



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Caracterización nanoscópica superficial de películas de almidón extraído de
tubérculos andinos

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jhomara Mercedes De la Vega Camalle

Tutor: PhD. Santiago Casado Rojo

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Santiago Casado Rojo

CERTIFICA

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 9 de febrero del 2023


PhD. Santiago Casado Rojo

C.I. 1759126954

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jhomara Mercedes De la Vega Camalle, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Jhomara Mercedes De la Vega Camalle

C.I. 1752884823

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Lic.M.Sc. Yoel Hernández Navarro

C.I. 1754821989

Ph.D Diego Manolo Salazar Garcés

C.I. 1803124294

Ambato, 10 de marzo del 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jhomara Mercedes De la Vega Camalle

C.I. 1752884823

AUTORA

DEDICATORIA

*Con todo mi amor a mi pequeña hija **Kristen**, mi fuente de motivación, a quien le debo todo lo que soy ahora, sin su amor y comprensión no hubiese sido posible llegar hasta aquí. Este logro es en agradecimiento a tu paciencia estos 5 años acompañando a estudiar a mamá. Anhele con el corazón, que el mismo sea tu paradigma en algún momento de tu vida.*

*A mi madre **Laura**, quien sembró en mí el amor por la ciencia, su ejemplo, amor incondicional y paciencia han constituido un pilar fundamental en la evolución de mi vida profesional.*

*A mi esposo **Cristian**, mi compañero de vida, quien con su ejemplo me motivó a cumplir todo lo que me he propuesto, su apoyo incondicional fue indispensable para el cumplimiento de mis metas profesionales. Te amo siempre.*

Jhomara Mercedes

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, mi esposo, mi hija, mi abuelito y a mis hermanos, por ser un apoyo incondicional a lo largo de esta trayectoria.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por constituir la base del conocimiento para todos los estudiantes que un día comenzamos nuestros estudios superiores allí, en busca de cumplir nuestros sueños. También, agradecer su apertura en conjunto con la UODIDE-FCIAB para la prestación de materiales y equipos sin los cuales no hubiese sido posible el desarrollo del presente trabajo.

Con cariño, a mi tutor y mentor, PhD. Santiago Casado Rojo, por su guía en el desarrollo del presente trabajo. Gracias infinitas por su paciencia, dedicación y por compartir sus conocimientos con mi persona.

A la PhD. Mirari Arancibia, PhD. Irvin Tubón y a la Ing. Cynthia Pico por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo del presente.

A mis amigos de la carrera, con quienes compartí buenos y malos momentos a lo largo de esta trayectoria.

Finalmente, a mi amiga fiel masha, su compañía hizo de mis desvelos tiempos más fáciles y llevaderos.

Jhomara Mercedes

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
INDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPITULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.2. Tubérculos andinos.....	1
1.1.2.1. Melloco	1
1.1.2.1.1. Aspectos generales	1
1.1.2.1.2. Descripción.....	1
1.1.2.2. Mashua	2
1.1.2.2.1. Aspectos generales	2
1.1.2.2.2. Descripción.....	2
1.1.2.3. Oca	3
1.1.2.3.1. Aspectos generales	3
1.1.2.3.2. Descripción.....	3
1.1.2.4. Papa o patata	4

1.1.2.4.1.	<i>Aspectos generales</i>	4
1.1.2.4.2.	<i>Descripción</i>	4
1.1.3.	Almidón de tubérculos andinos	5
1.1.4.	Películas de almidón	6
1.1.5.	Importancia del desarrollo de películas de almidón en la Biotecnología ..	6
1.1.6.	Caracterización nanoscópica.....	6
1.1.6.1.	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	6
1.1.6.2.	Modo de operación contacto intermitente (<i>tapping</i>).....	8
1.1.6.3.	Modo de operación no contacto intermitente.....	8
1.1.6.4.	Potencial del AFM en el estudio de muestras biológicas.....	8
1.1.7.	Caracterización macroscópica	9
1.1.7.1.	Espectrofotometría de infrarrojo de TF.....	9
1.1.7.2.	Espectrofotometría de UV/Vis	10
1.1.7.3.	Contenido de humedad.....	10
1.2.	Objetivos.....	11
1.2.1.	Objetivo General.....	11
1.2.2.	Objetivos Específicos	11
CAPITULO II		12
2.	METODOLOGÍA	12
2.1.	Materiales	12
2.1.1.	Materiales de laboratorio	12
2.1.2.	Equipos de laboratorio	12
2.1.3.	Insumos de laboratorio.....	13
2.1.4.	Materiales de escritorio.....	13
2.1.5.	Aplicaciones para análisis de datos	13
2.2.	Métodos	14
2.2.1.	Obtención de muestras.....	14

2.2.2.	Caracterización nanoscópica.....	14
2.2.2.1.	<i>Deposición de las muestras en el AFM</i>	14
2.2.2.2.	<i>Medición por Microscopía de fuerza atómica</i>	14
2.2.2.3.	<i>Procesamiento de las imágenes de AFM</i>	15
2.2.3.	Caracterización macroscópica	15
2.2.3.1.	<i>Espectrofotometría de infrarrojo de TF</i>	15
2.2.3.2.	<i>Espectrofotometría UV/VIS</i>	15
2.2.3.3.	<i>Análisis de humedad</i>	16
2.2.3.4.	<i>Caracterización por microscopía óptica</i>	16
2.2.3.5.	<i>Materia Total Soluble (MTS)</i>	16
2.2.3.6.	<i>Propiedades elásticas</i>	17
2.2.3.	Comparación entre el análisis nanoscópico y macroscópico.....	17
CAPITULO III.....		18
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	18
3.1.1.	Caracterización nanoscópica.....	18
3.1.1.1.	<i>Fijación de la muestra</i>	18
3.1.1.2.	<i>Topografía</i>	18
3.1.1.3.	<i>Contraste de fase</i>	21
3.1.2.	Caracterización macroscópica	26
3.1.2.1.	<i>Caracterización por microscopía óptica</i>	26
3.1.2.2.	<i>Absorción infrarroja por Transformada de Fourier</i>	27
3.1.2.3.	<i>Opacidad</i>	28
3.1.2.4.	<i>Contenido de humedad</i>	28
3.1.2.5.	<i>Materia total soluble (MTS)</i>	29
3.1.2.6.	<i>Propiedades elásticas</i>	30
3.1.3.	Relación entre los resultados nanoscópicos y macroscópicos	31

3.2. Verificación de hipótesis	32
CAPITULO IV	33
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.1. Conclusiones.....	33
4.2. Recomendaciones	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS.....	42
ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales de laboratorio</i>	12
Tabla 2. <i>Equipos de laboratorio</i>	12
Tabla 3. <i>Insumos de laboratorio</i>	13
Tabla 4. <i>Materiales de escritorio</i>	13
Tabla 5. <i>Aplicaciones para análisis de datos</i>	13
Tabla 6. <i>Número de regiones y su porcentaje de presencia en el área total de las películas de almidón extraído de los diferentes tubérculos andinos analizados.</i>	23
Tabla 7. <i>Opacidad medida en las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.</i>	28
Tabla 8. <i>Contenido de humedad de las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.</i>	29
Tabla 9. <i>Materia total soluble de las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.</i>	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) <i>Cultivo de melloco.</i> (B) <i>Variedad de mellocos.</i>	2
Figura 2. (A) <i>Cultivo de mashua.</i> (B) <i>Tubérculo andino mashua.</i>	3
Figura 3. (A) <i>Cultivo de oca.</i> (B) <i>Tubérculo andino oca.</i>	4
Figura 4. (A) <i>Cultivo de papa.</i> (B) <i>Diversidad de papas.</i>	5
Figura 5. <i>Imágenes de fase obtenidas con el AFM empleando diferentes métodos de fijación.</i>	18
Figura 6. <i>Imágenes topográficas bidimensionales de microscopía de fuerza atómica medidas utilizando el modo tapping en la superficie de películas de almidón de cada tubérculo andino escaneado en diferentes rangos de área.</i>	19
Figura 7. <i>Comparación de la topografía tridimensional entre imágenes de $5\mu\text{m}^2$ de área de películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.</i>	20
Figura 8. <i>Imágenes de contraste de fase en modo tapping medidas en películas de almidón extraído de cada tubérculo andino en diferentes zonas.</i>	22
Figura 9. <i>Reconocimiento e identificación de zonas ubicadas sobre un determinado umbral de las películas de almidón extraído de los tubérculos andinos analizados.</i> 24	
Figura 10. <i>Aspecto visual aparente de las películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.</i>	26
Figura 11. <i>Micrografías de películas de almidón extraídas de cada tubérculo andino analizadas en reflexión usando iluminación de transmisión de luz blanca</i>	26
Figura 12. <i>Espectros de absorción infrarroja por transformada de Fourier medidos en las películas formuladas con almidón de los tubérculos andinos estudiados. Las flechas resaltan los picos representativos.</i>	27
Figura 13. <i>Propiedades mecánicas obtenidas sobre las películas extraídas de cada tubérculo andino analizado.</i>	30
Figura A1. <i>Comparación de microscopía de fuerza atómica topográfica tridimensional entre imágenes de $10\mu\text{m}^2$ de área de películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.</i>	42

Figura A2. <i>Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de melloco.</i>	43
Figura A3. <i>Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de mashua.</i>	43
Figura A4. <i>Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de oca.</i>	44
Figura A5. <i>Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de papa.</i>	44

RESUMEN

La sustitución de polímeros sintéticos por biopelículas de almidón es un campo en estudio con gran potencialidad. Son materiales no tóxicos, biodegradables, biocompatibles y relativamente fáciles de obtener de varias fuentes vegetales. Para darles una aplicación correcta es necesario conocer sus propiedades, y, varias de las causas de las mismas pueden ser explicadas por fenómenos encontrados a escala nanoscópica. El presente trabajo muestra el análisis de superficie con microscopía de fuerza atómica de biopelículas de almidón extraído de los tubérculos andinos melloco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*) y papa (*Solanum tuberosum*). La caracterización ha revelado importantes diferencias a nanoescala entre las biopelículas a base de almidón examinadas. Estos se han contrastado con los efectos observados a escala macroscópica como el contenido de humedad, materia total soluble, propiedades elásticas, opacidad y absorción IR. La comparación permitió correlacionar algunas de éstas con la topografía y la segregación de contraste de fase medidas en modo *tapping* a nanoescala. Es así como, aquellas muestras que presentan topografía granular y fases desconectadas se podrían asociar con menor fuerza elástica y mayor afinidad por las moléculas de agua.

Palabras clave: Películas de almidón, tubérculos andinos, microscopía de fuerza atómica, caracterización nanoscópica, nanociencia, melloco, mashua, oca, papa.

ABSTRACT

Biopolymers are an alternative to synthetic polymers. In particular, starch-based films have a huge research potentiality: they are non-toxic, easily degradable, use green chemistry, and can be obtained from many different natural sources. In order to use them for practical applications it's important to understand the ultimate causes of their useful macroscopic properties, and they may be found at the nanoscopic scale. Here we present analysis performed by atomic force microscopy, characterizing the nanoscopic topographic surfaces of samples extracted from the Andean tubers melloco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*) and potato (*Solanum tuberosum*). Measurements revealed significant differences among the films extracted from these tubers. These results were contrasted to macroscopic measurements such as moisture content, total soluble matter, elastic properties, opacity and IR absorption spectra. Phase contrast segregation and topography AFM *tapping* images permitted the correlation. Hence, we could relate those samples with granular and phase segregations at the nanoscale to the less elastic forces and water affinity.

Keywords: Starch biofilms, Andean tubers, atomic force microscopy, nanoscopic characterization, nanoscience, melloco, mashua, oca, potato.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.2. Tubérculos andinos

Los valles interandinos son un medio ideal para el florecimiento de la biodiversidad gracias a sus condiciones geográficas, orográficas y edáficas (**Pacheco et al., 2020**). Sus características ambientales han permitido crear sistemas agrícolas eficientes adaptados a la naturaleza climática del territorio (**Lim, 2016**). En base a esto, se ha aprovechado una amplia gama de recursos biológicos como el cultivo de tubérculos andinos (**Clavijo et al., 2014**).

Los tubérculos son tallos modificados de crecimiento subterráneo, distintivos por su forma engrosada, en donde almacenan los nutrientes conservados por la planta (**Clavijo et al., 2014**). En los agroecosistemas andinos se presentan cuatro especies consideradas claves en la seguridad alimentaria y cultural de países andinos: melloco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaleoum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*) y papa (*Solanum tuberosum*). Actualmente, estos tubérculos son producidos en pequeñas áreas bajo técnicas tradicionales. La escasa promoción y el carente consumo de estos cultivos ha generado un grave riesgo de extinción (**García et al., 2018**). Esto ha motivado la creación de iniciativas que promueven su aprovechamiento en diferentes industrias, atribuyendo un enfoque diverso para su uso, por medio de la explotación de sus propiedades nutricionales y fitoquímicas (**Pacheco et al., 2020**).

1.1.2.1. Melloco

1.1.2.1.1. Aspectos generales

Nombre científico: *Ullucus tuberosus*

Familia: Basellaceae

Nombres comunes en Ecuador: melloco, olluco, melluco, millicu, aymara, quinq.

1.1.2.1.2. Descripción

El melloco es una planta herbácea compacta de crecimiento bajo de 20-50 cm de numerosos tallos semipostrados y flores poco erguidas. Sus hojas son acorazonadas y de color verde oscuro en el haz y más claro en el envés. Los tubérculos presentan

formas ovoides alargadas o esféricas y su piel es lisa de color verde, amarillo, blanco, naranja, rojo o rosa (García et al., 2018).



Figura 1. (A) Cultivo de melloco. (B) Variedad de mellocos. Tomado de (Lim, 2015).

El melloco es el segundo tubérculo andino más importante después de la papa, formando parte de la alimentación de la gran mayoría de la población ecuatoriana (Pacheco et al., 2020). Se distingue por su alto valor nutricional, alabado por quienes lo consumen, pues contiene 11-14% de carbohidratos, 1 a 2% de proteína y 3 a 5% de fibra (Velásquez et al., 2021).

1.1.2.2. Mashua

1.1.2.2.1. Aspectos generales

Nombre científico: *Tropaeolum tuberosum*

Familia: Tropaeolaceae

Nombres comunes en Ecuador: mashua, mashwa, mafua, majua, mashuar, mauja.

1.1.2.2.2. Descripción

Es una planta herbácea anual de crecimiento rastrero de 0,5-2 m de altura. Se caracteriza por sus tallos cilíndricos, aéreos y hojas delgadas de color verde brillante. Ésta puede enroscarse o trepar por encima de otras plantas utilizando el tacto. Los tubérculos son cónicos y alargados, de superficie rugosa y varían de color: pueden ser blancos, amarillos, rojos, rosas o púrpuras (Lim, 2016).



(A)

(B)

Figura 2. (A) *Cultivo de mashua.* (B) *Tubérculo andino mashua.* Tomado de (Clavijo et al., 2014).

La mashua se cultiva en pequeñas parcelas de campesinos de los Andes. Coloquialmente se le conoce como “compañera de la oca”, pues entre ambos cultivos cumplen una relación simbiótica donde se defienden de la presencia de plagas (Suquilanda, 2009). Su valor nutricional es alto, pues contiene un estimado de 9-11% de carbohidratos, 6,9 a 16% de proteína y 77,37mg de vitamina A/100g materia fresca (Valcárcel et al., 2013).

1.1.2.3.Oca

1.1.2.3.1. Aspectos generales

Nombre científico: *Oxalis tuberosa*

Familia: Oxalidaceae

Nombres comunes en Ecuador: oca

1.1.2.3.2. Descripción

Planta herbácea anual, de tallos suculentos y crecimiento prostrado. Sus hojas son acorazonadas de color verde azulado. Los tubérculos presentan forma elipsoidal y cilíndrica y su piel es de color blanco, amarillo, rojo o morado (Flores, 2011).



(A)

(B)

Figura 3. (A) *Cultivo de oca.* (B) *Tubérculo andino oca.* Tomado de (Clavijo et al., 2014).

En la zona andina, este tubérculo es usado como alimento y medicina tradicional. En los Altos Andes es el segundo cultivo más importante por su agradable sabor y brillantes colores (García et al., 2018). Su contenido nutritivo es muy variable, sin embargo, por lo general contiene 9% de proteína y 14-20% de carbohidratos. Destaca su contenido de 22 mg de calcio/100 g materia fresca (Valcárcel et al., 2013).

1.1.2.4. Papa o patata

1.1.2.4.1. Aspectos generales

Nombre científico: *Solanum tuberosum*

Familia: Solanaceae

Nombres comunes en Ecuador: papa, patata.

1.1.2.4.2. Descripción

Es una hierba erecta y extensa, de 30-100 cm de altura, su tallo es robusto y ramificado y sus hojas son alternadas. Los tubérculos son subterráneos y de forma globosa, achatada o elíptica. Estos varían en color: pueden ser blancos, marrones, amarillentos, rosas, rojos o morados (García et al., 2018).



(A)

(B)

Figura 4. (A) *Cultivo de papa.* (B) *Diversidad de papas.* Tomado de **(Lim, 2016)**

La papa es uno de los cultivos más importantes de la región Andina, calificada como una de las fuentes vegetales más nutritivas debido a su alto contenido de almidón (15%) y proteínas (2g/100g materia fresca). Actualmente forma parte de los alimentos más consumidos a nivel mundial. Además, la harina de papa es un producto con una alta versatilidad en la industria alimenticia, pues no contiene gluten, por lo que se utiliza como sustituto de otras harinas **(Lim, 2016)**.

1.1.3. Almidón de tubérculos andinos

El almidón es una macromolécula compuesta por amilosa y amilopectina, cuya proporción varía de acuerdo con la especie. Éste opera como reserva calórica de la mayoría de los vegetales. Es uno de los polisacáridos más producidos con diferentes fines industriales **(Cruz et al., 2016)**. En los últimos años, se ha incrementado el aislamiento de almidón de fuentes vegetales no convencionales como los tubérculos andinos, los cuales se caracterizan por su alto contenido de hidratos de carbono, especialmente almidón, ya que cumplen con propiedades reológicas y viscoelásticas óptimas para su aplicación. Tubérculos como el melloco, la mashua, la oca o la papa son fuentes ricas en almidón **(Pacheco et al., 2019)(Zhu & Cui, 2020)**, lo que los convierte en una potencial fuente de extracción de dicho polisacárido. Estudios realizados por **Velásquez et al., (2021)** y **Valcárcel et al., (2013)** sugieren que el almidón extraído de melloco, mashua, oca y papa reflejan propiedades fisicoquímicas funcionales, por lo que pueden ser utilizados en sistemas alimentarios y otras aplicaciones industriales.

1.1.4. Películas de almidón

Debido a su abundancia en la naturaleza y bajo costo, el almidón es una de las materias primas más relevantes para reemplazar a los polímeros sintéticos en una serie de aplicaciones (Souza et al., 2022). En general, se considera no tóxico, biocompatible y biodegradable y, por lo tanto, califica como una alternativa fiable para diversos usos (Singh et al., 2022). El almidón tiene habilidades para formar películas, las cuales tienden a ser delgadas y transparentes, sin color ni olor y con características de barrera eficiente contra el CO₂ y el O₂, reflejando así su capacidad de conservar compuestos bioactivos (Ogunsona et al., 2018). La fuente de extracción de almidón es un componente clave en la elaboración de las láminas, pues dependiendo de ésta las propiedades mecánicas y viscoelásticas del material varían (Cheng et al., 2022).

1.1.5. Importancia del desarrollo de películas de almidón en la Biotecnología

La asociación de biopolímeros y compuestos bioactivos ha sido ampliamente estudiada, dando lugar al desarrollo de materiales bioactivos con propiedades antioxidantes y microbianas mejoradas (Araújo et al., 2018)(Cunha et al., 2021). Estos asociados son importantes para numerosas aplicaciones biotecnológicas en industrias como la farmacéutica, la alimenticia, la nutracéutica, la biomédica, la cosmética y la de envasado (Souza et al., 2022).

1.1.6. Caracterización nanoscópica

1.1.6.1. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Es una técnica de medida superficial basada en la interacción de una punta con la superficie de una muestra. Esta técnica permite analizar la superficie de una muestra a escala nanométrica [$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$], generando imágenes de alta resolución y proporcionando datos sobre características mecánicas a nanoescala (Liang et al., 2020). Como principal ventaja, la microscopía de fuerza atómica (AFM) ofrece la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra, sin aplicación de tintes como en la microscopía de luz (LM), sin fluorescencia como en la microscopía de escaneo láser focal (CLSM) y sin necesidad de aplicar un vacío,

someter las muestras a liofilización por punto crítico o metalizar sus superficies como en la microscopía electrónica (SEM/TEM) (Yang et al., 2007).

En general, el AFM consta de las siguientes partes: un fleje voladizo o cantiléver con una punta de radio nanométrico en su extremo, normalmente de silicio o nitruro de silicio, que se encuentra acoplado a un material piezoeléctrico; un diodo láser; y un fotodiodo sensible a la posición (PSPD) (Chang et al., 2012).

La obtención de imágenes de alta resolución se genera por medio de las fuerzas de interacción producidas entre la superficie del material a estudiar y la punta que se encuentra sujeta al cantiléver. Mediante éstas, el AFM detecta la altura de cada parte de la superficie de la muestra y elabora un mapa topográfico (Casado et al., 2018). Si la punta se acerca a la superficie, por encima de cierto umbral, por lo general, las fuerzas atractivas entre la superficie y la punta (fuerzas de Van der Waals originadas a partir de interacciones dipolo – dipolo) dominan la interacción y hacen que el voladizo se flexione. Sin embargo, a medida que el voladizo se acerca aún más a la superficie, el voladizo se flexiona con el ángulo opuesto, debido a que la punta entra en contacto con la superficie, aumentando las fuerzas de repulsión de corto alcance por la repulsión de Pauli, que impide la superposición entre los orbitales de la punta y de la muestra. (Park Systems, 2022).

Para detectar estas desviaciones se utiliza un diodo láser que emite luz roja y llega como un haz incidente en la parte superior plana del voladizo, con lo cual los movimientos del cantiléver provocarán ligeros cambios en la dirección del haz reflejado. Estos cambios son rastreados por el PSPD, el cual monitorea estas diferencias de altura y mediante el uso de un bucle de retroalimentación se controla que la altura de la punta se recupere luego de cada movimiento. El cambio de altura en el material piezoeléctrico permite que se recupere la deflexión inicial del cantiléver, y este cambio es lo que se toma como la altura de la muestra escaneada. En síntesis, el AFM crea imágenes topográficas de la superficie rastreando la superficie y registrando las diferencias de altura encontradas (Chang et al., 2012). Sus principales modos de operación son: contacto, no contacto intermitente y contacto intermitente (*tapping*) (Joshi et al., 2022).

1.1.6.2. Modo de operación contacto intermitente (*tapping*)

El funcionamiento del AFM en modo contacto intermitente (*tapping*) genera imágenes de la topografía de la muestra al escanear la superficie con el cantiléver oscilando. La punta hace contacto intermitente con la superficie de la muestra durante la medición, por lo que, en este modo de medida se utiliza una amplitud de oscilación del cantiléver ligeramente inferior a la de resonancia libre para detectar cambios en las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie de la muestra. Esta amplitud se utiliza como retroalimentación para rastrear la superficie y detectar las variaciones en la topografía a nanoescala. Cuando el voladizo se acerca a la superficie de la muestra, la amplitud de resonancia cambia a amplitudes más bajas o altas dentro de un ciclo de oscilación a medida que la interacción pasa del régimen de fuerza de repulsión al de atracción, respectivamente. **(Park Systems, 2022).**

Por otro lado, también puede medirse el desfase entre la activación y la señal detectada, el cual revela información acerca de la difusión energética sobre el material en el impacto, lo que está relacionado con las propiedades mecánicas específicas del material. Asimismo, puede determinarse la adhesión entre punta y muestra, pues ésta también provoca un contraste en esta difusión energética **(Pico et al., 2022).**

1.1.6.3. Modo de operación no contacto intermitente

Este modo es una técnica de AFM en la que el mecanismo de operación es similar al de contacto intermitente (*tapping*), con la diferencia de que el cantiléver oscila a una amplitud menor. Es así que, éste opera muy cerca de la superficie de la muestra y, por lo tanto, mide la topografía de la muestra con unas fuerzas muy inferiores, que hasta podrían corresponder exclusivamente a las fuerzas de atracción de Van der Waals **(Park Systems, 2022).**

1.1.6.4. Potencial del AFM en el estudio de muestras biológicas

La AFM ha encontrado una amplia gama de bioaplicaciones en las últimas décadas debido a su capacidad para medir muestras biológicas en entornos naturales con una alta resolución espacial. Se ha convertido en una técnica clave en los campos de investigación biotecnológica, involucrándose en áreas como la biomedicina, la bioingeniería, la microbiología y la ciencia de los alimentos ya que permite la

caracterización mecánica y morfológica de sistemas biológicos y sus derivados (**Liang et al., 2020**). Efectivamente, con la generación de imágenes topográficas a nanoescala es posible descubrir modelos utilizados por diversas formas de vida para su supervivencia e imitarlos artificialmente aplicando la biomimética. Por ejemplo, en **Pico, (2022)** y **Chauca, (2022)**, fueron caracterizadas estructuras nanoscópicas de insectos, describiendo características topográficas superficiales, información que puede ser aplicada en el futuro en el desarrollo de nuevas tecnologías.

Esta técnica ha sido aplicada en numerosos estudios, por ejemplo, en el artículo de revisión de **Joshi et al., (2022)** se mencionan algunos estudios en donde se ha utilizado la AFM para caracterizar polímeros e hidrogeles para la ingeniería de tejidos y otras aplicaciones biotecnológicas, con el fin de determinar la influencia de las propiedades elásticas en la adhesión y crecimiento de las células. Además, el estudio de macromoléculas no se ha quedado atrás. Tal es el caso del almidón, que ha sido caracterizado mediante esta técnica, y ha proporcionado información relevante acerca de la nanoestructura de su superficie y de sus propiedades mecánicas (**Chichti et al., 2013**), (**Kwaśniewska et al., 2021**). También, existen estudios que utilizan diversos modos de medida del AFM para caracterizar películas de almidón, con los cuales se obtuvieron datos que les permitió determinar el nivel de interacción entre los componentes de las láminas y la factibilidad de su aplicación a diferentes áreas (**Salazar et al., 2021**), (**Cheng et al., 2022**).

1.1.7. Caracterización macroscópica

1.1.7.1. Espectrofotometría de infrarrojo de TF

La espectroscopía infrarroja es una técnica instrumental basada en la absorción de radiación infrarroja (IR) debido a la vibración de sus constituyentes, lo que permite conocer los grupos funcionales que conforman la estructura de una muestra. La absorción de luz infrarroja permite la excitación de los componentes a una frecuencia de radiación electromagnética específica, al producir un cambio en la energía de su vibración. Esta frecuencia depende de la masa de sus átomos, de las fuerzas de los enlaces y de la geometría de las moléculas. Este espectro vibracional es considerado una propiedad física única y característica de cada molécula, por lo que sirve como huella dactilar en la identificación de muestras desconocidas (**Dahan & Alosfur, 2021**). Las frecuencias de radiación IR que son absorbidas se registran en un

interferograma, el cual grafica el número de onda (cm^{-1}) vs. transmitancia (T). La transformada de Fourier sirve como método matemático para el diseño del interferograma, y está constituida por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación. La TF simplifica este proceso y genera resultados exactos de frecuencias elementales contenidas en el interferograma (**Senapathi Venkatramanan, 2022**). De esta manera, se puede determinar a qué grupo funcional corresponde cada pico, apoyándose en tablas, las cuales tienen información acerca de la relación entre los grupos funcionales y los intervalos de frecuencia donde se ha comprobado experimentalmente que aparecen.

1.1.7.2. Espectrofotometría de UV/VIS

La espectrofotometría de UV/VIS es una técnica que utiliza radiación electromagnética en las regiones visible (VIS) y ultravioleta cercano (UV) para evaluar qué cantidad de la misma es absorbida y/o transmitida a cada longitud de onda. Con esto se permite cuantificar las transiciones electrónicas provocadas por la absorción de radiación comprendida en este rango de longitudes de onda. Se coloca una muestra entre una luz fuente y un fotodetector, y la intensidad de luz UV/VIS es medida antes y después de pasar por la muestra. Esta técnica permite medir la opacidad de la muestra a una o varias longitudes de onda, que es la condición de un material que impide parcial o totalmente el paso del haz de luz (**Brar Satinder Kaur, 2015**).

1.1.7.3. Contenido de humedad

Se define como humedad a la cantidad de agua libre que posee un material. Su cuantificación es importante en el desarrollo de películas de almidón, puesto que el contenido de humedad de la lámina está relacionado directamente con procesos de degradabilidad y contaminación microbiana (**Tarique et al., 2021**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Caracterizar la nanoestructura superficial de películas de almidón extraído de tubérculos andinos.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Optimizar la disposición de muestras de películas de almidón de diferentes tubérculos andinos sobre el disco de medida del AFM.
- Medir la topografía nanoscópica de las películas de almidón con el AFM, en modo no contacto intermitente.
- Medir las propiedades macroscópicas de las películas por medio de espectrofotometría de infrarrojo de TF, espectrofotometría UV/VIS y análisis de humedad.
- Correlacionar las medidas obtenidas de las películas de almidón de los distintos tubérculos nanoscópica y macroscópicamente.

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

Tabla 1. *Materiales de laboratorio*

Material	Cantidad
Puntas de AFM modo <i>tapping</i>	4
Portaobjetos metálicos de AFM	4
Pinzas	1
Placas Petri	20
Celdas de cuarzo	4
Portaobjetos	4
Vasos de precipitación	4

2.1.2. Equipos de laboratorio

Tabla 2. *Equipos de laboratorio*

Equipo	Cantidad
Microscopio de Fuerza Atómica Park Systems	1
Computadora del AFM	2
Microscopio Óptico EVOS XL	1
Balanza de humedad Mettler Toledo	1
Espectrofotómetro UV/VIS Thermo Scientific	1
Balanza analítica Mettler Toledo	1
Agitador de laboratorio	1
Incubadora	1
Espectrofotómetro de infrarrojo de TF Perkin Elmer	1

2.1.3. Insumos de laboratorio

Tabla 3. *Insumos de laboratorio*

Insumo	Cantidad
Cinta adhesiva doble faz	1
Cinta adhesiva	1
Guantes asépticos	12
Fundas ziploc	1
Tijeras	1

2.1.4. Materiales de escritorio

Tabla 4. *Materiales de escritorio*

Material	Cantidad
Laptop	1
Cámara convencional 12 Mpx	1
Cuaderno	1
Estilete	1
Esferos	1 caja
USB	1
Rotulador	1

2.1.5. Aplicaciones para análisis de datos

Tabla 5. *Aplicaciones para análisis de datos*

Software	Cantidad
Software para la obtención de datos por AFM Smart Scan	1
Software para el procesamiento de datos de AFM XEI	1
ImageJ	1
Excel	1

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de muestras

Se elaboraron láminas de almidón de melloco (*Ullucus tuberosus C.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum R y P.*), oca (*Oxalis tuberosa Mol.*) y papa o patata (*Solanum tuberosum L.*) siguiendo el protocolo establecido en el trabajo de titulación con resolución número FCIAB-1512-CD-P-2021.

Se empleó el método de lixiviación para extraer el almidón de los tubérculos andinos seleccionados, los cuales fueron secados a 45°C por 4 horas para obtener una consistencia granular, tipo harina. Posteriormente, se pesaron 5 g de almidón de cada tubérculo, se añadió 20mL de agua destilada y se homogenizó la mezcla para disolver el almidón. A continuación, se añadieron 3 mL de glicerol y se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada. La preparación fue calentada a 220°C por 15 min. Finalmente, se distribuyó el contenido en placas Petri, hasta alcanzar de 1 mm a 2 mm de altura. Las placas Petri fueron llevadas a incubación a 45°C por 24 horas.

2.2.2. Caracterización nanoscópica

2.2.2.1. Deposición de las muestras en el AFM

Se extrajo una muestra de 1 cm² de dimensión y se posicionó sobre la placa metálica de 2 cm de diámetro propia para mediciones del AFM. Se probó con tres métodos de fijación de la muestra a fin de utilizar aquélla que mantenga la superficie lo más plana posible, evitando la generación de desplazamientos nanoscópicos ocasionados por dilataciones térmicas o artefactos de medida.

Los métodos que se exploraron fueron: posicionamiento de la muestra sobre el disco sin materiales adicionales que la sujeten al mismo, fijación de la muestra con cinta adhesiva por los bordes y fijación de la muestra utilizando cinta adhesiva de doble faz sobre el disco metálico.

2.2.2.2. Medición por Microscopía de fuerza atómica

La muestra ya preparada se posicionó dentro del rango del microscopio óptico acoplado al microscopio de fuerza atómica, luego se ajustó el objetivo óptico focalizándolo sobre la muestra y, finalmente, se cerró el sistema de aislamiento acústico para evitar perturbaciones externas.

Se configuraron los parámetros de medida en modo no contacto intermitente, sin embargo, se observó que se obtenían mejores resoluciones en modo contacto intermitente (*tapping*). Se generaron imágenes de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ con una resolución de imagen de 512×512 píxeles², a una velocidad de escaneo de 0.5 a 1 Hz y se seleccionaron los canales de medida durante el escaneo de *Topografía*, *Error Signal*, *Phase* y *Amplitude*. por medio del software SmartScan de Park Systems para cada película de almidón.

2.2.2.3. Procesamiento de las imágenes de AFM

Los resultados fueron procesados con el Sistema XEI, el cual proporcionó la topografía nanoscópica de las muestras por medio de imágenes tridimensionales a partir de las medidas obtenidas, además de datos provenientes de los análisis en contraste de fase (*Phase*).

2.2.3. Caracterización macroscópica

2.2.3.1. Espectrofotometría de infrarrojo de TF

Se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FT-IR) y se empleó la metodología descrita por (Tarique et al., 2021). Primero, se realizó la medida del interferograma de referencia o blanco y, posteriormente, se colocó la lámina de almidón directamente sobre la celda de reflectancia total atenuada (ATR). Se corrió en análisis en un rango de números de onda entre 4000 y 600 cm^{-1} con una precisión de 4 cm^{-1} y se registraron los espectros de absorción óptica de la lámina de almidón. Se repitió el procedimiento por triplicado con cada película de almidón (melloco, mashua, oca y papa).

2.2.3.2. Espectrofotometría UV/VIS

Para evaluar la opacidad de las láminas de almidón se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS. Siguiendo el método descrito por (Arancibia et al., 2015), se colocó una muestra de película de almidón directamente en la cara delantera de una celda de cuarzo y se analizó a longitudes de onda entre 280nm y 660 nm . Posteriormente, se registró la absorbancia a 560 nm y se calculó la opacidad utilizando el espesor de la

película (x, mm) por medio de la ecuación (1). Se realizó el análisis por triplicado con cada lámina de almidón (mel loco, mashua, oca y papa).

$$O = \frac{Abs_{560}}{x} \quad (1)$$

2.2.3.3. Análisis de humedad

El contenido de humedad de las películas de almidón fue determinado utilizando una balanza de humedad. Se colocó una muestra de cada lámina de mel loco, mashua, oca y papa en el plato de la balanza y se determinó la pérdida de peso a medida que la misma disipaba vapor de agua por calentamiento con radiación infrarroja.

A la vista de los resultados obtenidos se complementó el presente estudio con los análisis de microscopía óptica, solubilidad y elasticidad.

2.2.3.4. Caracterización por microscopía óptica

Para plasmar en el presente trabajo los resultados obtenidos en la preparación de las películas de almidón, se capturó la apariencia visual usando una cámara convencional de 12 Mpx, reflejando luz blanca difusa en las películas colocadas sobre un fondo blanco con letras y figuras negras.

Las micrografías ópticas se obtuvieron en modo de reflexión, empleando un microscopio EVOS XL con un lente objetivo de 40X, 0.65 de apertura numérica y utilizando iluminación blanca transmitida (**Pico et al., 2022**). Se fijaron cuidadosamente las muestras de cada película de almidón extraído de tubérculos andinos a un portaobjetos y se colocaron sobre la platina boca abajo para ser observadas según los parámetros establecidos.

2.2.3.5. Materia Total Soluble (MTS)

Para determinar la materia soluble total (MTS) se pesaron piezas cuadradas de 5mm de lado de cada película de tubérculo andino estudiada (W_I), posteriormente las muestras se sumergieron en 30mL de agua milliQ y se dejaron en agitación suave y constante durante 24 horas. Después, se recuperaron las muestras de películas de almidón no disueltas por medio de filtración y se secaron a 105°C durante 24h.

Finalmente, los residuos se pesaron nuevamente (W_2). Los valores de MTS se obtuvieron por triplicado empleando la ecuación (2):

$$MTS = \frac{W_1 - W_2}{W_1} * 100 (\%) \quad (2)$$

2.2.3.6. Propiedades elásticas

Las propiedades mecánicas de las películas, como la resistencia a la tracción (TS), el alargamiento a la rotura (EB) y el módulo elástico (EM), se midieron en condiciones ambientales utilizando el método estándar ASTM D 882–88 (Instron Universal Testing). Las películas se cortaron en tiras rectangulares de 3 cm x 10 cm y se preconditionaron al 50 % de HR a temperatura ambiente durante 48 h (**Pico et al., 2022**). La velocidad se fijó en 12,5 mm/min y se promediaron juntas al menos 5 réplicas de cada muestra.

2.2.3. Comparación entre el análisis nanoscópico y macroscópico

Los datos obtenidos fueron relacionados en base a comparaciones múltiples entre los resultados, tanto cualitativos como cuantitativos, de los análisis macroscópicos, nanoscópicos y complementarios. El análisis se enfocó principalmente en las diferencias halladas en topografía y fase.

CAPITULO III

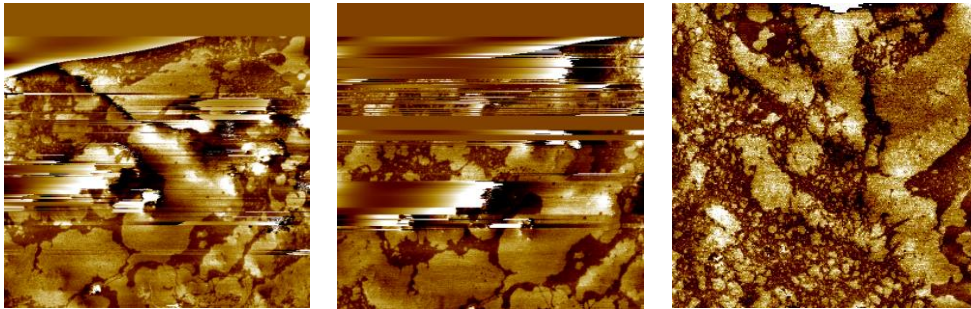
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Caracterización nanoscópica

3.1.1.1. Fijación de la muestra

Para determinar el método de fijación más adecuado se escaneó una muestra de lámina de almidón aplicando cada método propuesto. Como se observa en la Figura 5 (A) y Figura 5 (B), los primeros dos métodos propuestos no dieron resultados útiles, pues al escanear las imágenes se generaban movimientos nanoscópicos provocados por el desplazamiento de la muestra, impidiendo una buena caracterización superficial. Por otro lado, el tercer método aplicado Figura 5 (C), mantuvo la superficie de la muestra fija, de modo que no se generaron movimientos adicionales y el equipo consiguió medir la muestra completamente. Posteriormente, se aplicó este método para preparar las muestras de las películas de los cuatro tubérculos andinos.



(A)

(B)

(C)

Figura 5. *Imágenes de fase obtenidas con el AFM empleando diferentes métodos de fijación. (A) Ubicación de la muestra sobre el disco sin materiales adicionales que la sujeten al mismo. (B) Fijación de la muestra con cinta adhesiva por los bordes. (C) Fijación de la muestra utilizando cinta adhesiva de doble faz sobre el disco metálico.*

3.1.1.2. Topografía

El escaneo de las muestras empleando microscopía de fuerza atómica en modo *tapping* minimiza el impacto de las fuerzas laterales aplicadas por el cantiléver durante la medición, evitando artefactos. Además, el no aplicar ningún recubrimiento para el análisis representa una gran ventaja, ya que se obtienen datos útiles para una potencial

aplicación biotecnológica (Liang et al., 2020). Mediante el empleo de esta técnica se detectaron irregularidades laterales superficiales a escala nanométrica y contrastes de altura vertical subnanométricos. En la Figura 6 se muestra una comparación entre las sinuosidades superficiales en diferentes zonas de biopelículas extraídas de cada tubérculo andino analizado. Se ha intentado medir en modo no contacto intermitente, pero se comprobó que se obtenían mejores resultados en modo contacto intermitente.

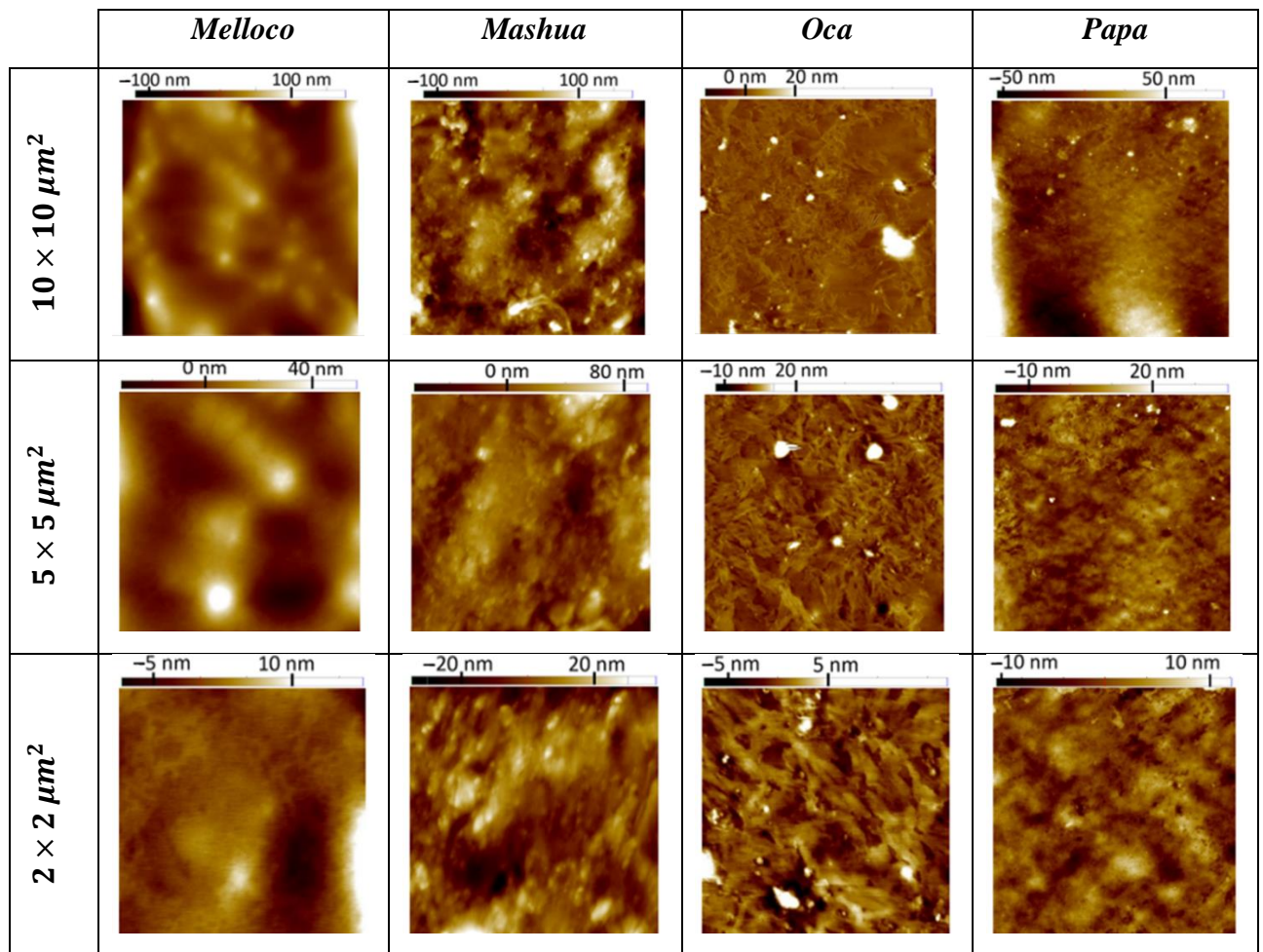


Figura 6. Imágenes topográficas bidimensionales de microscopía de fuerza atómica medidas utilizando el modo tapping en la superficie de películas de almidón de cada tubérculo andino escaneado en diferentes rangos de área.

Cada columna de la Figura 6 corresponde a una misma zona de medida de cada biofilm escaneada en diferentes dimensiones. Haciendo un énfasis en las imágenes de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$, se observa que la película de almidón extraída del melloco revela una topografía granular, pero lisa, en contraste con las películas de almidón extraído de mashua y oca donde se observa una superficie de aspecto fibroso. Por otro lado, la

película de almidón de papa expone una superficie más compacta a nanoescala, pues se observa una estructura más homogénea y con una capacidad más reducida para adherir moléculas de agua a su superficie, lo que concuerda con el análisis de solubilidad (Pico et al., 2022).

Además, la caracterización de muestras por AFM permite obtener imágenes de la morfología de la superficie de la muestra en una representación tridimensional, como se muestra en la Figura 7. Adicionalmente, en la Figura A1 se observa la topografía en un sistema de ejes tridimensional de los biofilms de almidón correspondiente a un área mayor $10\mu\text{m}^2$.

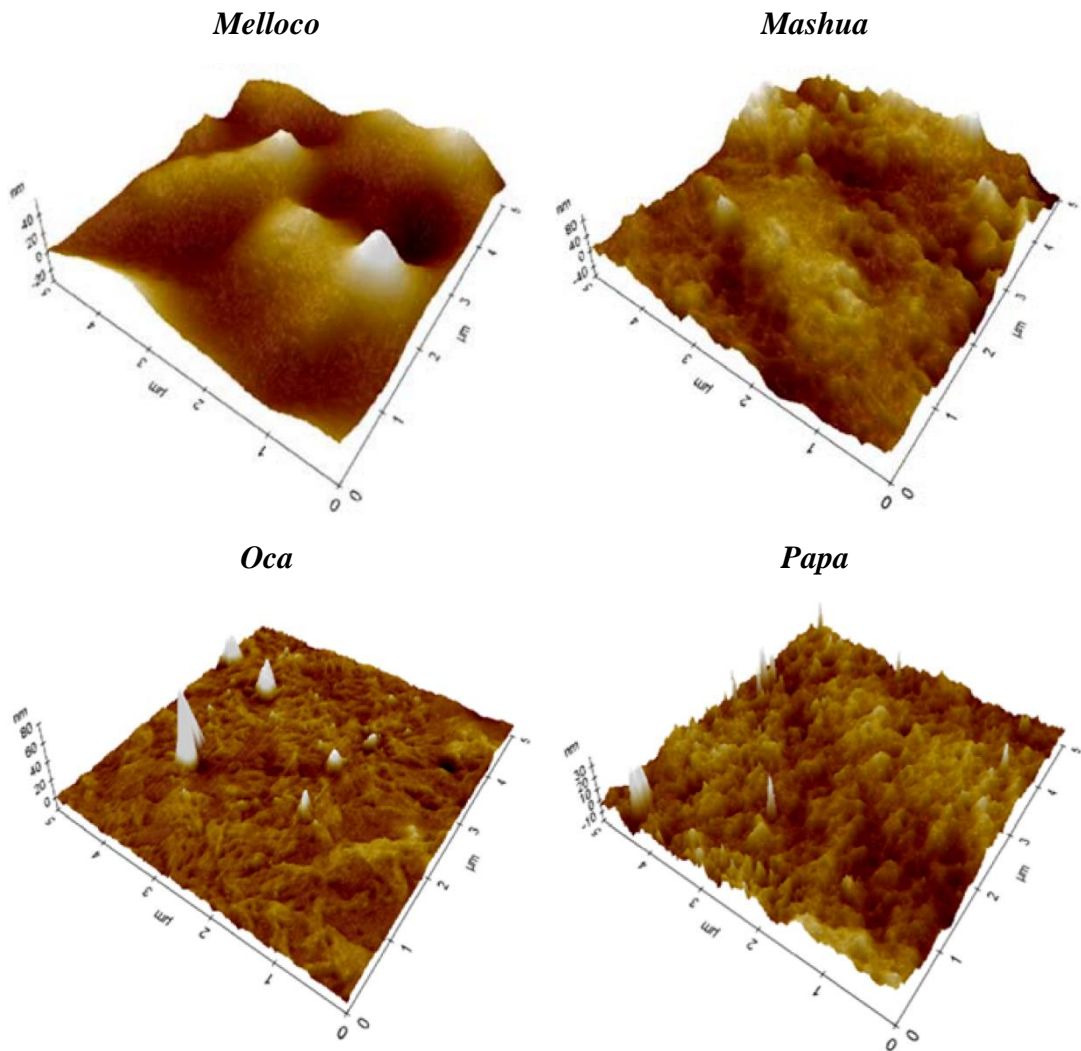


Figura 7. Comparación de la topografía tridimensional entre imágenes de $5\mu\text{m}^2$ de área de películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.

En las imágenes en vista tridimensional (Figura 7), la coloración de la superficie se da en una escala de colores claros a oscuros, en donde las zonas más altas son blanquecinas y, a medida que el cantiléver desciende a zonas más bajas las coloraciones se tornan más oscuras, acercándose a tonos marrones- negros (Xu & Siedlecki, 2017). La topografía 3D de las láminas muestra numerosas alturas y depresiones en la superficie de las películas de almidón de melloco y mashua, donde se observan zonas cóncavas que alcanzan una altura máxima de 40nm y 80nm, respectivamente. Por otro lado, las películas de almidón de oca y papa presentan superficies más llanas, con alturas que alcanzan los 20 nm. En conjunto, los contrastes de alturas verticales de las películas de almidón extraído de los cuatro tubérculos andinos son similares a los reportados por otros autores, quienes al caracterizar la superficie nanoscópica de sus biofilms han encontrado irregularidades semejantes (Salazar et al., 2021) (Cheng et al., 2022).

3.1.1.3. Contraste de fase

Al emplear el modo *tapping* se puede registrar el contraste de fase, el cual se relaciona con la disipación de energía que ocurre en la generación de cada píxel de la imagen. Estos datos proporcionan información acerca de las propiedades de adhesión de la punta con la muestra a nanoescala (Magonov et al., 1997). Los contrastes de fase a nanoescala entre las películas de almidón analizadas evidencian diferencias estructurales, como se observa en la Figura 8.

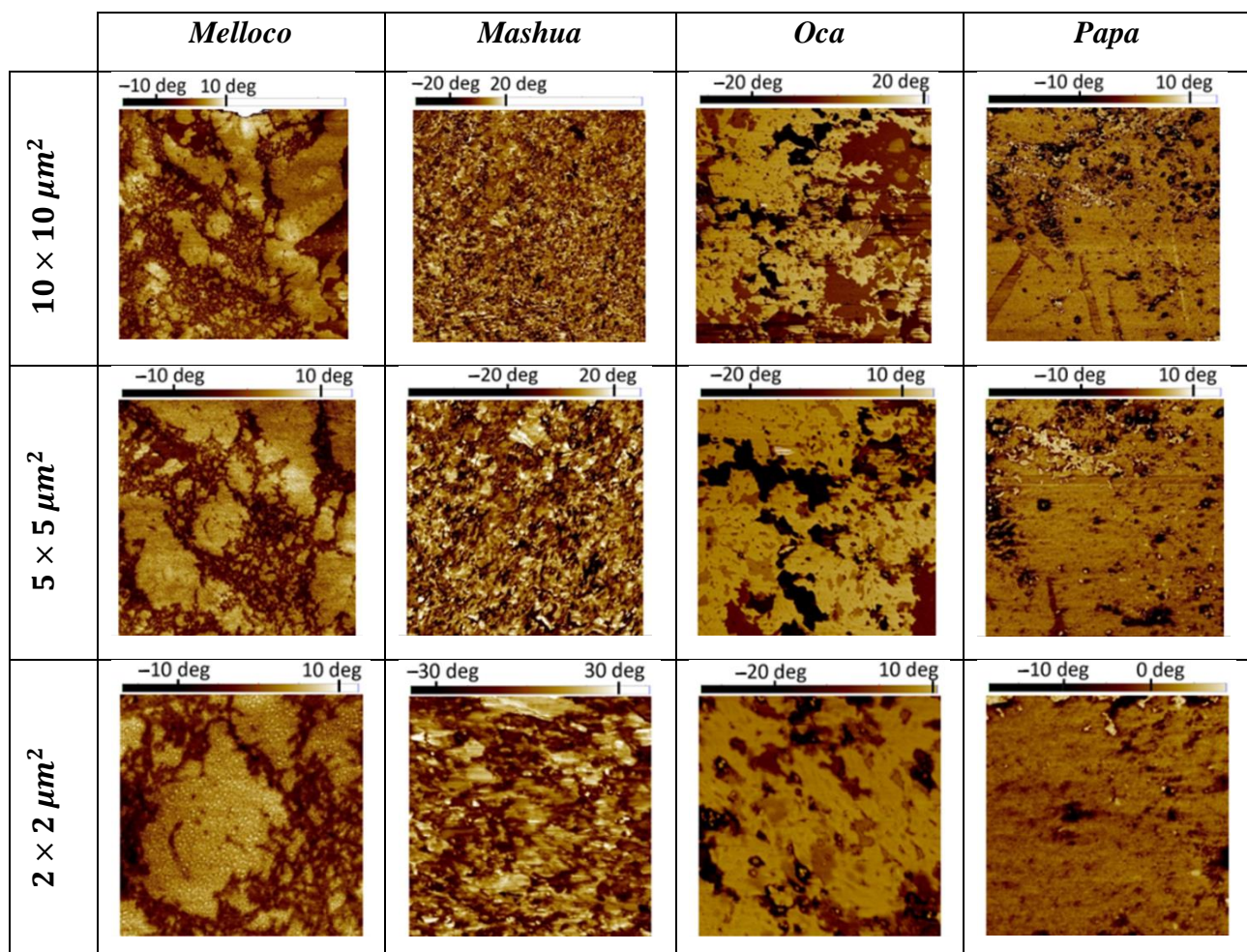


Figura 8. Imágenes de contraste de fase en modo tapping medidas en películas de almidón extraído de cada tubérculo andino en diferentes zonas.

El contraste de fase entre las imágenes obtenidas de las películas de almidón es visiblemente notorio, la cuantificación de zonas a una mayor intensidad de color sobre un determinado umbral permite identificar posibles zonas de mayor afinidad de la superficie a otras sustancias y/o mayor polaridad. En la tabla 6, se describe el número de regiones y su nivel de representación por área total de las imágenes de biofilms de almidón extraído de los tubérculos andinos de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, obtenidos con el programa de procesamiento digital ImageJ.

Tabla 6. *Número de regiones y su porcentaje de presencia en el área total de las películas de almidón extraído de los diferentes tubérculos andinos analizados.*

	Melloco	Mashua	Oca	Papa
Número de regiones	195	181	91	253
% del área total	49,950	49,557	50,624	2,383

Los valores se obtuvieron empleando el método de valor umbral Otsu, y un valor de umbral seleccionado de 132.

Adicionalmente, ImageJ proporciona imágenes que permiten reconocer las zonas de interés segregadas del resto con su respectiva identificación numérica. Tanto la diferencia en el tamaño de las regiones como la cantidad de las mismas se observan en la Figura 9.

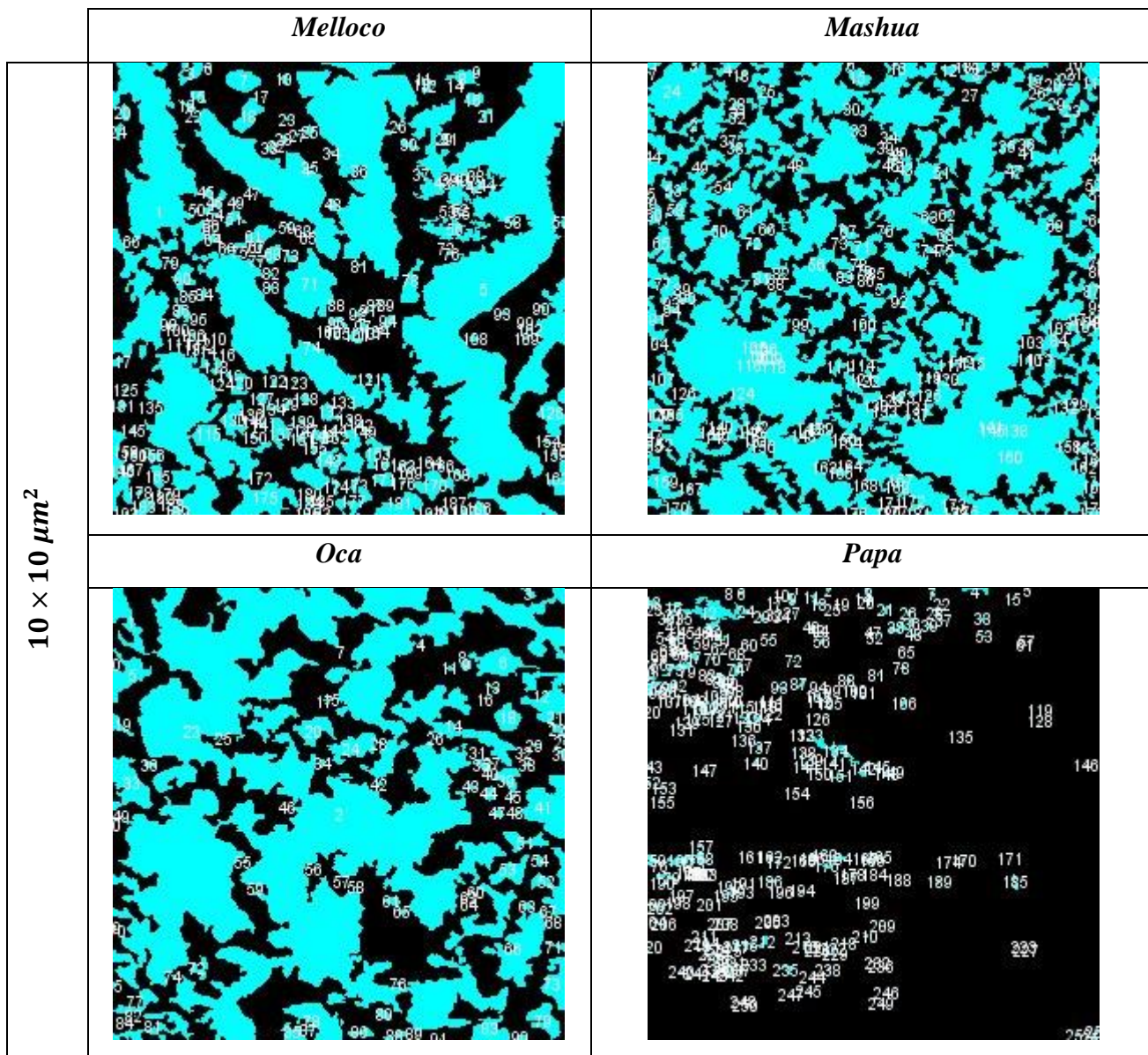


Figura 9. Reconocimiento e identificación de zonas ubicadas sobre un determinado umbral de las películas de almidón extraído de los tubérculos andinos analizados.

La heterogeneidad en el contraste de fase observada puede atribuirse a un cambio de la polaridad en la superficie. Las zonas con una coloración más clara parecen demostrar una polaridad diferente a la del resto, lo que talvez podría indicar una mayor afinidad de la superficie a las moléculas de agua, y, por lo tanto, se presenta una capacidad de asociación mayor; además, esto genera un agarre adicional de la muestra a la punta por parte del menisco emergente (Pico et al., 2022). De manera visual, esta característica es visible mayoritariamente en las películas elaboradas con almidón de melloco y oca, donde se observan zonas con alto contraste de fase. Estas observaciones

son corroboradas por los resultados de la tabla 6 y la figura 9, en las cuales el porcentaje de éstas en las películas de almidón mencionadas representa el 49,950% y 50,624% del área total, respectivamente, siendo los valores más altos en comparación con los obtenidos en el resto de biofilms. Sin embargo, el número de zonas cuantificadas en ambas muestras es significativamente diferente, el biofilm de almidón de melloco posee 191 zonas sobre el umbral establecido mientras que la oca solo 91. En el caso de las películas de almidón obtenido de mashua se observan diminutas zonas distribuidas por toda la superficie, su número de regiones sobre el umbral establecido es 181 y el porcentaje de estas zonas en el área total es del 49,557%, valores ligeramente menores a los de las películas de almidón de melloco y oca. La lámina de almidón extraído de papa posee una coloración oscura y uniforme, lo que podría sugerir que, en comparación con los demás biofilms, su polaridad podría ser homogénea. Por otro lado, en la figura 9 se observa que esta película presenta un gran número de regiones cuantificadas sobre el umbral predeterminado, pero, tal y como se observa en las imágenes de fase (figura 8) y, en la tabla 6, estas regiones solamente representan el 2,383% del área total. Esto indica que el número de zonas cuantificadas no se relaciona con la proporción de las mismas en el área total, puesto que existen grandes regiones con mayor representación que otras.

Desde el punto de vista estructural, las diferentes disipaciones energéticas generadas en la medición son identificadas por diferentes tonos de coloración en las respectivas zonas de medida, permitiendo determinar la homogeneidad y posible distribución de los componentes en su superficie (Xing et al., 2020). Para este fin, es conveniente realizar un análisis cualitativo empleando las imágenes de contraste de fase de $10 \mu m \times 10 \mu m$ ya que corresponden a una mayor dimensión de medida (véase figura 9). Las imágenes de las películas de almidón extraído de papa son las que más homogeneidad exhiben, lo que sugiere que hubo una mejor plastificación o adhesión de los componentes entre sí al formar las películas de almidón, creando una superficie más compacta. En las películas de almidón extraído de mashua también se observa homogeneidad en su superficie, con la peculiaridad de que ésta presenta pequeñas zonas con mayor disipación de energía distribuidas por toda la superficie a modo de marmoleado, con esto se puede deducir que los componentes de éste se encuentran bien distribuidos y adheridos entre sí. Las películas de almidón obtenidas de melloco

y oca revelan una superficie bastante heterogénea, lo que sugiere que sus componentes no se encuentran distribuidos en igual proporción.

3.1.2. Caracterización macroscópica

3.1.2.1. Caracterización por microscopía óptica

Visualmente, se detectan ligeras diferencias en la apariencia, textura y transparencia de los biofilms elaborados a partir de almidón de melloco, mashua, oca y papa, incluso en observaciones macroscópicas, como se observa en la figura 10.

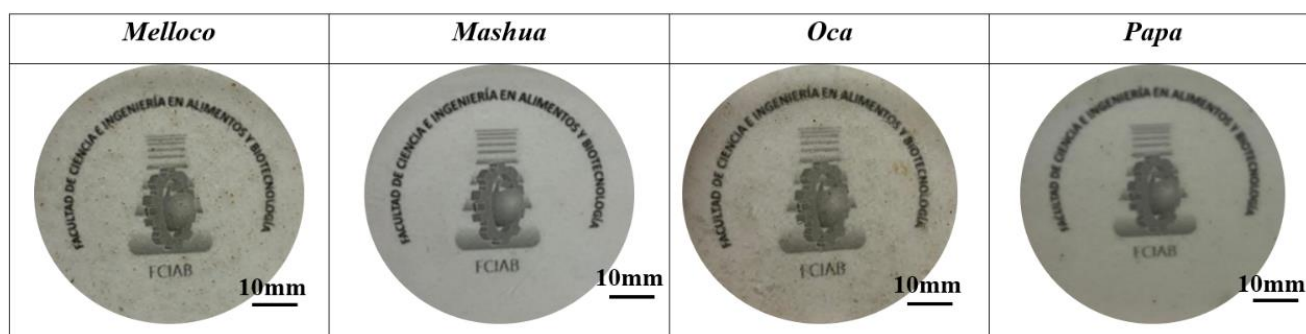


Figura 10. Aspecto visual aparente de las películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.

Como puede verse, los biofilms elaborados con almidón de mashua y papa tienen menos partículas en su interfaz y se muestran más transparentes, en contraste con las películas elaboradas con almidón de melloco y oca, en las cuales se observan residuos en su estructura y reflejan un tono un poco más opaco.

A escala microscópica, es posible distinguir más diferencias entre las películas de almidón de tubérculos andinos, como se muestra en la figura 11. Puesto que la luz atraviesa completamente el espesor de la películas, las diferencias entre estas pueden indicar la presencia de regiones internas diferentes en estructura y composición.

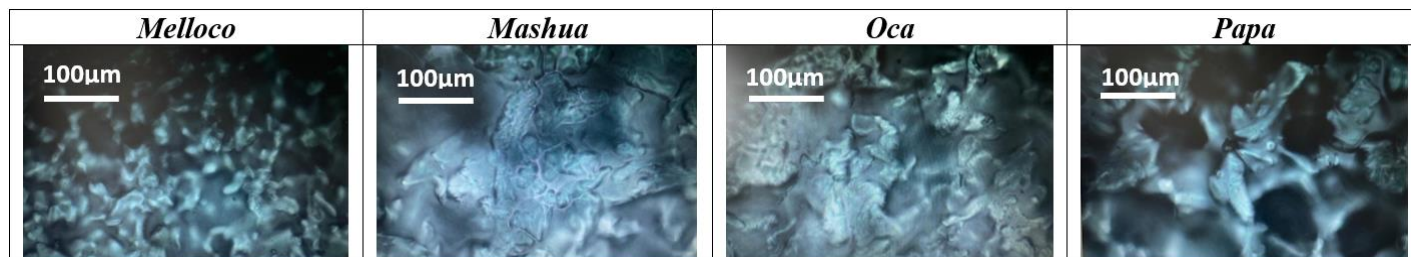


Figura 11. Micrografías de películas de almidón extraídas de cada tubérculo andino analizadas en reflexión usando iluminación de transmisión de luz blanca.

3.1.2.2. Absorción infrarroja por Transformada de Fourier

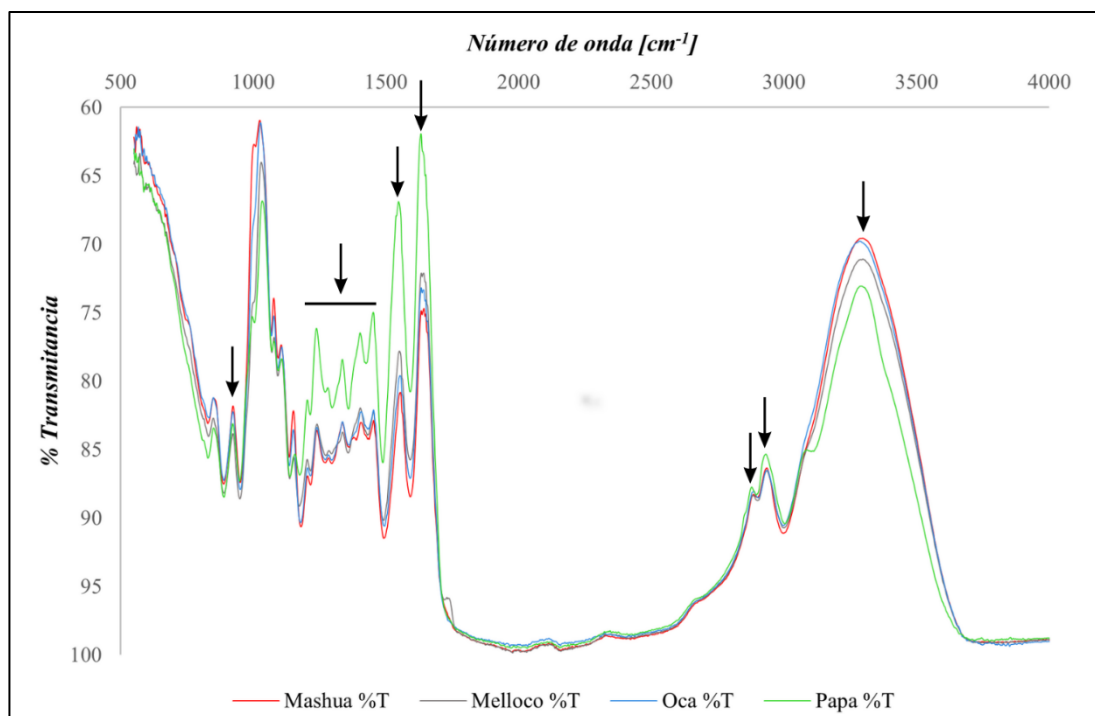


Figura 12. Espectros de absorción infrarroja por transformada de Fourier medidos en las películas formuladas con almidón de los tubérculos andinos estudiados. Las flechas resaltan los picos representativos.

El análisis estructural realizado por espectrofotometría de absorción infrarroja de TF exhibe una estructura similar entre todas las películas analizadas. Todas las películas de almidón de tubérculos andinos presentan una banda ancha cerca de 3350 cm^{-1} que corresponde a la vibración de expansión de los grupos hidroxilo libres, los cuales están asociados a los componentes químicos de almidón y glicerol (Tongdeesoontorn et al., 2021). Las bandas ubicadas en 2933 cm^{-1} y 2883 cm^{-1} pueden estar relacionadas con las vibraciones y estiramientos del grupo CH producidas en el almidón (Pereira et al., 2022). El gráfico también presenta picos cercanos y continuos entre 1500 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} que están asociados con la flexión angular de OH de las moléculas de agua, lo que confirma la presencia de agua en las matrices de las películas, indicando que los enlaces de hidrógeno intermoleculares pueden mostrar no solo las interacciones poliméricas esperadas sino también la hidratación de moléculas de almidón y glicerol (Wu et al., 2017)(Franciele M. Pelissari et al., 2009). Las bandas entre 1200 cm^{-1} y 900 cm^{-1} de todos los espectros se atribuyen al estiramiento de los enlaces C-C, C-O y C-O-H del anillo de anhidroglucosa que se encuentra comúnmente en la estructura de

los carbohidratos (Athira et al., 2018). La banda cercana a 920 cm^{-1} está asociada con enlaces glucosídicos en el almidón y la presencia de enlaces α -amilopeptina (Silveira et al., 2020)(Bodini et al., 2020).

3.1.2.3. Opacidad

La opacidad es la propiedad opuesta a la transparencia. Las películas de almidón deben poseer la capacidad de obstáculo para algunas longitudes de onda de la luz. Las propiedades ópticas de las películas dependen de su microestructura, que se ve afectada por la superficie y heterogeneidad interna estructural (Cheng et al., 2022). La opacidad de las películas analizadas se registró en la tabla 7, las cuales fueron obtenidas a partir de las curvas de Longitud de onda Vs. Absorbancia de las Figuras A2, A3, A4 y A5. los valores de las películas de almidón de oca y papa son inferiores a los observados por otros autores (Santacruz et al., 2015). Por otro lado, la lámina de almidón de mashua presenta un valor intermedio dentro del rango de opacidad aceptable que se requiere para la aplicabilidad de una película, finalmente la opacidad de la película de almidón de melloco también presenta un valor intermedio y concuerda con los datos reportados por (Daza et al., 2021). Varios autores asocian la presencia de proteínas, lípidos, compuestos fenólicos y fibra con el aumento de la opacidad en las películas de almidón (Dos Santos et al., 2017).

Tabla 7. Opacidad medida en las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.

	Melloco	Mashua	Oca	Papa
Opacidad (AU/mm)	1,52±0,04	1,29±0,04	0,74±003	2,03±0,05

Los resultados son la media \pm la desviación estándar (SD).

3.1.2.4. Contenido de humedad

Muchas de las aplicaciones potenciales de las películas de almidón se relacionan con su contenido de agua y como interacciona con ésta. En la tabla 8 se muestra el contenido de humedad de las láminas analizadas.

Tabla 8. *Contenido de humedad de las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.*

	Melloco	Mashua	Oca	Papa
Contenido de humedad (%)	17,25±0,25	16,73±0,15	17,24±0,18	13,76±0,22

Los resultados son la media ± la desviación estándar (SD).

Las películas de almidón de melloco, oca y mashua reportan valores de humedad similares entre sí, mientras que, la papa reporta el contenido de humedad más bajo. En el caso de las tres primeras películas de los tubérculos mencionados, sus valores son superiores a los reportados por otros autores, quienes han elaborado películas de almidón proveniente de otras fuentes vegetales como amaranto (13,78%), banana (15,1%) y babasú (11,82%) (Nouraddini et al., 2018). Los valores de humedad de la película de almidón de papa concuerda con los resultados reportados por (Mroczkowska et al., 2021), quien menciona que el contenido de humedad de biofilms elaborados de papa oscilan entre 12 y 18%. Los aspectos que influyen en el contenido de humedad incluyen la hidrofobicidad y la concentración de plastificante. El agua actúa como plastificante junto con el glicerol, proporcionando elasticidad al material (Mroczkowska et al., 2021).

El glicerol también influye en el contenido de humedad de la película, ya que su naturaleza hidrófila puede intercalarse entre las cadenas de los polímeros (amilosa y amilopectina) interrumpiendo los enlaces de hidrógeno y separando las cadenas (Sohany et al., 2021). Sin embargo, para la formulación de las cuatro películas se agregó la misma cantidad de glicerol, por lo cual, no se considera a este, un factor que tenga influencia.

Los valores altos de humedad en las películas también pueden atribuirse a otros componentes presentes en la harina de cada tubérculo como proteínas, lípidos y fibra, que son de carácter hidrofílicos y pueden dar lugar a un mayor número de interacciones con las moléculas de agua, estos también inducen a la formación de una estructura más porosa, aportando a la retención de agua por capilaridad (Pelissari et al., 2013).

3.1.2.5. Materia total soluble (MTS)

El contraste entre los biofilms analizados persiste al enfocar su estudio en la interacción con el agua. El MTS de las películas podría estar relacionada con la

naturaleza hidrofílica de los componentes de estas. Aquéllas con mayor contenido de almidón cristalina son más susceptibles a la humedad y a la humedad relativa atmosférica (Pico et al., 2022). En la tabla 9, se describen los valores de humedad obtenidos de los distintos biofilms de almidón extraído de cada tubérculo andino.

Tabla 9. *Materia total soluble de las películas de almidón de cada tubérculo andino analizado.*

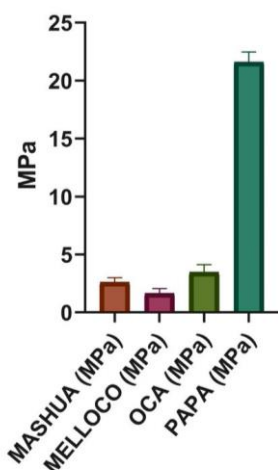
	Mellico	Mashua	Oca	Papa
Materia total soluble (MTS) (%)	84,45±0,12	63,12±0,10	63,71±0,11	24,43±0,13

Los resultados son la media ± la desviación estándar (SD).

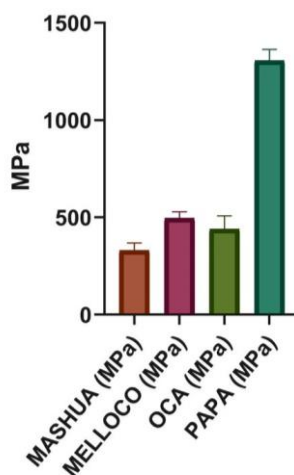
3.1.2.6. Propiedades elásticas

En la figura 13 se representan las propiedades mecánicas medidas en cada película analizada.

a) Resistencia a la tracción



b) Módulo de elasticidad (módulo de Young)



c) Alargamiento a la rotura

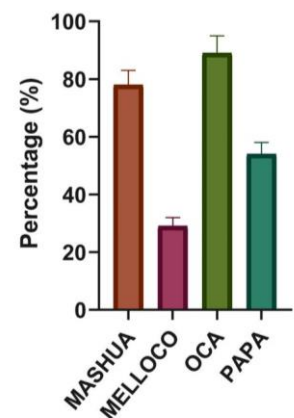


Figura 13. *Propiedades mecánicas obtenidas sobre las películas extraídas de cada tubérculo andino analizado. Los datos que se muestran son representativos de cinco experimentos independientes y representan la media ± SD. a) Resistencia a la tracción, b) módulo de elasticidad (módulo de Young) y c) alargamiento a la rotura.*

Las películas preparadas a partir de papa tienen los valores más altos de resistencia a la tracción (TS) y módulo elástico (EM) (21,6 y 1305 MPa, respectivamente), resultados que concuerdan con los publicados por (Velásquez et al., 2021). Los

valores registrados medidos en películas obtenidas de oca y papa son más altos que los reportados por (Torres et al., 2011), (Gao et al., 2014), (Otálora et al., 2021) y (Cruz-Tirado et al., 2017), lo que demuestra la dependencia de las mezclas de las fuentes de extracción y del proceso de producción. Sin embargo, las películas a base de almidón obtenidas de tubérculos de melloco presentan propiedades mecánicas similares a las reportadas (Cruz-Tirado et al., 2017). Los valores de elongación a la rotura (EB) de las películas de almidón no están en relación directa con TS y EM, ya que la medida más alta de EB corresponde a oca.

3.1.3. Relación entre los resultados nanoscópicos y macroscópicos

Las biopelículas a base de almidón presentan diferentes propiedades en todos los análisis nanoscópicos y macroscópicos, considerando que, se empleó la misma técnica para extraer el almidón de los diferentes tubérculos, y se aplicó el mismo protocolo para la elaboración de los biofilms de melloco, mashua, oca y papa, los contrastes en las propiedades macroscópicas y nanoscópicas se deberían, principalmente, a la fuente vegetal de extracción del almidón (Pico et al., 2022).

Se encontraron diferencias significativas a nanoescala, tanto en topografía como en contraste de fase, las cuales se correlacionan con los datos macroscópicos observados, lo que permite comprender las causas que originan los contrastes encontrados.

Los resultados obtenidos por microscopía óptica sugieren que la biopelícula de almidón de melloco presenta disgregación de sus componentes internos, mientras que, los biofilms de almidón de mashua y oca son aparentemente más homogéneos, estos resultados son explicados por las imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica donde se observa una topografía granular pero compacta en la película de almidón de melloco y un aspecto fibroso en los biofilms de almidón de mashua y oca, características que explicarían su aspecto a escala macroscópica. Por otro lado, las imágenes de microscopía óptica del biofilm elaborado con almidón de papa sugiere una separación de sus componentes internos. Cabe recalcar que las estructuras granulares y fibrosas solo se descubrieron después de la caracterización por AFM. Es posible que la homogeneidad de la superficie observada en contraste de fase (véase figura 8) contribuya a la elasticidad, razón por la cual el módulo de elasticidad de las películas de papa fue mayor, coincidiendo con la apariencia observada por microscopía óptica (Pico et al., 2022).

Los resultados obtenidos en los análisis de absorción infrarroja por Transformada de Fourier permitieron conocer los grupos funcionales que conforman la estructuras de cada muestra. De acuerdo con la figura 12, las conformación entre todas las biopelículas analizadas es bastante similar, donde algunos de los picos están asociados a componentes del almidón y el glicerol, es importante destacar las bandas ubicadas entre 1500 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} , las cuales se asocian a la flexión angular del OH de las moléculas de agua (Wu et al., 2017), confirmando la presencia de ésta en la matriz de cada biofilm. Estos resultados son validados por los obtenidos en los análisis de materia total soluble, humedad e imágenes de fase por AFM. El almidón es, por naturaleza de carácter hidrofílico, lo que explicaría su alta interacción con el agua (Souza et al., 2022), razón por la cual todos los biofilms son altamente solubles (tabla 9), a excepción de la biopelícula de almidón de papa la cual presenta el valor más bajo. Estas características macroscópicas también se observan a nivel nanoscópico, donde la imágenes de fase presentan porcentajes significativos de regiones con alta polaridad (tabla 6). Además, tal y como se observa en estos resultados, el porcentaje de solubilidad de los biofilms de melloco, mashua y oca son altos y concuerdan con los resultados de humedad y con las imágenes de regiones con alta polaridad obtenidas por procesamiento de imágenes de contraste de fase generadas por ImageJ (figura 9), mientras que, tanto en las imágenes de contraste de fase, como en los análisis de MTS y humedad del biofilm de almidón de papa coinciden los resultados de tipo cualitativo y cuantitativo con la detección de escasa representación de regiones polares.

3.2. Verificación de hipótesis

Según el análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto de investigación, es posible aceptar la hipótesis alternativa, puesto que, las propiedades observadas nivel nanoscópico, obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) de las películas de almidón de tubérculos andinos sí influyen sobre las características macroscópicas halladas.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La disposición de muestras de películas de almidón de diferentes tubérculos andinos fijados con cinta adhesiva doble faz a la superficie del disco metálico propio para medidas de AFM permitió que, durante el escaneo de las mismas no se generen movimientos nanoscópicos, lo que facilitó la generación de imágenes claras y completas que facultaron la identificación de contrastes entre las muestras analizadas.
- La generación de imágenes de topografía y contraste de fase de las películas de almidón con el AFM, cuyo análisis no requirió recubrimientos adicionales de la muestra, permitió encontrar diferencias significativas a nanoescala, relacionadas principalmente, con la estructura superficial, homogeneidad de la muestra e identificación de zonas aparentemente más hidrofílicas. Las imágenes de topografía permitieron comparar las sinuosidades superficiales en diferentes zonas de las biopelículas, descubriendo una topografía granular en el caso del biofilm de almidón de melloco, un aspecto fibroso en las películas de almidón de mashua y oca y una apariencia compacta en el biofilm de almidón de papa. Por otro lado, las imágenes de contraste de fase facilitaron información relacionada con propiedades de adhesión de las muestras. Los biofilms de almidón de melloco y mashua mostraron mayor segregación de contraste de fase que la película de almidón de papa.
- El estudio de las propiedades macroscópicas de las películas de almidón extraído de diferentes tubérculos andinos permitió identificar diferencias entre las muestras. La obtención de imágenes por microscopía óptica permitió identificar el nivel de asociación de los componentes internos estructurales entre sí. La absorción óptica infrarroja FTIR sugiere que todas las muestras tienen una conformación estructural muy cercana. Los datos de opacidad obtenidos por espectrofotometría UV/VIS ubican al biofilm de almidón de papa con la mayor opacidad a 560nm. Los análisis de contenido de humedad y solubilidad ratifican que los biofilms de almidón de melloco, mashua y oca tienen mayor interacción con el agua que el biofilm de almidón de papa. Los resultados de elasticidad

revelan que el biofilm de almidón de papa expone mejores propiedades elásticas en comparación con el resto.

- Las películas a base de almidón reflejaron diferentes propiedades según su fuente de extracción. Se correlacionaron propiedades macroscópicas como contraste óptico, absorción óptica infrarroja, opacidad, contenido de humedad, materia total soluble y elasticidad con las propiedades nanoscópicas halladas en imágenes de topografía y contraste de fase por AFM, lo que permitió comprender las causas que originan las variaciones observadas. Las biopelículas de almidón de melloco, mashua y oca mostraron valores altos de humedad y materia total soluble en contraste con el biofilm de almidón de papa, resultados corroborados por las imágenes de contraste de fase por AFM en las que se observaron mayor segregación de fase en los tres primeros biofilms mencionados. Asimismo, las películas de almidón de papa proporcionaron una mayor resistencia elástica, las cuales podrían estar relacionadas a la estructura compacta observada a escala nanoscópica en las imágenes de topografía por AFM.

4.2. Recomendaciones

- Cambiar las concentraciones iniciales de los componentes que conforman las láminas para optimizar sus propiedades.
- Realizar una caracterización química de las láminas de almidón extraído de cada uno de los tubérculos andinos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el fin de comprender mejor el comportamiento de las muestras analizadas.
- Probar otros métodos de medida para la generación de imágenes por AFM como el Pinpoint, que es un modo de operación que proporciona imágenes nanomecánicas precisas y cuantitativas a través del mapeo de espectroscopía de fuerza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arancibia, M. Y., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2015). Development of active films of chitosan isolated by mild extraction with added protein concentrate from shrimp waste. *Food Hydrocolloids*, *43*, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.006>
- Araújo, J. M. S., de Siqueira, A. C. P., Blank, A. F., Narain, N., & de Aquino Santana, L. C. L. (2018). A Cassava Starch–Chitosan Edible Coating Enriched with Lippia sidoides Cham. Essential Oil and Pomegranate Peel Extract for Preservation of Italian Tomatoes (*Lycopersicon esculentum Mill.*) Stored at Room Temperature. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(9), 1750–1760. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2139-9>
- Athira, G. K., Jyothi, A. N., & Vishnu, V. R. (2018). Water Soluble Octenyl Succinylated Cassava Starch-Curcumin Nanoformulation With Enhanced Bioavailability and Anticancer Potential. *Starch/Staerke*, *70*(7–8), 1–9. <https://doi.org/10.1002/star.201700178>
- Bodini, R. B., Pugine, S. M. P., de Melo, M. P., & de Carvalho, R. A. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory properties of orally disintegrating films based on starch and hydroxypropyl methylcellulose incorporated with Cordia verbenacea (*Erva baleeira*) extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *159*, 714–724. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.075>
- Boeira, C. P., Alves, J. dos S., Flores, D. C. B., de Moura, M. R., Melo, P. T. S., & da Rosa, C. S. (2021). Antioxidant and antimicrobial effect of an innovative active film containing corn stigma residue extract for refrigerated meat conservation. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15721>
- Brar Satinder Kaur, Z. T. C. V. M. S. R. Y. T. R. D. (2015). 20.1 Introduction. In *Nanomaterials in the Environment*. American Society of Civil Engineers (ASCE). <https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt0113EABO/nanomaterials-in-environment/nanomateri-introduction-10>
- Casado, F., Casado, S., Ceballos-Francisco, D., & Esteban, M. Á. (2018). Assessment of the scales of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) by image analysis and atomic force microscopy. *Fishes*, *3*(1). <https://doi.org/10.3390/fishes3010009>

- Chang, K. C., Chiang, Y. W., Yang, C. H., & Liou, J. W. (2012). Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, *24*(4), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002>
- Chauca, J. (2022). Caracterización nanoscópica superficial de la estructura de las alas del insecto andino *Platycoelia* (catzo ecuatoriano) a través de microscopia de fuerza atómica. In *Universidad Técnica de Ambato*.
- Cheng, M., Yan, X., Cui, Y., Han, M., Wang, Y., Wang, J., Zhang, R., & Wang, X. (2022). Characterization and Release Kinetics Study of Active Packaging Films Based on Modified Starch and Red Cabbage Anthocyanin Extract. *Polymers*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/polym14061214>
- Chichti, E., George, M., Delenne, J. Y., Radjai, F., & Lullien-Pellerin, V. (2013). Nano-mechanical properties of starch and gluten biopolymers from atomic force microscopy. *European Polymer Journal*, *49*(12), 3788–3795. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.024>
- Clavijo, N., Baron, M., & Combariza, J. (2014). *Tuberculos andinos: conservacion y uso desde una perspectiva agroecologica*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. <https://elibro.net/es/lc/uta/titulos/69542>
- Cruz-Tirado, J. P., Siche, R., Cabanillas, A., Díaz-Sánchez, L., Vejarano, R., & Tapiablácido, D. R. (2017). Properties of baked foams from oca (*Oxalis tuberosa*) starch reinforced with sugarcane bagasse and asparagus peel fiber. *Procedia Engineering*, *200*, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.026>
- Cruz, G., Ribotta, P., Ferrero, C., & Iturriaga, L. (2016). Physicochemical and rheological characterization of Andean tuber starches: Potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Andigenum*), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and Papalisa (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Starch/Staerke*, *68*(11–12), 1084–1094. <https://doi.org/10.1002/star.201600103>
- Cunha, G. F., Soares, J. C., de Sousa, T. L., Egea, M. B., de Alencar, S. M., Belisário, C. M., & Plácido, G. R. (2021). Cassava-starch-based films supplemented with propolis extract: Physical, chemical, and microstructure characterization. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*(4), 12149–12158. <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1214912158>
- Dahan, N., & Alosfur, S. (2021). 31.4.1 Structural Properties. In *Materials Science*

and Modern Manufacturing. Trans Tech Publications.
<https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt012ZI6B3/materials-science-modern/structural-properties>

- Daza, L. D., Eim, V. S., & Váquiro, H. A. (2021). Influence of ulluco starch concentration on the physicochemical properties of starch–chitosan biocomposite films. *Polymers*, *13*(23). <https://doi.org/10.3390/polym13234232>
- Dos Santos Garcia, V. A., Gonçalves Borges, J., Mazalli, M. R., Lapa-Guimarães, J. das G., Vanin, F. M., & de Carvalho, R. A. (2017). Gelatin and pregelatinized starch orally disintegrating films: Properties and stability of vitamin C. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(20), 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.44841>
- Flores, V. (2011). Recopilación de saberes ancestrales sobre las especies andinas alimenticias: mashua y quinua en la comunidad de Pesillo, Cayambre - Ecuador. Recupeado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4596/6/UPS-YT00068.pdf>
- Gao, H., Cai, J., Han, W., Huai, H., Chen, Y., & Wei, C. (2014). Comparison of starches isolated from three different Trapa species. *Food Hydrocolloids*, *37*, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.001>
- García, R., Jimenez, L., & Bernal, P. (2018). *Tuberculos andinos de vuelta a casa: conservacion participativa de tuberculos andinos en Cundinamarca.* Corporacion Universitaria Minuto de Dios. <https://elibro.net/es/lc/uta/titulos/127207>
- Joshi, J., Homburg, S. V., & Ehrmann, A. (2022). Atomic Force Microscopy (AFM) on Biopolymers and Hydrogels for Biotechnological Applications—Possibilities and Limits. *Polymers*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/polym14061267>
- Kwaśniewska, A., Świetlicki, M., Prószyński, A., & Gladyszewski, G. (2021). The Quantitative Nanomechanical Mapping of Starch / Kaolin. *Polymers*, *13*, 1–11.
- Liang, W., Shi, H., Yang, X., Wang, J., Yang, W., Zhang, H., & Liu, L. (2020). Recent advances in AFM-based biological characterization and applications at multiple levels. *Soft Matter*, *16*(39), 8962–8984. <https://doi.org/10.1039/d0sm01106a>
- Lim, T. K. (2015). Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. In *Springer* (Vol. 9). https://doi.org/10.1007/978-94-017-9511-1_30
- Lim, T. K. (2016). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. In *Springer* (Vol. 10).

<https://doi.org/10.1007/978-94-017-7276-1>

Magonov, S. N., Elings, V., & Whangbo, M. H. (1997). Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. In *Surface Science* (Vol. 375, Issues 2–3). [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(96\)01591-9](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(96)01591-9)

Mroczkowska, M., Culliton, D., Germaine, K., & Neves, A. (2021). Comparison of Mechanical and Physicochemical Characteristics of Potato Starch and Gelatine Blend Bioplastics Made with Gelatines from Different Sources. *Clean Technologies*, 3(2), 424–436. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol3020024>

Nouraddini, M., Esmaili, M., & Mohtarami, F. (2018). Development and characterization of edible films based on eggplant flour and corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1639–1645. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.126>

Ogunsona, E., Ojogbo, E., & Mekonnen, T. (2018). Advanced material applications of starch and its derivatives. *European Polymer Journal*, 108(September), 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.039>

Otálora, M. C., Wilches-Torres, A., & Gómez Castaño, J. A. (2021). Preparation and physicochemical properties of edible films from gelatin and Andean potato (*Solanum tuberosum* Group Phureja) starch. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 838–846. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14727>

Pacheco, M. T., Hernández, O., Moreno, J., & Villamiel, M. (2020). Andean tubers grown in Ecuador: New sources of functional ingredients. *Food Bioscience*, 35(April), 100601. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100601>

Pacheco, M. T., Moreno, F. J., Moreno, R., Villamiel, M., & Hernandez-Hernandez, O. (2019). Morphological, technological and nutritional properties of flours and starches from mashua (*Tropaeolum tuberosum*) and melloco (*Ullucus tuberosus*) cultivated in Ecuador. *Food Chemistry*, 301(February), 125268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125268>

Park Systems. (2022). *Tapping mode*. <https://parksystems.com/>

Pelissari, Franciele M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pined, E. A. G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>

- Pelissari, Franciele Maria, Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. do A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.007>
- Pereira, J. F., Lonni, A. A. S. G., & Mali, S. (2022). Development of biopolymeric films with addition of vitamin C and catuaba extract as natural antioxidants. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 52(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1916755>
- Pico, C. (2022). Caracterización nanoscópica de la estructura superficial del insecto amazónico *Rhynchophorus palmarum*. In *Universidad Técnica de Ambato*.
- Pico, C., De la Vega, J., Tubón, I., Arancibia, M., & Casado, S. (2022). Nanoscopic Characterization of Starch Biofilms Extracted from the Andean Tubers *Ullucus tuberosus*, *Tropaeolum tuberosum*, *Oxalis tuberosa*, and *Solanum tuberosum*. *Polymers*.
- Salazar, D., Arancibia, M., Casado, S., Viteri, A., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2021). Green banana (*Musa acuminata* AAA) wastes to develop an edible film for food applications. *Polymers*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/polym13183183>
- Santacruz, S., Rivadeneira, C., & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.019>
- Senapathi Venkatramanan, S. S. V. P. M. S. C. (2022). 10.2.5 Raman Spectroscopy. In *Groundwater Contamination in Coastal Aquifers - Assessment and Management*. Elsevier. <https://app.knovel.com/hotlink/khtml/id:kt0131N5F3/groundwater-contamination/raman-spectroscopy>
- Silveira, M. P., Silva, H. C., Pimentel, I. C., Poitevin, C. G., da Costa Stuart, A. K., Carpiné, D., de Matos Jorge, L. M., & Jorge, R. M. M. (2020). Development of active cassava starch cellulose nanofiber-based films incorporated with natural antimicrobial tea tree essential oil. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(21), 1–11. <https://doi.org/10.1002/app.48726>

- Singh, G. P., Bangar, S. P., Yang, T., Trif, M., Kumar, V., & Kumar, D. (2022). Effect on the Properties of Edible Starch-Based Films by the Incorporation of Additives: A Review. *Polymers*, *14*(10), 1987. <https://doi.org/10.3390/polym14101987>
- Sohany, M., Tawakkal, I. S. M. A., Ariffin, S. H., Shah, N. N. A. K., & Yusof, Y. A. (2021). Characterization of anthocyanin associated purple sweet potato starch and peel-based pH indicator films. *Foods*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092005>
- Souza, L. De, Coelho, D. B., Veggi, P. C., Campelo, P. H., & Moraes, M. A. De. (2022). Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds : Fundamentals and Applications. *Polymers*, *14*, 1–16.
- Suquilanda, M. B. (2009). Producción orgánica de cultivos andinos. *UNOCANC*, *126*, 199.
http://www.mountainpartnership.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
- Tarique, J., Sapuan, S. M., & Khalina, A. (2021). Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93094-y>
- Tongdeesontorn, W., Mauer, L. J., Wongruong, S., Sriburi, P., Reungsang, A., & Rachtanapun, P. (2021). Antioxidant films from cassava starch/gelatin biocomposite fortified with quercetin and TBHQ and their applications in food models. *Polymers*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071117>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Torres, C., Díaz, D. A., & Amaya, E. (2011). Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. *International Journal of Biological Macromolecules*, *48*(4), 603–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.026>
- Valcárcel, B., Rondán, G., & Finardi, F. (2013). The physical, chemical and functional characterization of starches from andean tubers: Oca (*Oxalis tuberosa molina*), olluco (*Ullucus tuberosus caldas*) and mashua (*Tropaeolum tuberosum ruiz & pavón*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *49*(3), 453–464. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300007>
- Velásquez, F. F., Bello, L. A., Nuñez, C., Yee, H., & Velezmoro, C. E. (2021).

- Relationships among molecular, physicochemical and digestibility characteristics of Andean tuber starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.039>
- Wu, D., Samanta, A., Srivastava, R. K., & Hakkarainen, M. (2017). Starch-Derived Nanographene Oxide Paves the Way for Electrospinnable and Bioactive Starch Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 18(5), 1582–1591. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00195>
- Xing, C., Liu, L., & Li, M. (2020). Analysis of the nanoscale phase characteristics of bitumen and bitumen in mastics and mixtures via AFM. *Journal of Microscopy*, 280(1), 19–29. <https://doi.org/10.1111/jmi.12931>
- Xu, L. C., & Siedlecki, C. A. (2017). 3.2 Atomic force microscopy. *Comprehensive Biomaterials II, M*, 25–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10126-2>
- Yang, H., Wang, Y., Lai, S., An, H., Li, Y., Chen, F., Liu, S., & Wang, Y. (2007). Application of atomic force microscopy as a nanotechnology tool in food science. *Scanning*, 72(2), 61–73. <https://doi.org/10.1002/sca.20173>
- Zhu, F., & Cui, R. (2020). Comparison of physicochemical properties of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.028>

ANEXOS

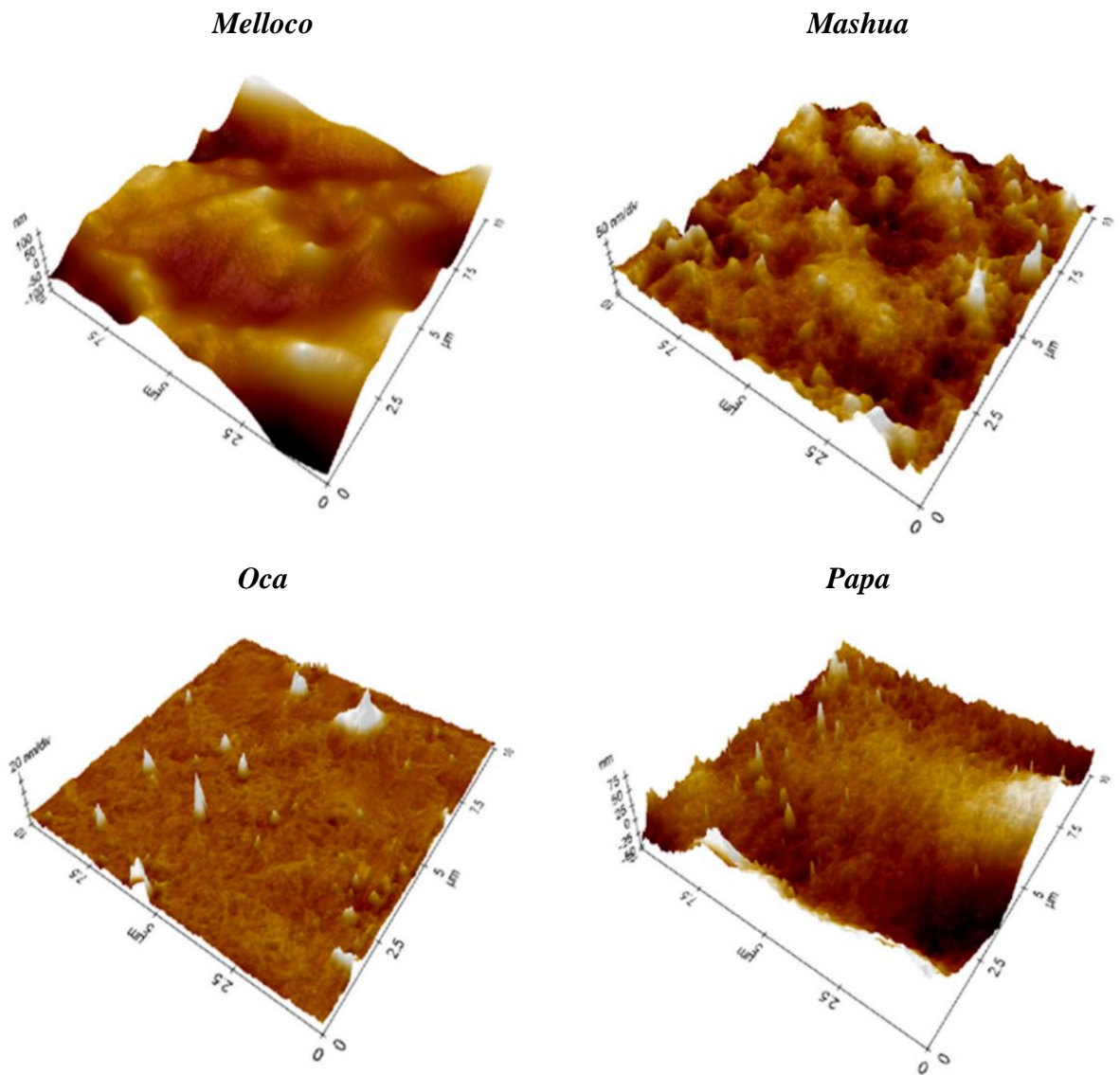


Figura A1. Comparación de microscopía de fuerza atómica topográfica tridimensional entre imágenes de $10 \mu\text{m}^2$ de área de películas de almidón extraído de cada tubérculo andino analizado.

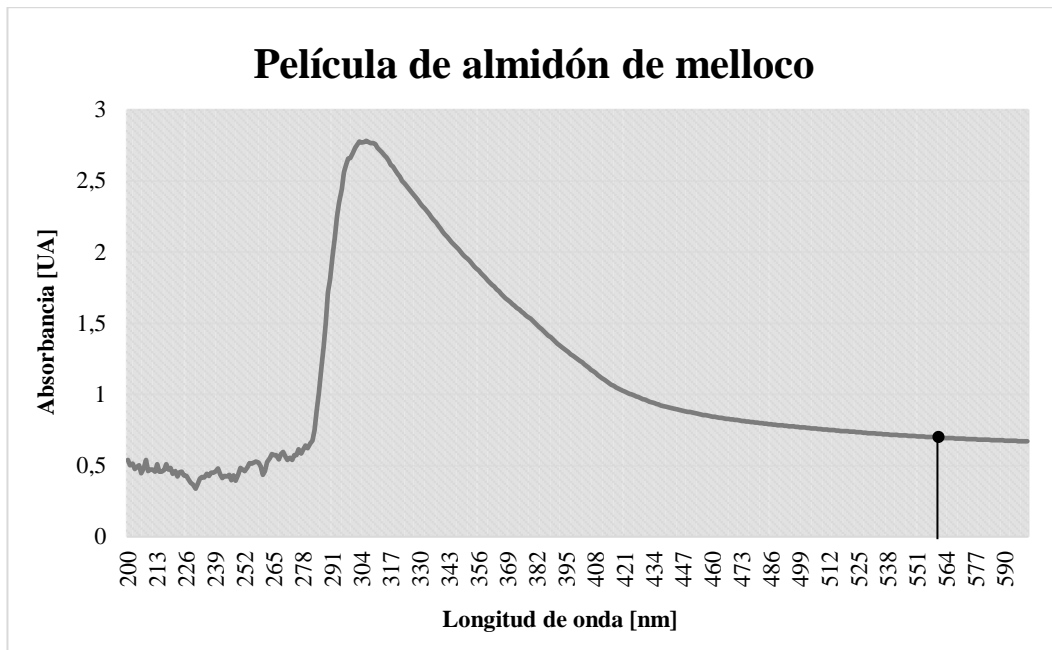


Figura A2. Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de melloco.

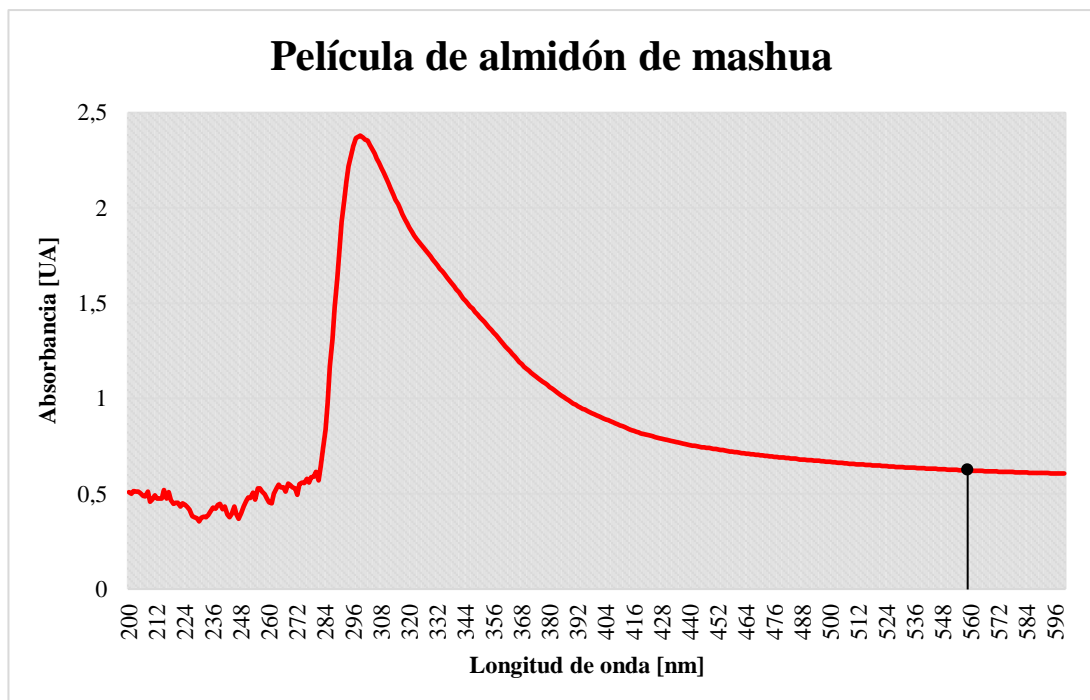


Figura A3. Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de mashua.

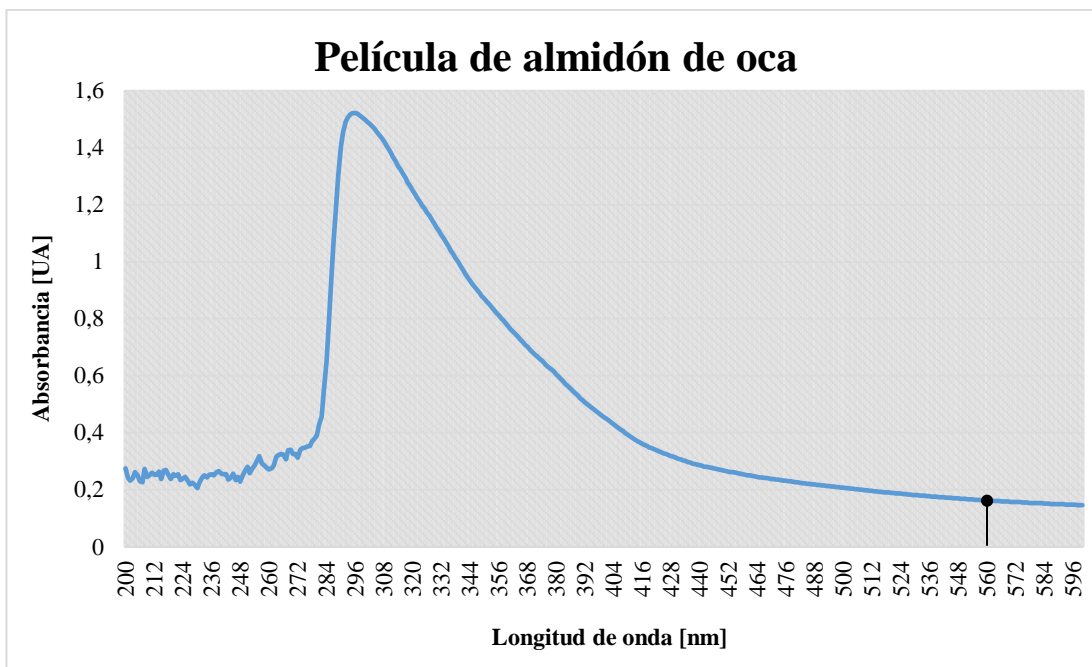


Figura A4. Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de oca.

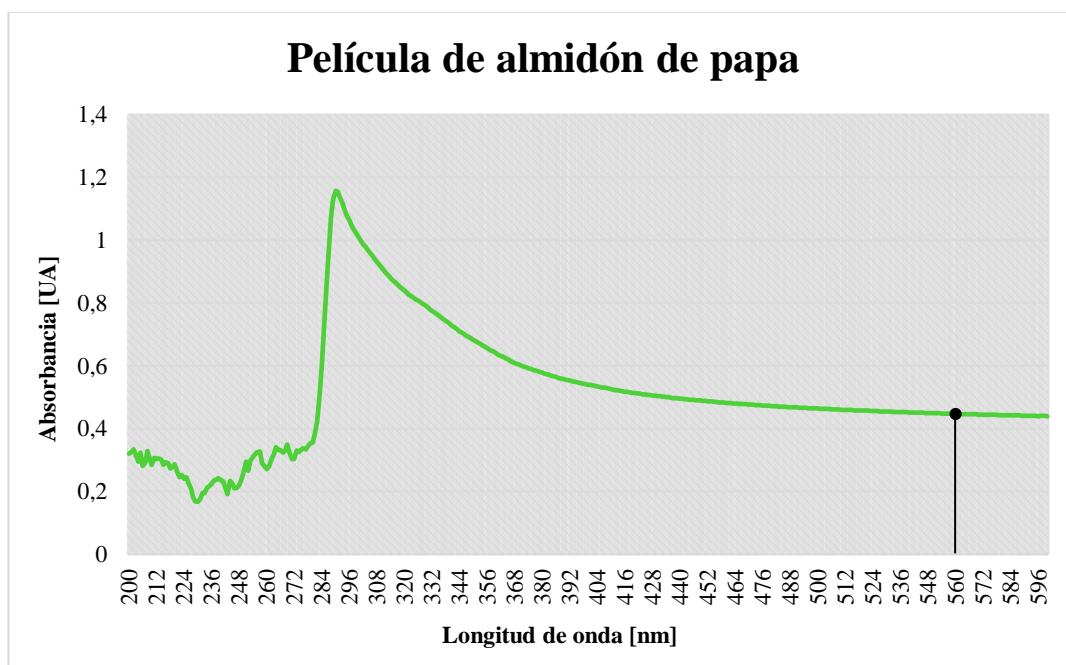


Figura A5. Curva Longitud de onda Vs. Absorbancia de los datos obtenidos de Espectrofotometría UV/VIS de la película elaborada con almidón de papa.

Article

Nanoscopic Characterization of Starch Biofilms Extracted from the Andean Tubers *Ullucus tuberosus*, *Tropaeolum tuberosum*, *Oxalis tuberosa*, and *Solanum tuberosum*

Cynthia Pico ^{1,†}, Jhomara De la Vega ^{2,†}, Irvin Tubón ¹, Mirari Arancibia ^{1,2}  and Santiago Casado ^{1,*} 

¹ Food and Biotechnology Science and Engineering Department, Technical University of Ambato, Ambato 180207, Ecuador

² Isabrubotanik S.A., Ambato 180150, Ecuador

* Correspondence: s.casado@uta.edu.ec; Tel.: +593-2400987 (ext. 5509)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The replacement of synthetic polymers by starch biofilms entails a significant potentiality. They are non-toxic materials, biodegradable, and relatively easy to gather from several sources. However, various applications may require physicochemical properties that might prevent the use of some types of starch biofilms. Causes should be explored at the nanoscale. Here we present an atomic force microscopy surface analysis of starch biofilms extracted from the Andean tubers melloco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*), and potato (*Solanum tuberosum*) and relate the results to the macroscopic effects of moisture content, water activity, total soluble matter, water vapor permeability, elastic properties, opacity and IR absorption. Characterization reveals important differences at the nanoscale between the starch-based biofilms examined. Comparison permitted correlating macroscopic properties observed to the topography and *tapping* phase contrast segregation at the nanoscale. For instance, those samples presenting granular topography and disconnected phases at the nanoscale are associated with less elastic strength and more water molecule affinity. As an application example, we propose using the starch biofilms developed as a matrix to dispose of mouthwash and discover that melloco films are quite appropriate for this purpose.

Keywords: starch biofilms; Andean tubers; atomic force microscopy; nanoscience; melloco; mashua; oca



Citation: Pico, C.; De la Vega, J.; Tubón, I.; Arancibia, M.; Casado, S. Nanoscopic Characterization of Starch Biofilms Extracted from the Andean Tubers *Ullucus tuberosus*, *Tropaeolum tuberosum*, *Oxalis tuberosa*, and *Solanum tuberosum*. *Polymers* **2022**, *14*, 4116. <https://doi.org/10.3390/polym14194116>

Academic Editor: Vincent Chan

Received: 30 August 2022

Accepted: 26 September 2022

Published: 1 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The production of edible films extracted from a natural and organic source has potential in the food, nutraceutical, pharmaceutical, biomedical, and cosmetic industries [1]. Its green chemistry and reduced environmental impact make biopolymers a suitable alternative to traditional synthetic petroleum-based methods for many applications.

Starch constitutes one of the best-known biofilm bases [2]. This polysaccharide can join numerous glucose molecules by glycosidic bonds, creating a structure that can be used as a multipurpose organic matrix. However, the properties of these films are dependent on their chemical composition. Amylose/amylopectin percentage, plasticizer (as glycerol) concentration, or the presence of other trace elements during sample preparation, such as lipids and proteins, may entail important structural differences in each resulting starch film [3–8]. Hence, a proper selection of the starch source is of the utmost importance to optimize the starch-based film attributes for a particular application.

Tubers are a possible starch source. Although potato is widely used for this purpose, it is not the only tuber containing this carbohydrate. A plethora of other Andean tubers offer emerging and promising alternatives, which also present low oxygen permeability, good transparency, odorlessness, and resistant structural properties. Melloco, ulluco, or olluco (*Ullucus tuberosus* C.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. and P.), and oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) have been proposed as appropriate substitutes [9–12]. However, starch layers

extracted from diverse sources may acquire different properties due to their composition variability [9,13].

Macroscopic dissimilarities among starch films extracted from diverse sources can be detected by comparing the resulting measurements of various layers yielded at equal conditions from different tubers. Nevertheless, exploration of the causes producing this variability requires focusing on the structural conformation of the films. Nanoscopic topographic characterization opens the possibility of visualizing the segregation of material heterogeneities at this scale. Atomic force microscopy (AFM) permits directly measuring the surface of a sample with nanoscopic resolution in ambient conditions [14–17]. Furthermore, this technique is also able to provide information about energy dissipation differences on the sample at this scale, allowing the detection of valuable structural conformation characteristics.

Here we show a comparative analysis of starch films extracted from melloco, mashua, oca, and potato (*Solanum tuberosum* L.). We measure their optical contrast, colorimetry, opacity, moisture content (MC), water activity (WA), total soluble matter (TSM), water vapor permeability (WVP), infrared optical absorption, and elastic properties under identical circumstances and compare the results to our nanoscopic surface characterizations using AFM. This study provides a double objective: offering data from biofilms obtained from uncommon Ecuadorian starch sources and establishing a relationship between surface attributes at the nanoscale and macroscopic properties. Our comparison proves the connection, showing that an AFM analysis on the surface of the starch-based biofilms is an easy and fast way to select the best kind of starch-based biofilm, depending on the specific demanding application. It is of notable importance in those cases where a complete chemical characterization is not straightforward.

As an application utility, we explore the possibility of adding a mouthwash to these films and subject them to a tasting experiment. Melloco samples were selected as the best valued starch-based film for this purpose. Coincidentally, in dry conditions, these samples display a consistent nanoscopic granular surface topography coupled with a clearer phase segregation contrast, which can be related to better solubility and lower tensile strength. This proves the worth of an AFM inspection to optimize biofilm selection, depending on the application required.

2. Materials and Methods

2.1. Starch Extraction

Starch was extracted using a modification of the method of Neeraj et al. [18]. As starch sources, melloco (*Ullucus tuberosus* C.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. and P.), oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), and potato (*Solanum tuberosum* L.) were used. Fresh Andean tubers were washed, peeled, diced, and ground. The pulp was blended with 1 L of distilled water for 5–6 min, then filtered using a cheesecloth having a pore diameter of 120 mesh. The filtrate was collected in a glass beaker and allowed to stand for 6 h for the starch to sediment. The supernatant was discarded, and the starch extract was dried overnight in an oven at 45 ± 5 °C.

2.2. Film Preparation

Edible films were prepared by dispersing Andean tube starches (5 g/100 mL) in the presence of glycerol (3 g/100 mL) into deionized water (MilliQ) under continuous stirring at 200 rpm and heating on a hot plate with a magnetic stirrer up to the starch gelatinization temperature (85–90 °C). After the heating process was completed, gels were degassed by applying a vacuum for 7 min. Then, the solutions were cooled to 50 °C, and approximately 40 mL of the film-forming solution was poured onto 100 × 10 mm glass plates (Petri dishes). Finally, the solutions were dried at 40 °C for 24 h. A similar procedure was used with the films, including mouthwash, substituting the deionized water with Listerine Original. All the casted samples were stored at approximately 58% RH and a temperature of 18 °C before characterization and sensorial analysis.

2.3. Optical Microscopy Characterization

Visual appearance and apparent transparency were determined using a conventional camera by reflecting diffused white light on the films placed onto a background containing black letters and figures over a white surface.

Optical micrographs were acquired in reflection mode with the help of an EVOS XL microscope and a 40 \times , 0.65 Numerical Aperture collimated objective using transmitted white illumination. Pieces of samples from each Andean tuber were carefully adhered to a microscope slide and placed inverted (upside down).

Color characterization was determined by means of a Lovibond LC 100 colorimeter, measuring at three distinct positions on each film.

2.4. Moisture Content

The moisture content (MC) of the films was determined gravimetrically. Samples of films extracted from each Andean tuber studied were separated from the original layer without any additional treatment and weighed (W_0). Pieces were dried at 105 °C for 24 h and weighed again afterwards (W_F). Measurement in triplicate of the MC was calculated using the equation

$$MC = \frac{W_0 - W_F}{W_0} * 100 \% \quad (1)$$

2.5. Solubility

Total soluble matter (TSM) was determined on samples from each Andean tuber film studied. Squared 5 mm side pieces of each film were weighed (W_1), immersed into 30 mL of milliQ water, and left in constant and mild agitation under ambient conditions for 24 h. After recovering the remaining undissolved film portions by filtration, samples were dried at 105 °C for 24 h. Next, residues were weighed again (W_2). Values of the TSM were obtained in triplicate using the equation

$$TSM = \frac{W_1 - W_2}{W_1} * 100 \% \quad (2)$$

2.6. Water Vapor Permeability

Water vapor permeability (WVP) was determined according to the method described by Sobral et al. [19]. Samples of films extracted from each Andean tuber were situated on the top part of a desiccator, above a milliQ water deposit existing at the bottom. For 10 h, all the pieces were exposed to saturated water vapor under ambient conditions. Afterwards, samples were situated on the top of a flask containing dried silica gel inside. Films blocked a circular 16.5 mm diameter aperture unique water vapor entrance to the flask interior. All chambers were positioned inside the same water vapor-saturated desiccator described above and weighed every hour for 10 h. Linear regression of the weight (w) values versus time (t) allowed obtaining the w/t data of the following WVP equation, which permitted calculating its value. Measurements were done in triplicate.

$$WVP = \frac{w}{tA} \frac{x}{\Delta P} \quad (3)$$

Thickness (x) was measured using a 0.01 mm conventional caliper and averaging the values obtained at 8 different locations of each film. The thickness measured was around 0.3 mm in all cases analyzed. The permeation area (A) was determined from the aperture of the flask. ΔP is the partial vapor pressure difference between the atmosphere with silica gel and pure water (2642 Pa at 22 °C).

2.7. Optical Absorption

A UV-visible light spectrophotometer was used to determine the opacity of each film analyzed. Samples were cut in a rectangular shape and placed directly into quartz cells

using an accuSkan GO UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A blank quartz cell served as the reference value. Absorbance was recorded at 560 nm, and opacity (O) was calculated using the film thickness (x , mm) through the equation

$$O = \frac{Abs_{560}}{x} \quad (4)$$

Measurements were performed in triplicate at ambient conditions.

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded according to the method described by Orsuwan et al. [20] using a Spectrum Two spectrophotometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) coupled to an attenuated total reflectance (ATR) adapter. All measurements covered a wave number range between 4000 and 600 cm^{-1} with 4 cm^{-1} accuracy. Under ambient conditions, samples of each film were located directly on the ATR tip surface and gently pressed with the flat-tipped plunger. Data were acquired in triplicate at different locations of each film.

2.8. Elastic Properties

The mechanical properties of edible films, such as tensile strength (TS), elongation at break (EB), and elastic modulus (EM), were measured under ambient conditions by using the standard ASTM D 882–88 method (Instron Universal Testing). Films were cut into rectangular strips of 3 cm \times 10 cm and preconditioned at 50% RH at ambient temperature for 48 h. The crosshead speed was set at 12.5 mm/min, and at least 5 replicates of each specimen were averaged together.

2.9. Atomic Force Microscopy

The surface morphology of the films extracted from each Andean tuber analyzed was characterized at the nanoscale using a Park Systems XE7 Atomic Force Microscope (Santa Clara, CA, USA). Samples were cut into small pieces and attached to the AFM sample holder with double-sided tape. Without any additional treatment, film surfaces were scanned in non-contact mode (*tapping*) under ambient conditions using PPP-NCHR commercial silicon cantilever tips (42 N/m, 330 kHz, <10 nm typical diameter). All images were acquired at 512 \times 512 pixels². AFM image edition was restricted to only a single polynomial leveling, performed using the Park System's XEI software.

2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed through the determination of variance (ANOVA) and Tukey tests of multiple comparisons with the aid of the Statistic GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance level was set at 5%.

2.11. Sensorial Analysis

Twenty-seven judges evaluated several sensorial characteristics of films containing mouthwash by each tasting a piece extracted from each Andean tuber analyzed. In a single presentation, the following factors were graded: acceptability, texture, taste, odor, and utility as a mouthwash in this presentation (applicability). For all the features except texture, the panelists used a 5-point hedonic scale (5: very pleasant; 4: pleasant; 3: neither pleasant nor unpleasant; 2: unpleasant; 1: very unpleasant). For texture quality, the following scale was used: 5—very hard; 4—hard; 3—neither hard nor soft; 2—soft; 1—very soft.

3. Results and Discussion

Determining the properties of biofilms based on starch extractions from tubers is necessary to optimize the selection of the source, depending on the purpose [5,8,9]. An identical procedure of starch extraction was applied to the four Andean tubers analyzed: melloco, mashua, oca, and potato. Their macroscopic and nanoscopic properties are compared.

3.1. Macroscopic Optical Differences

Slight differences in the visual appearance and apparent transparency can be detected even in macroscopic observations, as shown in Figures 1 and S1.

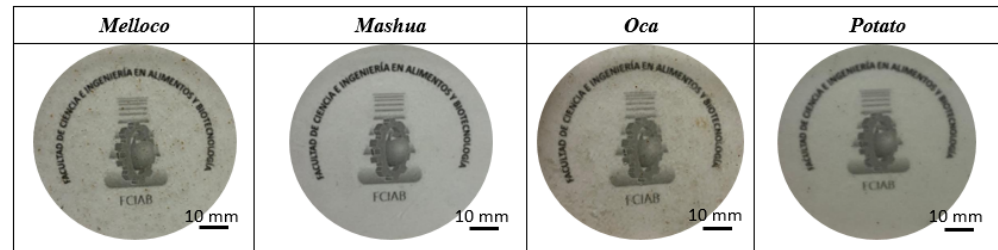


Figure 1. Visual appearance and apparent transparency of starch films extracted from each Andean tuber analyzed.

At the microscopic scale, it is possible to distinguish more differences among them, as depicted in Figures 2 and S2. Since white light completely crosses the film thickness, dissimilarities among them may indicate the existence of internal regions of different compositions.

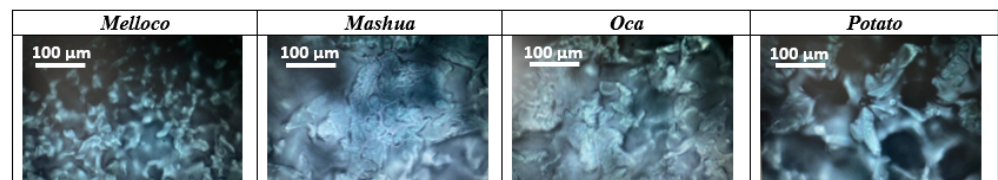


Figure 2. Micrographs of starch films extracted from each Andean tuber analyzed in reflection using white light transmission illumination.

In order to quantify the color and opacity macroscopic variability, measurements of the chromaticity parameters L^* , a^* , and b^* , as well as whiteness index (WI) and opacity data, were obtained from each Andean tuber studied. According to the CIELab scale, L^* represents the sample degree of lightness, a^* represents the redness, and b^* represents the yellowness [21]. The instrument was calibrated against a standard white reference plate. Results are shown in Table 1.

Table 1. L^* , a^* , and b^* color parameters, whiteness index (WI) and opacity data measured on films yielded from each Andean tuber analyzed.

Properties	Melloco	Mashua	Oca	Potato
L^*	90.36 ± 0.25^a	86.30 ± 0.82^b	80.73 ± 1.09^c	87.03 ± 0.98^{abc}
a^*	-0.27 ± 0.05^b	0.47 ± 0.06^a	0.63 ± 0.05^a	0.40 ± 0.01^a
b^*	9.18 ± 0.15^b	6.37 ± 0.06^c	10.00 ± 0.26^{ab}	11.40 ± 0.17^a
WI	86.70 ± 0.19^a	84.88 ± 0.72^{ab}	78.28 ± 1.09^c	82.72 ± 0.71^{bc}
Opacity	1.52 ± 0.04^b	1.29 ± 0.04^c	0.74 ± 0.03^d	2.03 ± 0.05^a

Results are mean \pm Standard Deviation (SD). Different letters (a, b, c, d) in the same row indicate significant differences between the different films ($p \leq 0.05$).

Lightness was high in all films but even higher in the films extracted from melloco ($p \leq 0.05$). Parameters a^* and b^* also showed variability ($p < 0.05$). Considering the L^* , a^* , and b^* values as a whole, all films display a tendency to whitish tones, a common characteristic of starch-based films [10,22]. In regard to their opacity, recorded data are between 0.74 (oca) and 2.03 (potato), which was lower than those observed by Santacruz et al. [23], whilst mashua (1.29) and melloco (1.52) presented intermediate values, the last one in agreement to the data reported by Daza et al. [24].

3.2. Water Interaction

Since many potential applications of starch-based films are related to interactions with water, moisture content (MC), water activity (WA), total soluble matter (TSM), and water vapor permeability (WVP) behavior of samples of films extracted from each Andean tuber analyzed were compared. Results are shown in Table 2.

Table 2. Moisture content (MC), water activity (WA), total soluble matter (TSM), and the water vapor permeability (WVP) data comparison among the starch-based films blended from each Andean tuber studied.

Properties	Melloco	Mashua	Oca	Potato
MC (%)	17.25 ± 0.25 ^a	16.73 ± 0.15 ^a	17.24 ± 0.18 ^a	13.76 ± 0.22 ^b
WA (a _w)	0.5060 ± 0.004 ^c	0.5218 ± 0.003 ^b	0.5082 ± 0.003 ^a	0.5079 ± 0.004 ^d
TSM (%)	84.45 ± 0.12 ^a	63.21 ± 0.10 ^c	63.71 ± 0.11 ^b	24.43 ± 0.13 ^d
WVP (g mm min ⁻¹ m ⁻² kPa ⁻¹)	0.081 ± 0.001 ^{bcd}	0.085 ± 0.001 ^{ab}	0.054 ± 0.003 ^d	0.058 ± 0.002 ^c

Results are mean ± SD. Different letters (a, b, c, d) in the same row indicate significant differences between the different films ($p \leq 0.05$).

The contrast between the biofilms analyzed persists when studying their interaction with water. The lowest MC was found on the biofilms extracted from potato, and no significant differences were observed between the MC values of blends from melloco, mashua, and oca. The WVP data obtained for films yielded from melloco and mashua were higher than those related to oca and potato. This could be attributed to a strong interaction of starch-starch molecules in potato and oca films and a more flexible starch chain in melloco and mashua films [3]. Solubility could be related to the hydrophilic nature of starch-based films: those with greater crystalline starch content are sensitive to moisture and relative atmospheric humidity [25,26].

3.3. Fourier Transform Infrared Absorption

Structural properties may occur due to molecular bonding divergences, which can be inspected by exploring the absorption of infrared light frequencies of the biofilms using an attenuated total reflectance (ATR) adapter coupled to a Fourier transform infrared spectrophotometer. Data obtained are depicted in Figure 3.

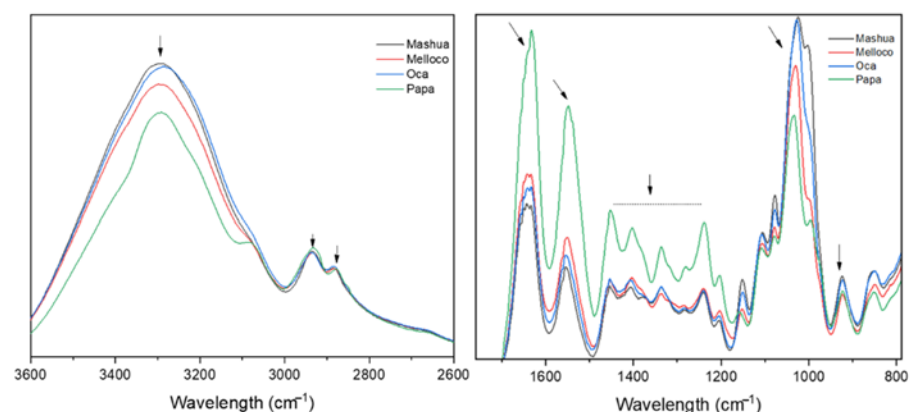


Figure 3. Fourier transform infrared absorption spectra measured on the films formulated with starch from the Andean tubers studied. Arrows highlights representative peaks.

Structural analysis performed by infrared absorption suggests a very close conformation among all the biofilms analyzed. All the spectra found present a broad band at around 3350 cm⁻¹, corresponding to the free hydroxyl groups (-O-H), which are associated with the starch and glycerol components of the blends. The intensity of this broad band of the Andean tuber starch-based films could be related to the number of hydroxyl groups [27].

Sharp bands at 2933 and 2883 cm^{-1} are characteristic of C-H stretch, occurring at the starch [28]. Bands at 1633, 1452, 1404, and 1240 cm^{-1} can be assigned to the bending of water and CH_2 . The absorption peak at 1548 cm^{-1} could be related to the stretching of the C-H bond, and the band at 1337 cm^{-1} could be related to the C-O-H bending vibration [29], confirming the hydration capacity of the blends [30,31]. The bands in the region between 1200 and 900 cm^{-1} could be attributed to C-O, C-C, and C-O-H vibrations [28].

3.4. Elastic Properties

Mechanical properties measured on each film analyzed are plotted in Figure 4.

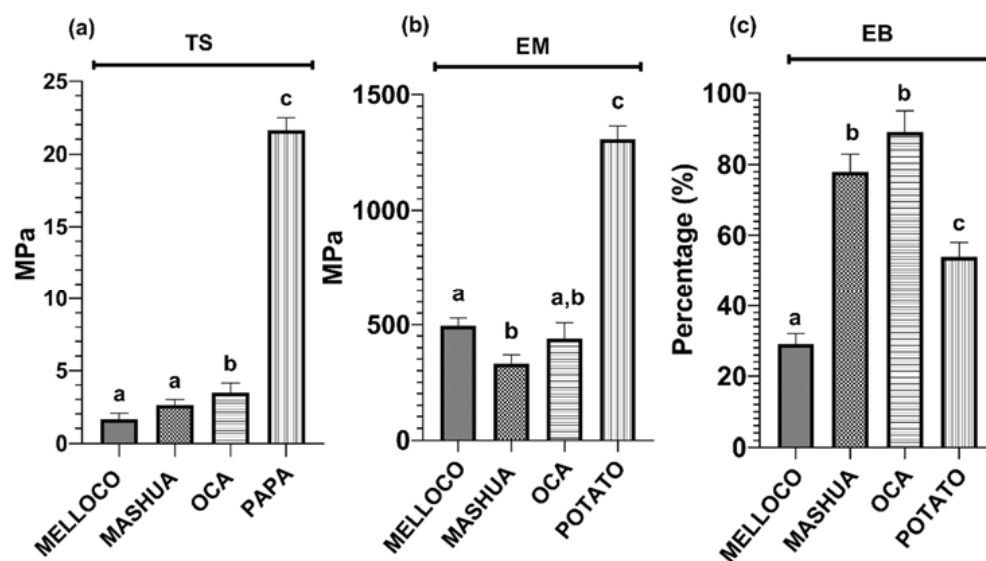


Figure 4. Mechanical properties obtained on the films extracted from each Andean tuber analyzed. Data shown are representative of five independent experiments and represent the mean \pm SD. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$ ANOVA post hoc Tukey's test). (a) Tensile strength, (b) elastic modulus (Young's modulus), and (c) elongation at break.

Films prepared from potato have the highest values of tensile strength (TS) and elastic modulus (EM) (21.6 and 1305 MPa, respectively), in agreement with the published data [9,32]. There is insufficient information in the literature regarding the mechanical properties of the Andean tubers studied in this work. However, the recorded values measured on films obtained from oca and potato are higher than those reported [33–36], proving the dependency of the blends on the extracting sources and on the yielding process. Nevertheless, starch-based films obtained from melloco tubers present similar mechanical properties to those reported [35]. Values of elongation at break (EB) of starch films are not in direct relationship to TS and EM, since the highest EB measurement corresponds to oca.

3.5. Nanoscopic Characterization

3.5.1. Topography

Atomic force microscopy (AFM) permits detecting surface lateral irregularities of less than a few nanometers and sub-nano metrical vertical height contrasts. Avoidance of any coating requirement entails a significant biological potential applicability. In order to minimize lateral forces during the measurement, samples were scanned on *tapping* mode. A comparison among surface corrugations at different range spans of biofilms extracted from each different Andean tuber analyzed is shown in Figure 5.

AFM characterization is not constrained to a bidimensional surface morphology picture at the nanoscale. Recorded files comprise a set of data that allows, for instance, to draw tridimensional charts, as depicted in Figure 6. Figures S3 and S4 show 3D images at other scan ranges.

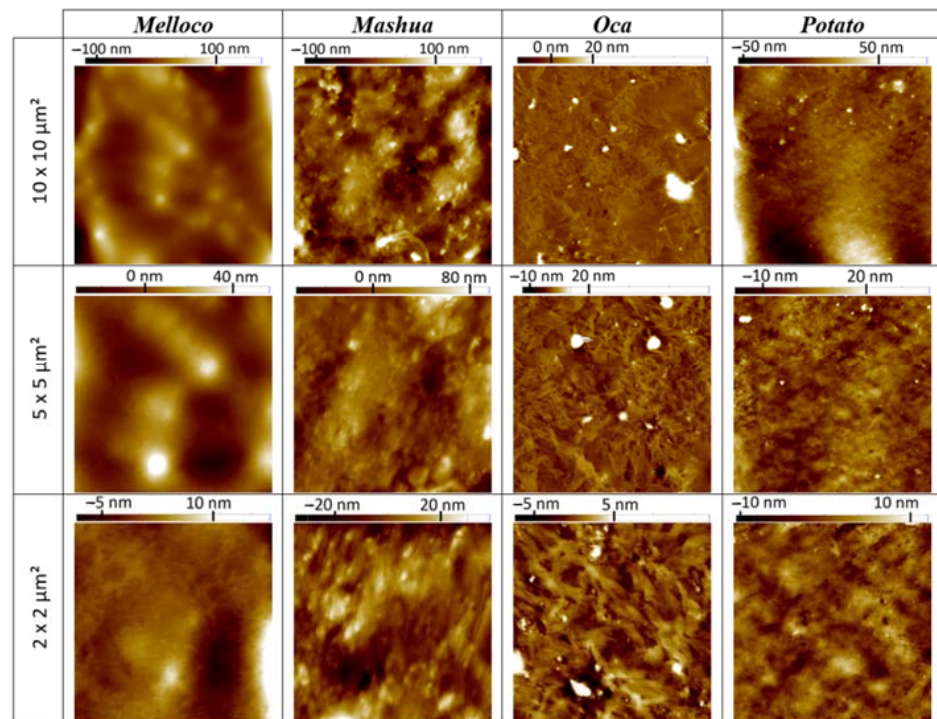


Figure 5. Topographic atomic force microscopy images measured using *tapping* mode on the surface of biofilms extracted from each Andean tuber studied at different scan area ranges.

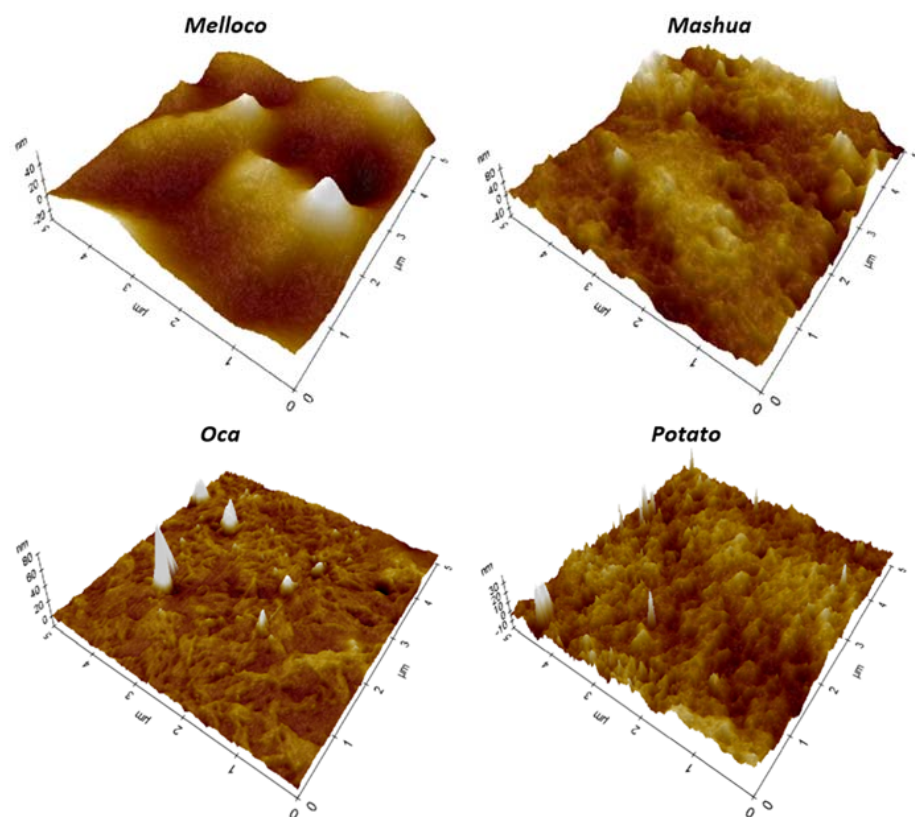


Figure 6. Tridimensional topographic atomic force microscopy comparison among 5 μm side squared images of biofilms extracted from each Andean tuber analyzed.

The granular but smooth topography observed in the case of films extracted from melloco may explain the elastic properties observed. The existence of inhomogeneities at

this scale underneath the surface can cause the appearance of defects that can be enlarged under increasing stress, weakening their whole structure. In the mashua and oca cases, the fibrous appearance shown in the $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ pictures reveals a similar effect. Potato starch-based films expose a more rigid surface at the nanoscale, both in topography and in phase contrast, indicating a harder structure with relatively less capability to adhere water molecules to their surface, in agreement with EM and TSM values measured. Interestingly, optical microscopy images of both melloco and potato cases suggest internal component separation, whilst films extracted from mashua and oca were apparently more homogeneous. The fibrous structure of these last samples was only discovered after AFM nanoscopic characterization.

3.5.2. Phase Contrast

By using *tapping* mode, phase contrast can be recorded, which is related to the different energy dissipation occurring at every pixel of the image. These data provide information about elasticity properties or the tip-sample adhesion at the nanoscale [16]. Phase contrasts found at the nanoscale between the biofilms analyzed evidenced structural dissimilarities, as shown in Figure 7.

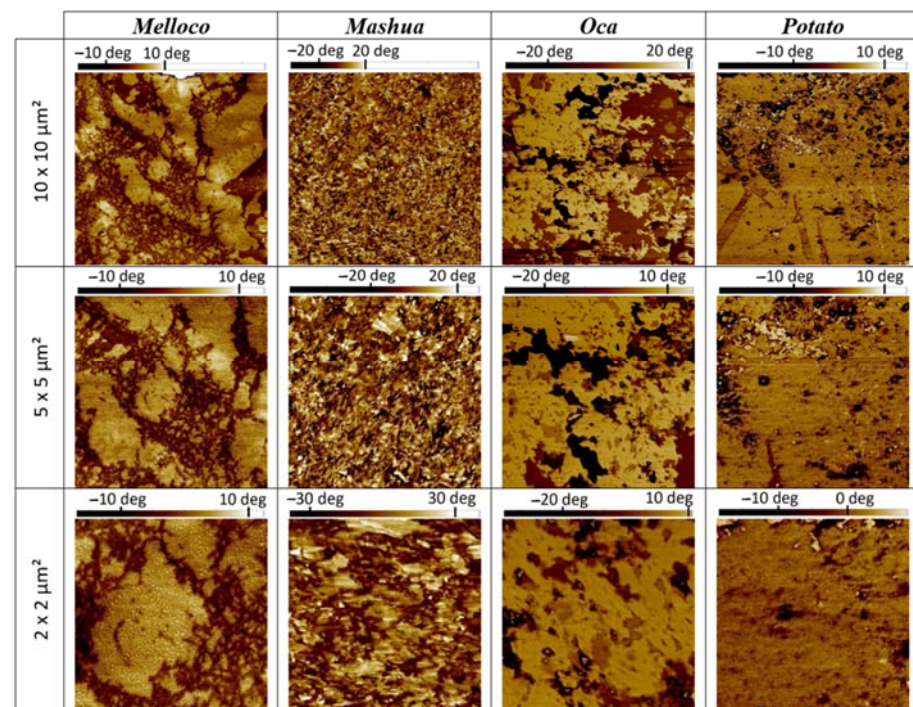


Figure 7. Phase contrast (*tapping* mode) images measured on films extracted from each Andean tuber analyzed at different spans.

Phase contrast segregation observed could be attributed to a polarity change at the interface. Higher polarity regions may enhance the adhesion of ambient water to the surface, triggering an extra tip-sample grip by the emergent meniscus. Hence, phase contrast segregation, forming clear micron order structures in these conditions, suggests a water-dissolving capacity. This is found in the films yielded from melloco, mashua, and oca tubers, but it is more significant in the case of melloco. This result correlates to the TSM data measured.

3.6. Sensorial Analysis

The sensorial evaluation of starch-based biofilms containing mouthwash is summarized in Figure 8.

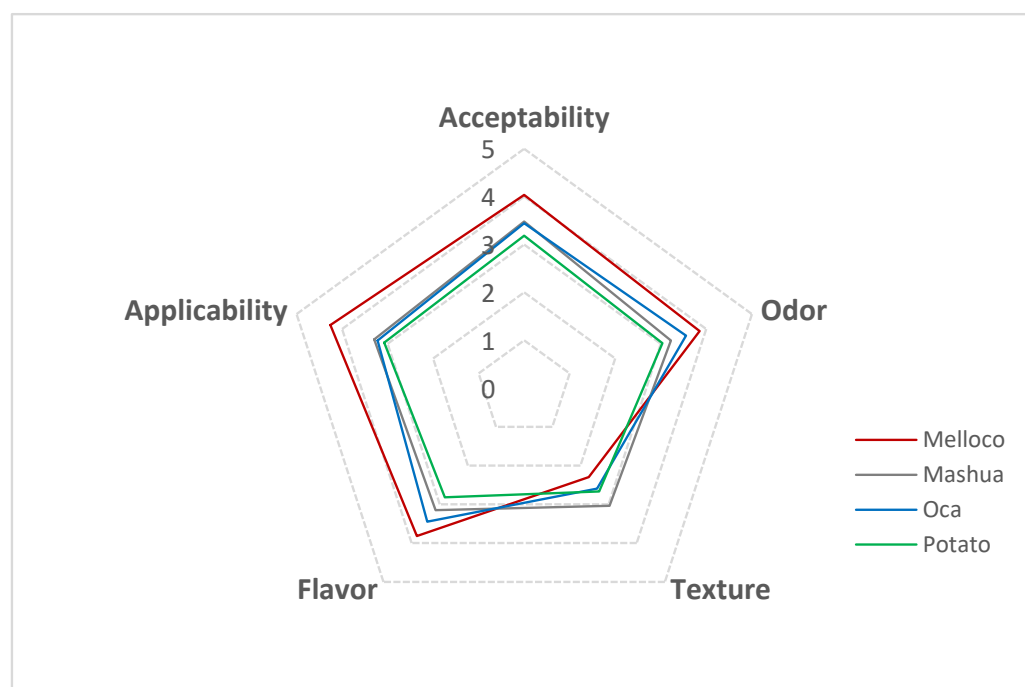


Figure 8. Sensorial evaluation of films extracted from each Andean tuber analyzed, blended with mouthwash.

Films obtained from melloco tuber were rated as “pleasant” in all the parameters analyzed (odor, taste, applicability, and acceptability), indicating that the panelists accepted this sort of film well. On the other hand, the biofilms extracted from mashua, oca, and potato were qualified as “neither pleasant nor unpleasant” in all parameters, reflecting similarities among them. Regarding the texture feature, blends obtained from mashua, oca, and potato were rated as “neither hard nor soft”, but the biofilms produced from melloco were assessed as “soft”.

Findings at the nanoscale indicate that the use of starch films extracted from melloco tuber might be appropriate to perform orally disintegrated blends. The combination of a granular but smooth surface to a micron-order phase contrast segregation suggests a moderately rigid sample in dry conditions with a propensity to be dissolved in water. Therefore, a matrix based on starch extracted from melloco can maintain its shape in dry conditions, but after being bitten, films can be dissolved completely. This feature is appealing for orally disintegrated blends. The sensorial analysis confirmed the hypothesis.

4. Conclusions

Starch-based biofilms have different properties depending on the source from which they were extracted. In this work, films developed from the Andean tubers melloco, mashua, oca, and potato are analyzed. Macroscopic properties such as optical contrast, colorimetry, opacity, moisture content, water activity, total soluble matter, water vapor permeability, infrared optical absorption, and elastic properties are compared. Nevertheless, significant differences are found at the nanoscale, both in topography and phase contrast. These differences correlate to the macroscopic data observed, shedding light on the understanding of the causes originating the variation observed.

We discovered that melloco blended films present with high solubility, low tensile strength, and significant surface phase contrast segregation. Furthermore, their topography at the nanoscale shows a granular but compact structure. Hence, we propose these starch-based films as a potential oral disintegrating starch matrix. We include mouthwash on layers extracted from each Andean tuber studied here and performed a sensorial analysis. As expected, melloco samples obtained the greatest acceptability.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym14194116/s1>, Figure S1: Visual appearance and apparent transparency of starch films with mouthwash extracted from each of the Andean tubers analyzed; Figure S2: Micrographs of starch films extracted from each of the Andean tubers analyzed after addition of mouthwash to each one, in reflection using white light transmission illumination; Figure S3: Atomic force microscopy topography 3D images of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ range; Figure S4: Atomic Force Microscopy topography 3D images of $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ range; Figure S5: Atomic Force Microscopy amplitude (lock-in, error signal) measured in *tapping* mode on the surface of biofilms extracted from the Andean tubers melloco, mashua, oca, and potato, at different scan areas.

Author Contributions: Conceptualization, M.A. and S.C.; methodology, I.T., M.A. and S.C.; formal analysis, C.P., J.D.I.V., I.T., M.A. and S.C.; investigation, C.P., J.D.I.V., I.T., M.A. and S.C.; writing—original draft preparation, C.P., J.D.I.V. and S.C.; writing—review and editing, C.P., J.D.I.V., I.T., M.A. and S.C.; and supervision, C.P., J.D.I.V., I.T., M.A. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available in a publicly accessible repository.

Acknowledgments: S.C., M.A., C.P., and J.D.I.V thank the Technical University of Ambato (UTA) and its “Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE)” Department for their support and equipment acquisition. I.T. acknowledges UTA and DIDE support in equipment acquisition and through the project “Antimicrobial activity of a biodegradable Yucca (*Manihot esculenta*) starch coating enriched with an essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill” (SFFCIAL05).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. De Souza, L.; Coelho, D.B.; Veggi, P.C.; Campelo, P.H.; De Moraes, M.A. Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds: Fundamentals and Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 2361.
2. Jimenez, A.; Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 2058–2076. [[CrossRef](#)]
3. Singh, G.P.; Bangar, S.P.; Yang, T.; Trif, M.; Kumar, V.; Kumar, D. Effect on the Properties of Edible Starch-Based Films by the Incorporation of Additives: A Review. *Polymers* **2022**, *14*, 1987. [[CrossRef](#)]
4. Wolff, I.A.; Davis, H.A.; Cluskey, J.E.; Gundrum, L.J.; Rist, C.E. Preparation of films from Amylose. *Ind. Eng. Chem.* **1951**, *43*, 915–919. [[CrossRef](#)]
5. Lourdin, D.; Valle, G.D.; Colonna, P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *27*, 261–270. [[CrossRef](#)]
6. Lourdin, D.; Coignard, L.; Bizot, H.; Colonna, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer* **1997**, *38*, 5401–5406. [[CrossRef](#)]
7. Wu, W.C.; Hsiao, P.Y.; Huang, Y.C. Effects of amylose content on starch-chitosan composite film and its application as a wound dressing. *J. Polym. Res.* **2019**, *26*, 137. [[CrossRef](#)]
8. Thakur, R.; Pristijono, P.; Scarlett, C.J.; Bowyer, M.; Singh, S.P.; Vuong, Q.V. Starch-based films: Major factors affecting their properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 1079–1089. [[CrossRef](#)]
9. Velásquez-Barreto, F.F.; Bello-Pérez, L.A.; Nuñez-Santiago, C.; Yee-Madeira, H.; Velezmoro Sánchez, C.E. Relationships among molecular, physicochemical and digestibility characteristics of Andean tuber starches. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *182*, 472–481. [[CrossRef](#)]
10. Homez, A.K.; Daza, L.D.; Solanilla, J.F.; Vaquiro, H.A. Effect of temperature, starch and plasticizer concentrations on color parameters of ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) edible films. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *437*, 012003. [[CrossRef](#)]
11. Zhu, F.; Cui, R. Comparison of physicochemical properties of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *148*, 601–607. [[CrossRef](#)]
12. Daza, L.D.; Homez-Jara, A.; Solanilla, J.F.; Vaquiro, H.A. Effects of temperature, starch concentration, and plasticizer concentration on the physical properties of ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas)-based edible films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 1834–1845. [[CrossRef](#)]
13. Pacheco, M.T.; Moreno, F.J.; Moreno, R.; Villamiel, M.; Hernandez-Hernandez, O. Morphological, technological and nutritional properties of flours and starches from mashua (*Tropaeolum tuberosum*) and melloco (*Ullucus tuberosus*) cultivated in Ecuador. *Food Chem.* **2019**, *301*, 125268. [[CrossRef](#)]

14. Salazar, D.; Arancibia, M.; Casado, S.; Viteri, A.; Lopez-Caballero, M.E.; Montero, M.P. Green Banana (*Musa acuminata* AAA) Wastes to Develop an Edible Film for Food Applications. *Polymers* **2021**, *13*, 3183. [[CrossRef](#)]
15. Kwasniewska, A.; Chocyk, D.; Gladyszewski, G.; Borc, J.; Swietlicki, M.; Gladyszewska, B. The Influence of Kaolin Clay on the Mechanical Properties and Structure of Thermoplastic Starch Films. *Polymers* **2020**, *12*, 73. [[CrossRef](#)]
16. Magonov, S.N.; Elings, V.; Whangbo, M.H. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surf. Sci.* **1997**, *375*, L385–L391. [[CrossRef](#)]
17. Casado, S.; Lobo, M.D.V.T.; Paino, C.L. Dynamics of plasma membrane surface related to the release of extracellular vesicles by mesenchymal stem cells in culture. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6767. [[CrossRef](#)]
18. Neeraj; Siddiqui, S.; Dalal, N.; Srivastva, A.; Pathera, A.K. Physicochemical, morphological, functional, and pasting properties of potato starch as a function of extraction methods. *Food Meas.* **2021**, *15*, 2805–2820. [[CrossRef](#)]
19. Sobral, P.; Menegalli, F.; Hubinger, M.; Roques, M. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 423–432. [[CrossRef](#)]
20. Orsuwan, A.; Sothornvit, R. Development and characterization of banana flour film incorporated with montmorillonite and banana starch nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *174*, 235–242. [[CrossRef](#)]
21. Sartori, T.; Menegalli, F.C. Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid. *Food Hydrocoll.* **2016**, *55*, 210–219. [[CrossRef](#)]
22. Nandi, S.; Guha, P. Modelling the effect of guar gum on physical, optical, barrier and mechanical properties of potato starch based composite film. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *200*, 498–507. [[CrossRef](#)]
23. Santacruz, S.; Rivadeneira, C.; Castro, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocoll.* **2015**, *49*, 89–94. [[CrossRef](#)]
24. Daza, L.D.; Eim, V.S.; Vaquiro, H.A. Influence of Ulluco Starch Concentration on the Physicochemical Properties of Starch-Chitosan Biocomposite Films. *Polymers* **2021**, *13*, 4232. [[CrossRef](#)]
25. Cazon, P.; Velazquez, G.; Ramirez, J.A.; Vazquez, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocoll.* **2017**, *68*, 136–148.
26. Tabatabaei, R.H.; Jafari, S.M.; Mirzaei, H.; Nafchi, A.M.; Dehnad, D. Preparation and characterization of nano-SiO₂ reinforced gelatin-k-carrageenan biocomposites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 1091–1099. [[CrossRef](#)]
27. Dai, L.; Zhang, J.; Cheng, F. Effects of starches from different botanical sources and modification methods on physicochemical properties of starch-based edible films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 897–905. [[CrossRef](#)]
28. Bergo, P.; Sobral, P.J.A.; Prison, J.M. Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. *J. Food Processing Preserv.* **2010**, *34*, 401–410. [[CrossRef](#)]
29. Clasen, S.H.; Müller, C.M.O.; Parize, A.L.; Pires, A.T.N. Synthesis and characterization of cassava starch with maleic acid derivatives by etherification reaction. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *180*, 348–353. [[CrossRef](#)]
30. Pereira, J.F.; Garcia Lonni, A.A.S.; Mali, S. Development of biopolymeric films with addition of vitamin C and catuaba extract as natural antioxidants. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *52*, 1–10. [[CrossRef](#)]
31. Wu, D.; Samanta, A.; Srivastava, R.K.; Hakkarainen, M. Starch-Derived Nanographene Oxide Paves the Way for Electrospinnable and Bioactive Starch Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1582–1591. [[CrossRef](#)]
32. Mehvar, G.F.; Han, J.H. Physical and Mechanical Properties of High-amylose Rice and Pea Starch Films as Affected by Relative Humidity and Plasticizer. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, E449–E454. [[CrossRef](#)]
33. Torres, F.G.; Troncoso, O.P.; Torres, C.; Díaz, D.A.; Amaya, E. Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 603–606. [[CrossRef](#)]
34. Gao, H.; Cai, J.; Han, W.; Huai, H.; Chen, Y.; Wei, C. Comparison of Starches Isolated from Three Different *Trapa* Species. *Food Hydrocoll.* **2014**, *37*, 174–181. [[CrossRef](#)]
35. Cruz-Tirado, J.P.; Siche, R.; Cabanillas, A.; Diaz-Sanchez, L.; Vejarano, R.; Tapia-Blacido, D.R. Properties of baked foams from oca (*Oxalis tuberosa*) starch reinforced with sugarcane bagasse and asparagus peel fiber. *Procedia Eng.* **2017**, *200*, 178–185. [[CrossRef](#)]
36. Otalora, M.C.; Wilches-Torres, A.; Gomez Castaño, J.A. Preparation and physicochemical properties of edible films from gelatin and Andean potato (*Solanum tuberosum* Group Phureja) starch. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2021**, *56*, 838–846. [[CrossRef](#)]