilosa:amilopectina de los distintos almidones con base en el método colorimétrico de Megazyme International, utilizando el juego de reactivos K-AMYL 06/18 (Megazyme International, Irlanda). Se partió de las 3 muestras de almidón de maíz (ARGO®, Maizena® y almidón de maíz ceroso) y Glycosade®. El procedimiento consta de pretratamiento, cuantificación de amilosa y de almidón total.

En el pre-tratamiento, se dispersaron 25 mg de muestra en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), en baño de agua hirviendo, durante 15 min. Se agregaron 6 mL de etanol al 95%, precipitando el almidón. Se centrifugó (2,000 xg, 5 min) y descartó el sobrenadante. Al precipitado se agregaron 2 mL de DMSO y se colocó en baño de agua hirviendo, durante 15 min. Se removió del baño y se agregaron 4 mL de solvente de concanavalina A (Con A) previamente preparado (30 mL de solvente de con A a 100 mL de agua destilada). Se mezcló y se transfirió el contenido del tubo a

un matraz aforado de 25 mL, realizando varios lavados con el mismo solvente. Se aforó a 25 mL con el mismo solvente y denominó solución A.

Para cuantificar amilosa, se transfirió 1 mL de la solución A a un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 0.5 mL de Con A, previamente preparada. Se dejó reposar 1 h y se centrifugó a 14,000 xg, 10 min. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL, se agregaron 3 mL de buffer de acetato de sodio (pH 4.5) y se trató en baño de agua hirviendo para inactivar la Con A. Se colocó en un baño a 40°C, y después de 5 min se agregó 0.1 mL de una mezcla enzimática de amiloglucosidasa y α -amilasa, y se incubó otros 30 min en el mismo baño. Se centrifugó a 2,000 xg por 5 min, y se incubó 1 mL del sobrenadante con 4 mL de glucosa oxidasa/peroxidasa de Megazyme (GOPOD) durante 20 min (la incubación con GOPOD se realizó al mismo tiempo que para la cuantificación de almidón total explicado a continuación). Se leyeron ambas muestras a 510 nm, junto con un blanco y un estándar de D-Glucosa.

El almidón total se cuantificó mezclando 0.5 mL de solución A con 4 mL de buffer de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5), se le agregó 0.1 mL de la mezcla enzimática de amiloglucosidasa y α -amilasa y se incubó a 40°C, 10 min. Se transfirieron duplicados de 1 mL a tubos de ensayo y se agregaron 4 mL de GOPOD, incubando 20 min a 40°C. Se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro.

5.2.2 Velocidad de Hidrólisis

Se midió la velocidad de hidrólisis del almidón a: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 min, con base en el método de Goñi *et al.* (1997), con ligeras modificaciones, las cuales se describen a continuación. Primero, se preparó la mezcla enzimática con 0.3 g de pancreatina porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con 10 mL de agua destilada mezclando a baja velocidad, hasta que la pancreatina estuvo totalmente disuelta. Después, se centrifugó 10 min a 3,000 rpm y se guardó el sobrenadante a 4°C, hasta su uso. Se le añadieron 100 μ L de amiloglucosidasa (Megazyme, 3,300 U/mL) previamente diluida (0.64 mL de amiloglucosidasa en 0.8 mL de agua destilada).

Se tomó una muestra de 100 mg de almidón y se le añadieron 4 mL de buffer de acetato de sodio (pH 5.2, 0.5 M) y se dejó reposar 1 min. Después, se añadió 1 mL de la mezcla de enzimas previamente descrita (pancreatina y amiloglucosidasa). Se agitó suavemente en vortex y se tomó

una alícuota de 100 μ L (tiempo 0), a la cual se le agregó 1 mL de etanol al 70% para detener la reacción. Se procedió a incubar la muestra en baño con agua a 37°C, agitando manualmente cada 5-10 min. Se tomaron alícuotas a los 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 min, deteniendo cada vez la reacción con 1 mL de etanol.

Una vez obtenidas las alícuotas a los diversos tiempos, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 min. Se tomaron muestras de 33 μ L del sobrenadante de cada tiempo por duplicado, a las cuales se les agregó 1 mL de GOPOD. Se realizó una incubación en baño con agua a 50°C durante 20 min y a continuación se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (serie BioMate™ 3 de Thermo Electron Corporation).

Para cuantificar, se hizo una curva de concentración de glucosa respecto a las absorbancias de cada tiempo. Así, se evaluó la velocidad de hidrólisis de los productos obtenidos, como cambios en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo. Una vez analizados los resultados de todas las muestras, se seleccionó el producto con el comportamiento más parecido al producto Glycosade, para aplicarle los tratamientos.

5.3. Diseño y Aplicación de los Tratamientos

5.3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

Con el fin de delimitar las condiciones para el tratamiento del almidón seleccionado, y con el apoyo del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, se realizó un análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Esta técnica es un análisis que evalúa los cambios en la estructura del gránulo de almidón, al identificar las transiciones de fase, en función del tiempo (Rodríguez *et al.*, 2001). El análisis se realizó con un barrido a 10°C/min desde 15°C hasta 140°C en muestras de 100 mg de Maizena, con diferentes porcentajes de humedad: 30, 50, 80, 100 y 200%.

5.3.2 Modificación del Almidón con Calor Húmedo

En base a los datos obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido, se propuso un diseño con 2 tiempos de tratamiento y 3 temperaturas, con humedad del 30% en las muestras. La técnica de modificación física del almidón se realizó por medio de calor y humedad (llamado HMT por sus siglas en inglés, *Heat-Moisture Treatment*). Las temperaturas seleccionadas fueron 90, 95 y 100°C, con humedad de 30% durante 2 y 5 h. Como resultado, se obtuvieron 6 productos modificados. A éstos, y a los 2 productos de referencia, se les evaluó la concentración de amilosa y amilopectina y velocidad de hidrólisis con las técnicas previamente descritas.

5.4 Análisis de Digestibilidad de Almidón

Se cuantificaron los porcentajes de almidón de rápida digestión, almidón de lenta digestión y almidón resistente, de los 6 productos modificados y los 2 productos de referencia: Maizena y Glycosade, con el método colorimétrico de Megazyme International, utilizando el juego de reactivos K-DSTRS 02/19 (Megazyme International, Irlanda). El procedimiento consta de una digestión enzimática, la determinación del almidón digerible (de rápida y lenta digestión) y por último, la determinación del almidón resistente.

En la digestión enzimática, se pesaron 0.5 g de muestra y se le adicionaron 0.5 mL de etanol al 95% y 17.5 mL de buffer de maleato de sodio para después colocarlos en un baño de agua a 37°C durante 5 min, con agitación de 170 rpm para que se equilibrara el contenido. Una vez pasados los 5 min, se retiró la muestra del baño y se le agregó 2.5 mL de una solución enzimática preparada previamente de α -amilasa pancreática y amiloglucosidasa. Se volvió a colocar en baño de agua a 37°C con agitación de 170 rpm, por el siguiente tiempo:

Para la determinación de almidón digerible, se removió 1 mL de la solución a los 20 min de incubación, siendo esta fracción el almidón de rápida digestión (RDS). A los 120 min se determinó el almidón de lenta digestión (SDS) y a los 240 min el almidón total digerible (TDS). Al tomar el mililitro de la solución en su determinado tiempo, se le añadieron 20 mL de una solución de ácido

acético a 50 mM, se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su análisis. Para éste, se transfieren 2 mL de cada solución a un tubo de 2 mL de microcentrifuga y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm. Se tomaron 0.1 mL del sobrenadante por duplicado, se agregaron 3.0 mL de GOPOD y se incubó durante 20 min a 50°C antes de leer la absorbancia a 510 nm junto a un estándar de D-glucosa, por cuadruplicado.

Para la determinación del almidón resistente, después de los 240 min de incubación, mientras la muestra sigue agitándose, se tomaron 4 mL y se transfieren a un tubo de polipropileno conteniendo 4 mL de etanol al 95%. Se centrifugaron durante 10 min a 4,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se re-suspendió el precipitado en 2 mL de etanol al 50%, agitando en vortex. Se agregaron otros 6 mL de IMS, se mezcló y volvió a centrifugar 10 min a 4,000 rpm. Se repitió una vez el lavado.

Al terminar los lavados, se descartó el sobrenadante, se introdujo un magneto y 2 mL de 1.7 M NaOH. Se agitó durante 20 min en un agitador magnético sobre baño de hielo. Pasados los 20 min, se añadieron 8 mL de buffer de acetato de sodio a 1.2 M. Inmediatamente, también se agregó 0.1 mL de amiloglucosidasa (3,300 U/mL). Se mezcló e incubó durante 30 min en baño de agua a 50°C mezclando cada 5 min en vortex. Terminando la incubación, se centrifugó una alícuota de la solución por 5 min a 13,000 rpm. Después, se transfirió 0.1 mL por duplicado a tubos de ensayo, se agregaron 3 mL de GOPOD y se incubó 20 min a 50°C. Se leyó la absorbancia a 510 nm.

5.5. Escalamiento de la Modificación del Almidón

Una vez examinados los resultados del análisis, se escaló la técnica de modificación de almidón, para obtener material para realizar el ensayo *in vivo* con adultos voluntarios saludables. Se modificaron 1,800 g de almidón con las condiciones que resultaron más favorables, es decir, aquel producto con la mayor similitud al Glycosade en cuanto a porcentaje de almidón de rápida y lenta digestión. Las condiciones fueron 90°C durante 5 h, con una humedad fija del 30%.

Se modificó el almidón de la marca Maizena en envases de vidrio con tapón metálico roscado, de capacidad de 1 L, los cuales fueron previamente probados en cuanto a resistencia al calor. Se dividieron los 1,800 g de Maizena en 6 envases, una vez homogenizados, quedando 300 g de material en cada uno. Ya obtenido el almidón modificado, se cuantificó el porcentaje de almidón

de rápida y lenta digestión, con la técnica previamente descrita. Se homogeneizó el contenido de todos los recipientes en forma conjunta. Se muestreó para analizar las características del producto en cuanto a amilosa, amilopectina, tipos de almidón digestible y calorimetría diferencial de barrido, antes de proceder al ensayo de digestión y absorción en humanos.

5.6. Evaluación del Almidón Modificado Térmicamente en Humanos

Este ensayo, como parte del proyecto de tesis, fue registrado y aprobado por el Comité de Ética de CIAD, con número CEI/007-1/2020.

Se evaluaron las concentraciones de glucosa sérica en adultos saludables, posterior a la ingestión de cada uno de los dos tipos de almidón: el almidón modificado térmicamente como parte del trabajo de tesis, y el producto comercial Glycosade. Esto se realizó con diferencia de al menos una semana entre una y otra evaluación. Se incluyeron en el estudio a 9 participantes adultos, de ambos sexos, con IMC de 20 a 25 kg/m². Los criterios de exclusión fueron tener un IMC menor a 20 o mayor a 26, concentraciones de hemoglobina glicosilada mayor a 5.5, o cualquier alteración en el metabolismo de la glucosa. Se verificaron peso y talla por un miembro del equipo de trabajo, y se les pidió a los participantes presentarse en un laboratorio privado para obtener sus valores de hemoglobina glicosilada, para confirmar que fueran candidatos, así como valores de glucosa en ayuno. A quienes cumplieron los criterios y accedieron a participar (n=9), se les explicó en detalle el protocolo y solicitó firmaran la carta de consentimiento informado.

El protocolo consistió en dos días experimentales, para cada participante: en el primer día experimental, la ración de prueba consistió en el almidón modificado térmicamente como parte del trabajo de tesis. Los participantes confirmaron haber realizado un ayuno de 10 h antes de comenzar. Después de una toma de sangre basal, se le administraron a cada participante 100 g de almidón modificado, disuelto en aproximadamente 300 mL de agua. Se hizo punción del dedo a la media hora y después cada hora hasta cumplir las 5 h, analizando en cada toma con un glucómetro y registrando los valores. Al cabo de 5 h, se dio por terminado el protocolo experimental. Después de al menos una semana de lavado, y conforme a la disponibilidad de los participantes, se realizó el segundo día experimental en el cual la ración de prueba consistió en 75 g del producto comercial

Glycosade en 300 mL de agua, lo equivalente en cantidad de almidón a 100 g de el almidón de maíz modificado térmicamente (la diferencia en gramos se debe a distintos porcentajes de humedad de cada muestra), siguiendo el protocolo del primer día.

5.7. Análisis de Datos

Se compararon las medias de los porcentajes de amilosa y amilopectina, así como los tipos de almidón (rápida y lenta digestión, almidón total, almidón resistente) de las muestras de almidón tratado, la Maizena y el Glycosade, mediante prueba de Tukey, con significancia de 0.05, en el paquete estadístico NCSS, 2007.

Las medias y desviaciones estándar de los tipos de almidón, se analizaron también por el método de Ward (Murtagh *et al.*, 2011) con distancias euclidianas para hacer un análisis de conglomerados, con el objetivo clasificar los datos obtenidos basándonos en su similitud. Una vez obtenido el coeficiente de similitud, se generó un dendograma que ilustra la relación entre los 6 tratamientos de almidón modificado (90°C 2 h, 90°C 5 h, 95°C 2 h, 95°C 5 h, 100°C 2 h y 100°C 5 h), con la Maizena y el Glycosade, producto modelo para comparar eficiencia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Contenidos de Amilosa y Amilopectina en Fuentes de Almidón

Los resultados de porcentajes de amilosa y amilopectina de Argo®, Maizena®, Glycosade® y almidón de maíz ceroso, se muestran en el Cuadro 2. De acuerdo a la técnica, la referencia con alto contenido de amilosa debe de dar resultados superiores al 60% y resultó en 68.9%, por lo que se considera adecuadamente realizada.

CUADRO 2. Porcentajes de amilosa y amilopectina de los productos analizados

	Maizena®	Argo®	Maíz ceroso	Glycosade®	Alto en amilosa
Amilosa (%)	23.41±0.56 ^a	23.24±0.57 ^a	5.55±0.37 ^b	3.96 ±0.55 ^b	68.90±0.21 ^c
Amilopectina (%)	76.58±0.56 ^a	76.75±0.57 ^a	94.4±0.37 ^b	96.03±0.55 ^b	31.09±0.21 ^c

*valores en la misma fila con exponentes iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$).

Los resultados obtenidos caen en el intervalo de los informados por Alcázar-Alay y Meireles (2015), de 23 a 32% de amilosa en el almidón de maíz nativo, y 42-70% para el alto en amilosa. No hubo diferencia ($p>0.05$) en ambas marcas de almidón de cocina (Maizena® y Argo®) en cuanto a porcentajes de amilosa, con un promedio de 23.41 y 23.24%, y amilopectina, con un promedio de 76.58 y 76.75%, respectivamente. Por lo tanto, se escogió Maizena® para su modificación por tratamiento térmico a baja humedad. Se probaron ambas marcas porque algunas madres percibían que el almidón Argo® era más efectivo que la Maizena®, para el tratamiento de los niños con glucogenosis, pero los resultados en el laboratorio no muestran alguna diferencia. Por su parte, el Glycosade® está elaborado con almidón de maíz ceroso, así lo indica el productor (https://www.nestlehealthscience.us/asset-library/documents/glycosade/glycosade_bifold_2015.pdf) de allí su similitud ($p>0.05$) en contenidos de amilosa y amilopectina, al maíz ceroso analizado. No se trabajó con almidón de maíz ceroso porque es producto importado y se requiere algo accesible y de menor costo para la

población mexicana. Lo más importante en este tipo de productos, es la velocidad de digestión de los almidones y por medio de tratamiento térmico, esto se puede modular.

6.2. Selección de Condiciones para el Tratamiento Térmico

Por calorimetría diferencial de barrido, se obtuvo la temperatura de transición del almidón de maíz (Maizena®), con el fin de utilizar esa información en el diseño y la aplicación de los tratamientos térmicos. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos con porcentajes de humedad de 30, 50, 80, 100 y 200%, con los típicos picos de endotermas correspondientes a gelatinización, en alta humedad. A partir de 50% de humedad, el almidón mostró una transición de fase desde los 70.5°C, debido a la gelatinización, lo cual no conviene para la aplicación que se busca del producto final.

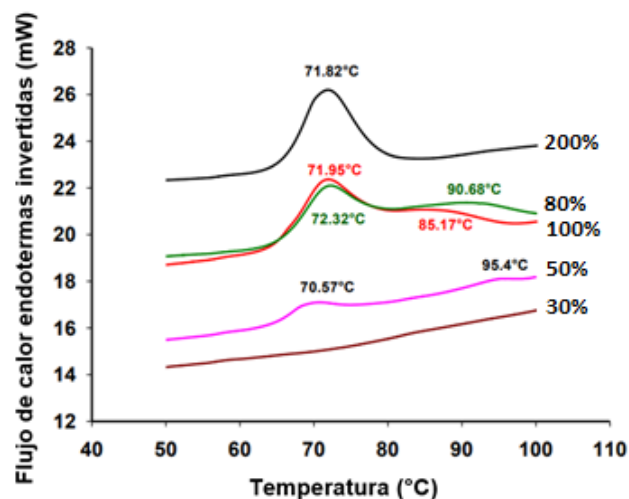


Figura 3. Cambios en transición de fase del almidón de maíz (Maizena®) con diferentes porcentajes de humedad.

El almidón con 30% de humedad, no presentó cambios notables en la transición de fase hasta los 100°C. Un análisis posterior del mismo almidón con 30% de humedad, entre 50 a 140°C, mostró un pico de transición muy pronunciado a los 112.6°C (Figura no mostrada). El comportamiento encontrado en este análisis de almidón de baja amilosa, es similar al publicado por Liu *et al.* (2005),

quienes trabajaron con almidón alto en amilosa. Sus endotermas de gelatinización se dieron desde 68.9°C, cuando tenían 75% de humedad, sin gran cambio hasta con 40% de humedad, sino hasta 128°C con 25% de humedad. Al igual que en el estudio citado, cuando el contenido de agua es menor, la endoterma es ancha y de menor entalpía; al incrementar el contenido de agua, se hace más aguda. Las temperaturas de transición se dieron muy cercanas en nuestro análisis, a las encontradas en el de Liu *et al.* (2005), independientemente del contenido de amilosa en el almidón de maíz, ya que el nuestro es de bajo contenido y el citado era alto en amilosa.

6.3. Selección de Condiciones y Características de los Productos

6.3.1. Condiciones de Tratamiento Térmico

Con la información obtenida de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido, se seleccionó la humedad de 30%, a 3 temperaturas: 90, 95 y 100°C y dos tiempos: 2 y 5 h, en horno de convección forzada.

Antes de aplicar el diseño, se hizo una prueba del tipo de reactor que se usaría; uno fue en frascos cilíndricos y otros en matraces Erlenmeyer en ambos casos con tapa, aunque no completamente hermética. Las condiciones probadas fueron 90°C durante 2 o 5 h. Así resultaron los productos A y B obtenidos por tratamiento de 2 y 5 h, respectivamente, en frascos cilíndricos; mientras que los productos C y D se obtuvieron a 2 y 5 h, en matraces Erlenmeyer.

Una vez aplicado el tratamiento piloto, se analizó velocidad de hidrólisis a los productos de las 4 muestras (A, B, C y D), a la Maizena® sin modificar y al Glycosade®, para utilizarlos como referencia. Los resultados fueron medidos como cambios en la concentración de glucosa producida, restando el valor entre cada tiempo evaluado y el inmediato anterior.

Los resultados obtenidos usando como reactores los frascos cilíndricos fueron muy variables, quizá por el gran volumen de aire en comparación al almidón en baja cantidad; en los matraces, el resultado fue más homogéneo. En la Figura 4, se muestran los datos de concentración de glucosa para el producto D (modificado durante 5 h a 90°C), el Glycosade® y la Maizena® sin tratamiento.

En ésta, se puede observar la velocidad de hidrólisis de los productos obtenidos, como cambios en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo, que ilustra gráficamente dos picos principales con máximos a los 120 y 300 min. Aunque el área bajo la curva del almidón modificado es un poco menor en ambos picos, es clara la similitud en el comportamiento general entre el almidón modificado por tratamiento a 90°C 5 h y el Glycosade®, que es la referencia buscada. Por su parte, la Maízena® solo presentó ligeras elevaciones correspondientes a producción de glucosa con un máximo a los 120 min.

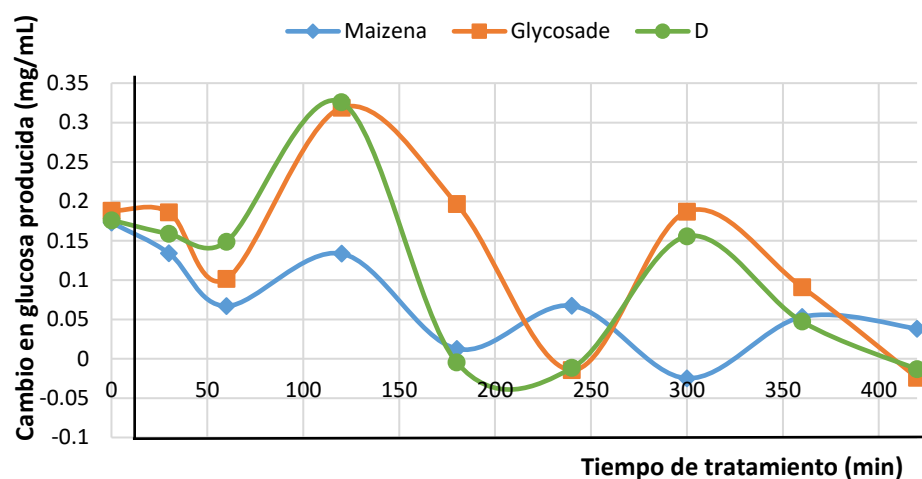


Figura 4. Cambios en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo para Maizena®, Glycosade® y producto del tratamiento de 5 h a 90°C (D), en hidrólisis *in vitro*.

El tipo de gráfica de hidrólisis como la mostrada en la Figura 4, es una idea original en este trabajo, con la intención de simular lo que ocurre en la digestión y absorción de almidón *in vivo*, donde la glucosa va produciéndose paulatinamente por digestión. A medida que se produce, se va absorbiendo y se cuantifica en circulación periférica, no se acumula en un sitio dado; de allí nuestro modelo que intenta representar dicha absorción, restando la lectura anterior en cada tiempo.

El principal beneficio del Glycosade®, es que mantiene las concentraciones de glucosa en sangre dentro del intervalo normal durante más tiempo, comparado con el almidón de maíz crudo (como lo menciona el fabricante en su página web: <https://glycosadeusa.com/about-glycosade/>), llegando en la práctica clínica a ser efectivo por hasta 7 h.

6.3.2 Tipos de Almidón en los Productos Obtenidos

En los reactores del estudio piloto (matraces Erlenmeyer con tapa) y en horno de convección forzada, se corrieron todos los tratamientos diseñados a tres temperaturas y dos tiempos. Los productos se analizaron para calcular los contenidos de almidón de cada tipo de digestión. Con el método K-DSTRS 02/19 de Megazyme, se obtuvieron los porcentajes, ajustados por humedad, que se muestran en el Cuadro 3.

Con los datos de hidrólisis de los productos de los 6 tratamientos, se construyeron curvas como las de la Fig. 4; en ninguno de los 5 tratamientos restantes al de 90°C, 5 h, se dio una coincidencia tan alta respecto al Glycosade®. Con los datos del Cuadro 3, podemos explicar dicha coincidencia. Los valores de almidón de rápida y lenta digestión, así como almidón total de ese tratamiento (90°C, 5 h) son prácticamente los mismos ($p>0.05$) que dio el Glycosade®, así es de esperarse que se digieran en forma análoga en el tiempo de hidrólisis. Del resto de los tratamientos, el de 100°C, 2 h, tampoco presentó diferencias significativas con el Glycosade en cuanto a RDS, SDS y TDS, pero no coincidió en cuanto al comportamiento de hidrólisis *in vitro*, como las de la Fig. 4. Además es riesgoso trabajar a esa temperatura, ya muy cercana a la transición térmica del almidón en estudio.

CUADRO 3. Porcentajes de almidón de cada tipo de digestión de muestras de almidón de maíz modificadas a diferentes condiciones de calor y humedad.

Producto	RDS	SDS	TDS	RS	AT
Glycosade®	36.07 ± 4.3 ^a	42.54 ± 0.12 ^{ae}	43.58 ± 2.96 ^a	7.38 ± 0.38 ^a	84.61
Maízena®	21.33 ± 0.46 ^b	45.93 ± 2.38 ^{cd}	58.93 ± 0.41 ^b	14.46 ± 0.10 ^b	84.56
90°C 2 h	41.97 ± 1.19 ^a	36.42 ± 0.81 ^b	39.35 ± 0.61 ^c	5.11 ± 0.20 ^c	83.94
90°C 5 h	37.91 ± 1.65 ^a	41.15 ± 0.11 ^a	43.06 ± 6.13 ^{ae}	3.48 ± 0.17 ^d	84.18
95°C 2 h	38.02 ± 1.2 ^a	43.21 ± 1.37 ^{ce}	37.37 ± 2.21 ^c	5.59 ± 0.01 ^e	84.54
95°C 5 h	25.13 ± 3.49 ^b	48.66 ± 1.02 ^d	49.01 ± 1.4 ^d	8.08 ± 0.51 ^a	84.68
100°C 2 h	36.49 ± 0.35 ^a	40.74 ± 1.42 ^a	42.12 ± 1.74 ^a	5.76 ± 0.07 ^e	84.56
100°C 5 h	34.96 ± 0.58 ^a	45.03 ± 0.06 ^c	48.44 ± 0.70 ^{de}	4.06 ± 0.04 ^d	84.54

*RDS: almidón de digestión rápida, SDS: almidón de digestión lenta, TDS: almidón digestible total hasta los 240 min, RS: almidón resistente y AT: almidón total. *valores en la misma columna con exponentes iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$).

Las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, se analizaron por el método de Ward (Murtagh *et al.*, 2011) con distancias euclidianas para hacer un análisis de conglomerados (Cuadro 4). Ésta, muestra que la distancia más corta (que representa mayor similitud) de cualquiera de los tratamientos con Glycosade, es con el de 100°C 2 h (5.78). La más lejana, es con la Maízena (23.9).

CUADRO 4. Matriz de distancias euclidianas incluyendo las medias y desviaciones estándar de los almidones de rápida y lenta digestión, total digerible, resistente y total.

	100° 2 h	100° 5 h	90° 2 h	90° 5 h	95° 2 h	95° 5 h	Glycosade
100° 5 h	5.6788						
90° 2 h	9.6984	14.2866					
90° 5 h	9.0807	13.4138	9.2887				
95° 2 h	4.4556	9.4258	8.8241	5.9618			
95° 5 h	12.6759	9.5990	21.5932	20.0000	15.2644		
Glycosade®	5.7815	7.4662	10.8171	10.8450	7.9343	12.9623	
Maizena®	23.7593	20.7965	32.2389	31.4507	26.7217	12.8164	23.9065

La identificación de las similitudes se hizo visualmente inspeccionando el dendograma obtenido a partir de la matriz de distancias (Figura 5A). El dendograma clasifica los 8 productos en 7 grupos de diferente jerarquía o en términos del presente estudio, distancias entre el almidón modificado en diferentes condiciones, la Maizena y el Glycosade. En el dendograma, el almidón modificado a 95°C durante 5 h y la Maizena se encuentran en un mismo grupo, siendo los más alejados, y por lo tanto los más diferentes al Glycosade. Por su parte, el almidón modificado a 100°C durante 2 h y el modificado a 95°C durante 2 h se encuentran en el mismo grupo que el Glycosade.

Con la información obtenida del análisis, se podría esperar que los almidones modificados a 95°C o 100°C, 2 h, tengan una respuesta de digestión *in vitro* parecida al Glycosade. Sin embargo, en el análisis de conglomerados se analizaron todos los parámetros incluidos en el Cuadro 3: almidón total digerible a los 240 min, almidón resistente, almidón total, almidón de rápida digestión y de lenta digestión. Así, para los fines del estudio, es más importante la interpretación física que las similitudes irrelevantes; es decir, las fracciones de rápida y de lenta digestión, son de las que depende la liberación de glucosa y así la eficiencia para el tratamiento de glucogenosis.

Debido a que la liberación de glucosa depende de los almidones de rápida y lenta digestión, se realizó otro análisis de conglomerados con solo estos dos parámetros. Como se observa en el Cuadro 5, la menor distancia euclidiana con el Glycosade es de 2.98 y corresponde al tratamiento 90°C y 5 h. Esto, se muestra gráficamente en la Fig. 5B, en donde dicho tratamiento queda en el mismo grupo que el Glycosade. Además, el producto modificado a **90°C durante 5 h**, presenta un porcentaje de almidón de rápida y lenta digestión similares ($p>0.05$) al Glycosade (Cuadro 3), lo cual explica su comportamiento en la curva de hidrólisis mostrada en la Fig. 4.

CUADRO 5. Matriz de distancias euclidianas incluyendo las medias y desviaciones estándar solo de los almidones de rápida y de lenta digestión.

	100° 2 h	100° 5 h	90° 2 h	90° 5 h	95° 2 h	95° 5 h	Glycosade
100° 5 h	3.4906						
90° 2 h	8.8093	11.8431					
90° 5 h	3.2112	5.4312	6.5962				
95° 2 h	0.8860	3.6605	8.6449	2.8974			
95° 5 h	10.4215	8.0524	18.7117	12.6485	10.2863		
Glycosade®	4.8528	5.7890	8.3699	2.9891	4.1708	11.8439	
Maizena®	16.2758	14.3140	24.5775	19.0418	16.3666	7.5544	18.8659

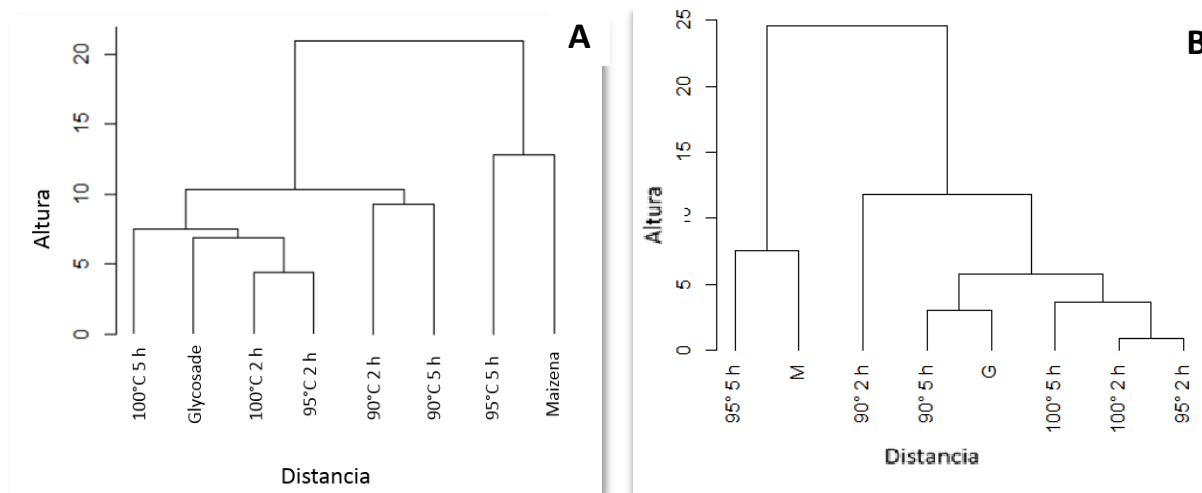


Figura 5. Dendrograma de los tipos de almidón de los diferentes tratamientos. A: se consideraron almidón total digerible, almidón resistente, almidón total, almidón de rápida digestión y de lenta digestión. B: se consideraron sólo las fracciones de almidón de rápida y de lenta digestión.

6.4 Almidón Modificado Masivamente

6.4.1 Almidón de Rápida y Lenta Digestión

Una vez encontradas las condiciones del tratamiento de modificación de almidón con resultados similares a lo buscado: humedad del 30%, temperatura de 90°C y tiempo de modificación de 5 h, se escaló el procedimiento, con el fin de obtener material suficiente para realizar el ensayo *in vivo*. Una vez modificados 1,800 g de almidón de maíz, se analizaron sus porcentajes de almidón de rápida y lenta digestión. Además del almidón modificado, se analizaron como referentes, la Maizena sin modificar, y el Glycosade. Los resultados, ya ajustados por humedad y normalizados utilizando como referencia Glycosade, se muestran en el Cuadro 6. Aunque el almidón de lenta digestión resultó comparable en proporción al del Glycosade, no fue así para el de rápida digestión. Posiblemente, se requiera optimizar condiciones en los reactores utilizados en el escalamiento, de mucho más volumen que los del primer ensayo. Desafortunadamente, no se dieron las condiciones para trabajar por más tiempo en el laboratorio, debido a la pandemia.

CUADRO 6. Porcentajes de almidón de rápida y lenta digestión de 3 tipos almidón de maíz*

Producto	RDS	SDS
Glycosade®	39.1 ± 1.71 ^a	42.3 ± 2.1 ^a
Maizena®	19.08 ± 0.13 ^b	36.45 ± 0.2 ^b
90°C 5 h	26.5 ± 1.13 ^c	42.70 ± 0.69 ^a

RDS= almidón de digestión rápida, SDS= almidón de digestión lenta.

*Valores en la misma columna seguidos con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$).

6.4.2 Contenido de Amilosa y Amilopectina

Se analizaron los porcentajes de amilosa y amilopectina del almidón de maíz modificado masivamente, así como de la Maizena® y Glycosade®, mostrando los resultados en el Cuadro 7.

CUADRO 7. Contenido de amilosa y amilopectina de almidón modificado masivamente, Maizena y Glycosade.

	90° 5 h	Maizena®	Glycosade®
Amilosa (%)	16.7±1.01 ^a	19.26±0.06 ^a	4.84 ±0.46 ^b
Amilopectina (%)	83.2±0.76 ^a	80.6±0.04 ^a	95.06±0.42 ^b

*Valores en el mismo renglón seguidos con letras iguales no difieren estadísticamente ($p>0.05$).

Como se puede observar, no hubo cambio ($p>0.05$) en las proporciones de amilosa y amilopectina, entre la Maizena y el almidón modificado a partir de la misma, puesto que los tratamientos físicos como el utilizado de baja humedad, no alteran los enlaces glicosídicos de los dos tipos en el almidón $\alpha 1-4$ y $\alpha 1-6$. Por el contrario, es probable que tanto la cristalinidad como la alineación y/o compactación de las moléculas si se modificaran, así como las regiones amorfas del almidón. El tratamiento con calor húmedo, modifica la estructura del gránulo de almidón, reduce el hinchamiento y lo hace menos soluble (Nawaz *et al.*, 2020; Veyna-Torres *et al.*, 2016). Esto podría explicar el cambio en el comportamiento de digestión *in vitro* entre el almidón de maíz modificado y la Maizena.

6.4.3 Cambios en Transición Térmica

En la Figura 6, se muestran los termogramas resultantes del análisis de calorimetría diferencial de barrido, en el cual el producto analizado fue el almidón de maíz modificado masivamente, que aparece en rojo, y la Maizena® sin modificar, en negro. Las condiciones del barrido fueron velocidad de 10°C/min desde 15 a 140°C, como en los ensayos previos. En el almidón de maíz sin modificar (en color negro) se ve una pequeña transición de fase a una temperatura aproximada de 60°C, fenómeno característico del almidón (Rodríguez *et al.*, 2001). Esta transición inicial, se debe al hinchamiento de las estructuras amorfas del gránulo de almidón. La segunda transición de fase del almidón de maíz sin modificar, con un pico mayor que la primera, se encuentra a una temperatura entre los 100 y 120°C. Por su parte, el almidón de maíz modificado muestra una

capacidad calorífica mayor, al verse disminuidas las endotermas y más bien, con un comportamiento prácticamente lineal. Como se comentó, se reduce el hinchamiento con el tratamiento de calor húmedo y no hay transición. Se puede concluir que aumentó su estabilidad térmica y su temperatura de gelatinización, debido al tratamiento con calor y humedad, al que fue sometido.

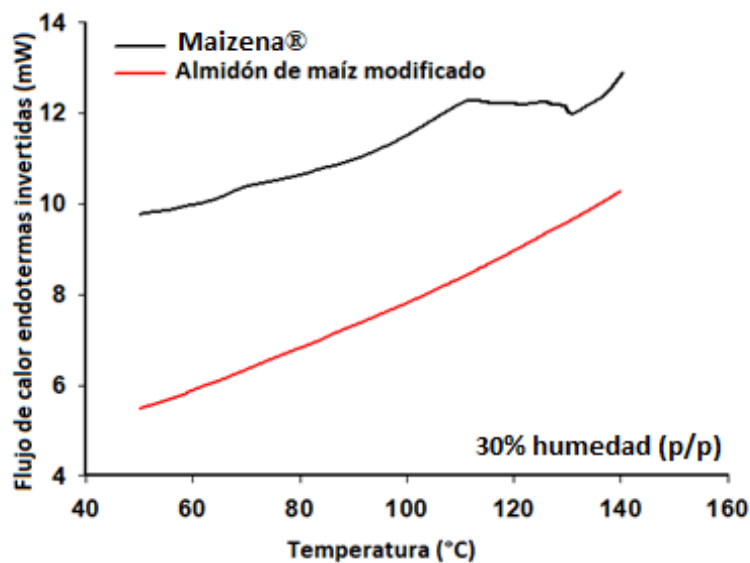


Figura 6. Cambios en transición de fase del almidón de maíz (Maizena®) sin modificar y almidón de maíz modificado, a 30% de humedad.

6.4.4 Evaluación en Humanos Adultos

En el ensayo, participaron 9 voluntarios, para probar la eficacia del almidón de maíz modificado térmicamente a baja humedad, en el mantenimiento de la glicemia. Las características de los participantes se muestran en el Cuadro 8. Participaron 4 hombres y 5 mujeres, de un intervalo de edad de 23 a 65 años, con promedio de 39.4 años. El IMC promedio de los participantes fue de 24.1 kg/m², cumpliendo todos con el criterio de inclusión de un IMC mayor a 20 y menor a 26. La concentración de glucosa en ayuno promedio fue 83.77±7.4, encontrándose todos los participantes en un intervalo entre 67-91 mg/dL, que se consideran valores normales entre 70 y 100. Sólo un

participante de sexo femenino, de 29 años de edad, mostró un valor debajo de los 70 mg/dL en ayunas, pero menciona manejar esa concentración de manera usual. En promedio, la hemoglobina glicosilada fue de 5.1%, cumpliendo todos los participantes con el criterio de inclusión de ser menor a 5.5%.

CUADRO 8. Características de los participantes en el protocolo de evaluación de la ingestión del almidón de maíz modificado térmicamente, así como Glycosade.

Participante	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	IMC (kg/m ²)	Glucosa en ayuno (mg/dL)	HbA1c (%)
1	23	83	1.82	25.1	89	5.2
2	31	75	1.70	25.9	82	5.4
3	28	61	1.61	23.5	86	5.1
4	65	70	1.65	25.7	87	5.2
5	62	79	1.76	25.5	91	5.0
6	60	67.5	1.64	25.1	78	5.1
7	26	54	1.64	20.1	89	5.2
8	29	53	1.62	20.2	67	5.1
9	31	83.1	1.79	25.9	85	5.3

IMC= índice de masa corporal, HbA1c=hemoglobina glicosilada.

La curva de glicemia de los 9 participantes, durante las 5 h posteriores a la ingestión de nuestro almidón modificado, se muestran en la Figura 7. La medición de glucosa obtenida a los 30 min de la toma de almidón, tuvo un comportamiento consistente en todos los participantes, como era de esperarse, con valor promedio de 101.5 ± 5.3 mg/dL, en todos los casos por encima de los 94 mg/dL. De manera visual, en 3 de los participantes (en 3 tonos diferentes de azul en la Fig. 7), el comportamiento de hidrólisis del almidón fue similar al encontrado previamente en hidrólisis *in vitro*. En esta última, hay dos picos de liberación de glucosa. Uno a las 2 y otro a las 5 h (Fig. 4); mientras que en los 3 casos señalados de la evaluación *in vivo*, los picos se dieron durante la primera hora y a las 3 h después de la ingestión del almidón modificado. A nuestro conocimiento, no hay estudios publicados que comparen la digestión *in vitro* con la *in vivo*, a lo largo del ensayo, como en esta forma; sería interesante un estudio al respecto.

Todos los participantes completaron las 5 h de análisis propuestas, obteniendo en la última lectura del glucómetro, una concentración de glucosa promedio de 91.4 ± 5.4 mg/dL, en la cual el valor más bajo obtenido fue de 83 mg/dL. Así, se cumplió con el objetivo general de la tesis, de mantener los valores normales de glucosa, durante al menos 5 h, con el tratamiento con almidón de maíz modificado térmicamente. Curiosamente, el almidón modificado en este estudio (al igual que el Glycosade), contiene 17% más de almidón de rápida digestión, que la Maízena sin modificar, pero mantiene la glicemia durante mucho más tiempo. Este comportamiento *in vivo* podría deberse a que la modificación disminuyó la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático para su digestión por α -amilasa.

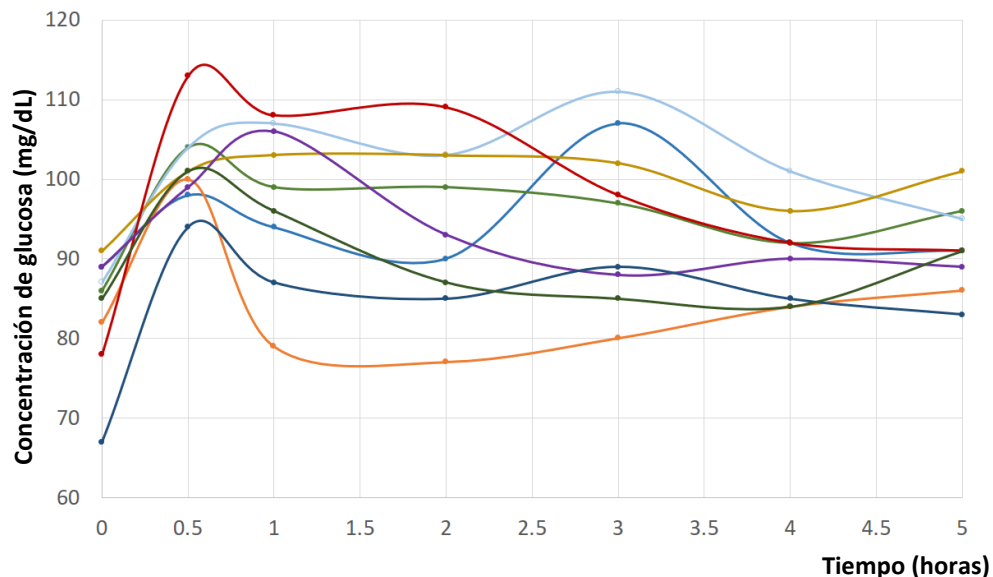


Figura 7. Concentración de glucosa (mg/dL) en sangre de los participantes después de la toma de almidón modificado durante 5 h de ayuno.

En la segunda sesión de ensayo, al menos una semana posterior a la primera, se administró a los participantes 75 g del producto comercial Glycosade, siguiendo el protocolo antes aplicado con el almidón modificado. El promedio de la glucosa durante las 5 h de iniciado el ensayo, con Glycosade, fue de 97.3 ± 6.8 mg/dL, mientras que con el almidón modificado el promedio fue de 91.4 ± 5.4 mg/dL, sin diferencia significativa entre ambos ($p > 0.05$). Al igual que en el primer día experimental, todos los participantes cumplieron las 5 h de protocolo con concentraciones óptimas de glucosa en sangre, siendo el valor más bajo obtenido de 81 mg/dL en un participante, a las 3 h

de ingerido el producto.

De acuerdo a estudios experimentales, cuando el Glycosade fue probado en jóvenes (>13 años) con glucogenosis, a quienes se suministraron 100 g, 9 de 12 permanecieron con buenas concentraciones de glucosa (>60 mg/mL) al menos durante 6 h (Correia *et al.*, 2008). En otro ensayo clínico, el mismo producto comercial mejoró la calidad del sueño de 9 pacientes adultos con glucogenosis (Rousseau-Nepton *et al.* 2018). No se ha probado administrar diferentes dosis, para ver su influencia en el tiempo de digestión.

En la Figura 8, se muestran los valores promedio, con su desviación estándar, de las concentraciones de glucosa en sangre de los participantes en ambas fases del protocolo, a lo largo de las 5 h, para el Glycosade y el almidón modificado. Visualmente se puede apreciar un comportamiento similar entre ambos; el Glycosade tiene una mayor área bajo la curva en los valores entre 1 y 2 h después de iniciado el ensayo, lo cual se compensa en el almidón modificado puesto que el área bajo la curva para las 3 y 4 h del ensayo, es también mayor que la del Glycosade.

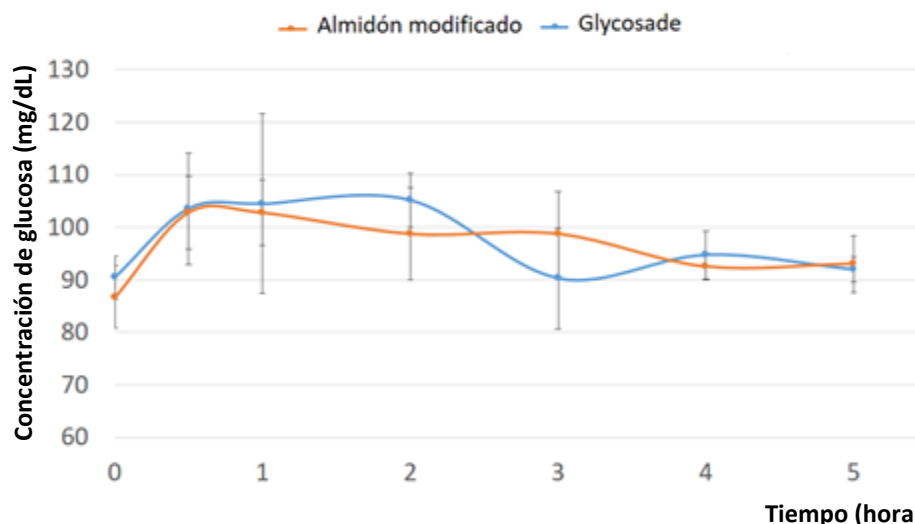


Figura 8. Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) tras la toma de almidón modificado o Glycosade.

Es importante hacer notar las diferencias observadas, así como aquellas en la percepción de los participantes entre el almidón modificado en este estudio y el Glycosade. El almidón modificado fue administrado a los participantes en 300 mL de agua, y fue muy difícil de resuspender. El

material se comportaba formando grumos difíciles de deshacer. Para solucionar el problema se molió manualmente y tamizó antes de pesar la cantidad necesaria, y se agregó poco a poco a los 300 mL de agua asegurando la homogeneidad de la suspensión. Este comportamiento de agregación no ocurrió con el Glycosade. En cuanto a la percepción sensorial de los participantes, consideraron que ninguno de los dos productos tenía un sabor agradable, pero la textura del almidón modificado era peor que la de Glycosade, dejando sensación “arenosa”.

7. CONCLUSIÓN

Se escogió una fuente de almidón de maíz comercial, en función de sus características de composición y accesibilidad, para modificación con calor húmedo. Se aplicaron los tratamientos térmicos a 90, 95 y 100 °C, por 2 y 5 h, con 30% de humedad, en base al análisis de la fuente de almidón por calorimetría diferencial de barrido. Así se obtuvo un almidón modificado similar en tipos de almidón digestible, al producto comercial ad oc para mantener la glicemia en humanos al menos durante 5 h. Al evaluarlo en adultos voluntarios, se comprobó que mantenía la glicemia en forma comparable al producto modelo efectivo en el tratamiento de las glucogenosis tipo I y III.

En esta forma, queda probada la hipótesis de que la modificación física del almidón de maíz a 90°C durante 5 h, con 30% de humedad, es una opción viable para obtener un producto con las proporciones adecuadas de tipos de almidón digestible, para mantener la glicemia en 91.4 ± 5.4 mg/dL a las 5 h de administrado, en adultos en ayuno previo a su ingestión. Así en un futuro, sería factible usarlo en niños con glucogenosis tipo I o III.

8. REFERENCIAS

- Agama-Acevedo E, Ottenhof MA, Farhart IM, Paredes-López O, Ortiz-Cereceres J, Bello-Pérez LA. 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia*. 29(11): 643-649
- Alcázar-Alay SC y Meireles MA. 2015. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Sci Technol*. 35(2):215-236
- Angelini C, Sempicini C, Fanin M. 2009. Progress in Enzyme Replacement Therapy in Glycogen Storage Disease Type II. *Ther Adv Neurol Disord*. 2(3): 143-153
- Arenas CA, Pedraza DJ. 2017. Evaluación del proceso de modificación de almidón de papa mediante acetilación y oxidación, para su aplicación como excipiente en la industria farmacéutica a nivel laboratorio (Tesis de pregrado). Universidad de América, Bogotá, D.C
- Bali DS, Chen YT, Austin S, Goldstein JL. (2016). Glycogen Storage Disease Type I En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA ed. *GeneReviews*. Seattle, Washington. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1312/>
- Bhattacharya K, Orton RC, Qi X, Mundy H, Morley DW, Champion MP, *et al*. 2007. A novel starch for the treatment of glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 30(3): 350-357
- Biliaderis CG, Maurice TJ, Vose JR. 1980. Starch Gelatinization Phenomena Studied by Differential Scanning Calorimetry. *J Food Sci*. 45(6): 1669-1674
- Brambilla A, Mannarino S, Pretese R, Gasperini S, Galimberti C, Parini R. 2014. Improvement of Cardiomyopathy After High-Fat Diet in Two Siblings with Glycogen Storage Disease Type III. 17:91-95
- Calderón De la Barca AMC, Islas-Rubio AR, Heredia NG, Cabrera-Chávez F. 2016. Enzymatic Modification of Proteins and Starches for Gluten-Free and Low-Glycaemic-Index Foods for Special Dietary Uses. En: Ravishankar RV ed. *Advances in Food Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom, 133-144 pp
- Castillo L, Ventureli MG, Paz V y Sumire J. 2020. Glucogenosis hepática: a propósito de un caso. *Rev Gastroenterol Peru*. 40 (1): 73-76
- Chen YT, Cornblath M, Sidbury JB. 1984. Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N Eng J Med*. 310(3):171-175
- Chen YT. 2001. Glycogen storage diseases. En: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Mc Graw-Hill, USA, 1521-1551 pp
- Correia CE, Bhattacharya K, Lee PJ, Shuster JJ, Theriaque DW, Shankar MN, *et al*. 2008. Use of modified cornstarch therapy to extend fasting in glycogen storage disease types Ia and Ib. *Am J Clin Nutr*. 88(5): 1272-1276
- Dahlberg KR, Ferrecchia IA, Dambska-Williams M, Resler TE, Ross KM, Butler GL, Kuo CL, Ryan PT, Weinstein DA. 2020. Cornstarch requirements of the adult glycogen storage disease Ia population: a retrospective review. *J Inherit Metab Dis*. 43:269-278

- Dambska M, Labrador EB, Kuo CL, Weinstein DA. 2017. Prevention of complications in glycogen storage disease Ia with optimization of metabolic control. *Pediatric Diabetes*. 18:327-331
- El-Karakasy H, Anwar G, El-Raziky M, Mogahed E, Fateen E, Gouda A, *et al.* 2014. Glycogen storage disease type III in Egyptian children: A single centre clinic-laboratory study. *Arab J Gastroenterol*. 15: 63-67
- Ellingwood S and Cheng A. 2018. Biochemical and Clinical Aspects of Glycogen Storage Diseases. *J Endocrinol*. 238(3): R131-R141
- Ferreira CR y Van Karnebeek CDM. 2019. Inborn errors of metabolism. *Hand Clin Neurol*. 162:449-481
- Goñi I, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutr Res Rev*. 17(3): 427-437
- Greene HL, Slonim AE, O'Neill JA, Burr IM. 1976. Continuous nocturnal intragastric feeding for management of type 1 glycogen-storage disease. *N Engl J Med*. 294 (8): 423-425
- Heller S, Worona L, Consuelo A. 2008. Nutritional Therapy for Glycogen Storage Diseases. *J Pediatr Gastr Nutr*. 47: 515-521
- Hijazi G, Pai N, Nagy LL, Herd S, Dickson J, Ram M, Inbar-Feigenberg M. 2019. Use of waxy maize heat modified starch in the treatment of children between 2 and 5 years with glycogen storage disease type I: A retrospective study. *Mol Genet Metab*. 21: 100536
- Humphrey M, Truby H, Boneh A. 2014. New ways of defining protein and energy relationships in inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab*. 112: 247-258
- Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, Arn P, Bali DS, Boney A, *et al.* 2014. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 16(11): 1-29
- Kishnani PS, Austin SL, Arn P, Bali DS, Boney A, Case L, *et al.* 2010. Glycogen Storage Disease Type III diagnosis and management guidelines. *Genet Med*. 12(7): 446-463
- Kishnani PS, Goldstein J, Austin S, Arn P, Bachrach B, Bali DS, Chung WK, *et al.* 2019. Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 21(4): 772-789
- Kishnani PS, Sun B y Koeberl DD. 2019. Gene therapy for glycogen storage diseases. *Hum Mol Genet*. 28(1):31-41
- Koeberl DD, Kishnani PS, Chen YT. 2007. Glycogen storage disease types I and III: Treatment updates. *J Inherit Metab Dis*. 30(2): 159-164
- Lee PJ, Dixon MA, Leonard JV. 1996. Uncooked cornstarch- efficacy in type I glycogenosis. *Arch Dis Child*. 74(6): 546-547
- Lewicka K, Siemion P, Kurcok P. 2015. Chemical modifications of starch: Microwave effect. *Int J Polym Sci*. 2015 (9):1-10
- Linares L, Ureña M, Ruales J. 2015. Efecto del curado sobre las propiedades térmicas del almidón de camote (*Ipomea batatas* L.). *Agroind Sci*. 5(1): 27-35

- Liu H, Xie F, Chen L, Yu L, Dean K y Bateman S. 2005. Thermal Behaviour of High Amylose Cornstarch Studied by DSC. *Int J Food Eng.* 1 (1)
- Martín JC, López E. 2009. Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. *Rev Colomb Quim.* 38(3): 395-408
- Melis D, Rossi A, Pivonello R, Del Puente A, Pivonello C, Cangemi G, *et al.* 2016. Reduced bone mineral density in glycogen storage disease type III: evidence for a possible connection between metabolic imbalance and bone homeostasis. *Bone.* 86:79-85
- Murtagh F y Legendre P. 2011. Ward's Hierarchical Clustering Method: Clustering Criterion and Agglomerative Algorithm. *J Clasiff.* 31(3):274-295
- Nalin T, Venema K, Weinstein DA, de Souza CFM, Perry IDS, van Wandelen MTR, *et al.* 2015. In vitro digestion of starches in a dynamic gastrointestinal model: an innovative study to optimize dietary management of patients with hepatic glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis.* 38: 529-536
- Nawaz H, Waheed R, Nawaz M y Shahwar D. 2020. Physical and Chemical Modifications in Starch Structure and Reactivity en: Martins E ed. *Chemical Properties of Starch.* IntechOpen, 1-5 pp
- Ochoa M, Miranda K, Guilcapi C, Giler N, Arguello M y Aldean J. 2019. Glucogenosis Hepática. Características clínicas, laboratoriales e imagenológicas en pacientes pediátricos menores de 15 años. *Rev Med Eugenio Espejo.* 7(11):1-6
- Ozen H. 2007. Glycogen storage diseases: New perspectives. *World J Gastroenterol.* 13(18): 2541-2553
- Peñaranda-Contreras OI, Perilla-Perilla JE, Algecira-Enciso NA. 2008. Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. *Revista Ingeniería e Investigación.* 28(3): 47-52
- Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit PA. 2002. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I. *Eur J Pediatr.* 161: 520-535
- Ríos-Romero EA, Ochoa LA, Morales J. 2015. Efecto del tratamiento con ultrasonido sobre las propiedades funcionales y estructurales de almidón procedente de diversas fuentes: Una revisión. *Rev Biotecnia.* 8(2): 16-23
- Rodríguez P, San Martín ME y González de la Cruz G. 2001. Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superf y Vacío.* 13:61-65
- Ross KM, Brown LM, Corrado MM, Chengsupanimit T, Curry LM, Ferrecchia IA, Porras LY, *et al.* 2015. Safety and Efficacy of Long-Term Use of Extended Release Cornstarch Therapy for Glycogen Storage Disease Types 0,III, VI, and IX. *J Nutr Ther.* 26:85-90
- Rossi A, Hoogeveen I, Bastek VB, Boer F, Montanari C, Meyer U, Maiorana A, Bordugo A *et al.* 2020. Dietary lipids in glycogen storage disease type III: A systematic literature study, case studies, and future recommendations. *J Inherit Metab Dis.* 43:770-777
- Rousseau-Nepton I, Huot C, Laforte D, Mok E, Fenyves D, Constantin E, *et al.* 2018. Sleep and quality of life of patients with glycogen storage disease on standard and modified uncooked

cornstarch. *Mol Genet Metab.* 123(3): 326-330

- Sentner C, Hoogeveen IJ, Weinsten DA, Santer R, Murphy E, McKiernan P, Steuerwald U, *et al.* 2016. Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J Inherit Metab Dis.* 39: 697-704
- Shimizu S, Sakamoto S, Horikawa R, Fukuda A, Uchida H, Takeda M, Yanahi Y, Irie R, Yoshioka T y Kasahara M. 2019. Longterm outcomes of living donor liver transplantation for glycogen storage disease type 1b. *Liver Transplant.* 26(1): 57-67
- Solorzano S, Balsamo V, Ehrmann E. 2011. Modificación química del almidón de yuca con anhídrido maleico vía microondas. *Rev LatinAm Metal Mat.* 3:4-5
- Steunenberger TAH, Peeks F, Hoogeveen IJ, Mitchell JJ, Mundy H, de Boer F, *et al.* 2018. Safety issues associated with dietary management in patients with hepatic glycogen storage disease. *Mol Genet Metab.* 125(1-2):79-85
- Szymanska E, Emczynska-Seliga E, Rokicki D, Ksiazek J. 2017. Body composition measurements using bioelectrical impedance analysis (BIA) in pediatric patients with hepatic glycogen storage disease – Preliminary data. *Clin Nutr ESPEN.* 19: 35-37
- Valayannopoulos V, Bajolle F, Arnoux JP, Dubois S, Sannier N, *et al.* 2011. Successful Treatment of Severe Cardiomyopathy in Glycogen Storage Disease Type III With D,L-3-Hydroxybutyrate, Ketogenic and High Protein Diet. *Pediatr Res.* 70 (6): 638-641
- Veyna-Torres JI, Castañeda-Pérez A, Chávez-Murillo CE. 2016. Análisis fisicoquímico de harinas de leguminosas modificadas hidrotérmicamente. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 1(2): 13-19
- Wang H, Zhang B, Chen L, Li X. 2016. Understanding the structure and digestibility of heat-moisture treated starch. *Int J Biol Macromol.* 88: 1-8
- Zavareze EDR, Dias ARG. 2011. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: a review. *Carbohydr Polym.* 83: 317-328
- Zhang G, Hamaker BR. 2009. Slowly Digestible Starch: Concept, Mechanism, and Proposed Extended Glycemic Index. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 49(10): 852-867
- Zhang Y, Sun H y Wan N. 2019. Mutation analysis of SLC37A4 in a patient with glycogen storage disease-type 1b. *Glob J Med Res.* 47(12): 5996-6003
- Zia-ud-Din, Xiong H, Fei P. 2017. Physical and chemical modification of starches: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(12): 2691-2705