

ANÁLISIS REOLÓGICO Y MICROESTRUCTURAL DE ALMIDÓN DE MANDIOCA MODIFICADO CON ULTRASONIDO

Monroy Y.¹, Rivero, S.¹, García, MA.¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. CCT-CONICET La Plata - CICIPBA, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina.

e-mail: magarcia@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

La modificación del almidón por métodos no convencionales como el ultrasonido constituye una alternativa amigable con el medio ambiente que permite inducir cambios estructurales en el almidón. Así, el objetivo del presente trabajo fue modificar físicamente almidón de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante su tratamiento con ultrasonido, y estudiar el efecto sobre las propiedades estructurales y funcionales más relevantes que determinan su aplicación. A tal fin, suspensiones al 5% de almidón de mandioca se trataron con ultrasonido durante 20min a 40 y 60% de amplitud y 750W. El tratamiento se realizó en condiciones ambientales y en un baño con hielo, registrando en ambos casos la temperatura alcanzada. Los almidones (nativo y modificados) se caracterizaron mediante microscopía óptica, electrónica de barrido (SEM) y confocal. Se realizó la caracterización estructural mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X. Además se estudió el efecto en la gelatinización por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el comportamiento reológico de las pastas frescas y retrogradadas (96h - 4°C). Observaciones al microscopio óptico mostraron que inmediatamente después del tratamiento con ultrasonido los gránulos evidenciaron un mayor hinchamiento que los del almidón nativo. Se observó por SEM que el ultrasonido causó daño físico en la superficie de los gránulos, evidenciado por un aumento de su rugosidad superficial. Las micrografías revelaron que el almidón de mandioca nativo presenta una distribución de tamaño de gránulos bimodal centrada en 6,3 y 11,9µm. El tratamiento afectó esta distribución, siendo los gránulos más pequeños los más susceptibles. Por DSC se observaron diferencias en la entalpía de gelatinización del almidón de las muestras tratadas. Los cambios observados en la región 1075-1020cm⁻¹ de los espectros FTIR indicaron que el tratamiento modificó la cristalinidad de los almidones modificados. En el mismo sentido, los difractogramas obtenidos reflejaron las modificaciones estructurales inducidas por el tratamiento, correlacionando con las observaciones por SEM. Las pastas presentaron un comportamiento pseudoplástico tixotrópico ajustando satisfactoriamente los datos experimentales con el modelo de Ostwald de Waele. Los espectros dinámicos mostraron las características viscoelásticas del sistema. Las pastas de los almidones modificados resultaron más estables ya que en condiciones de refrigeración a las 96h los valores de G' aumentaron 27% y 106% para el almidón tratado con ultrasonido durante 20min a 40% de amplitud y el nativo respectivamente. Esta tecnología simple y eco-compatible indujo cambios estructurales del almidón permitiendo obtener derivados que podrían utilizarse como ingredientes en formulaciones alimentarias donde la estabilidad de los productos obtenidos sea una característica relevante.

Palabras clave: ultrasonido, análisis microestructural, reología, almidones modificados

1. Introducción

El ultrasonido es un tratamiento no convencional que implica ondas mecánicas con frecuencias que superan el umbral del oído humano (más de 16 kHz), se caracteriza por su versatilidad y rentabilidad para la industria alimentaria (Awad et al, 2012). En los últimos años hay un creciente interés en el uso del ultrasonido de potencia y alta frecuencia tanto en el área de alimentos como en otros campos. Es una de las tecnologías emergentes que se han desarrollado para reducir al mínimo tiempos de procesamiento, maximizar la calidad y garantizar la seguridad de los productos alimenticios. Asimismo, Kardos y Luche (2001) relacionan al ultrasonido con el concepto de “*química verde y tecnología*” al ser una aplicación amigable con el medio ambiente. En el área de alimentos y biomateriales, el almidón, polímero presente en diversos cereales y tubérculos como la mandioca, es uno de los hidrocoloides más utilizados por su disponibilidad, costo y funcionalidad. La modificación de su estructura nativa por métodos químicos, físicos y enzimáticos, da origen a numerosos derivados que generalmente muestran mejor claridad de sus pastas, menor tendencia a la retrogradación y aumento en la estabilidad frente a la congelación-descongelación (López et al. 2011). A fin de ampliar el espectro de aplicaciones de este polímero, la modificación por un método físico no convencional como el ultrasonido constituye una alternativa amigable con el medio ambiente permitiendo mejorar las propiedades funcionales del mismo. El objetivo del presente trabajo fue modificar físicamente almidón de mandioca (*Manihot esculenta*) mediante su tratamiento con ultrasonido, y estudiar el efecto sobre las propiedades estructurales y funcionales más relevantes que determinan su aplicación.

2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención de almidones modificados

Se prepararon suspensiones al 5% (p/v) de almidón de mandioca, *Manihot esculenta*, (Montecarlo, Misiones, Argentina) las que se trataron con ultrasonido a una potencia de 750 W a 40% y 60% de amplitud durante 20 min con y sin baño de refrigeración (agua y hielo), empleando un equipo ultrasónico Sonics VCX-750 (Vibra Cell, USA). Los almidones modificados se secaron en estufa a 40°C. En la **Tabla 1** se indican las condiciones de procesamiento y la nomenclatura utilizada en cada caso.

2.2 Análisis microestructural de los almidones por SEM y CLSM

Se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM) la morfología de los gránulos de almidones nativo y modificados empleando un microscopio electrónico Quanta200 (Japón). Se analizó la distribución de tamaño empleando el programa ImageJ, (National Health Institute, USA). Además, los gránulos se analizaron por microscopía confocal láser de barrido (CLSM) en un equipo LEICA TCS SP5 (Mannheim, Alemania). Para la observación de las suspensiones de almidón al 0,5% (p/v) se usó el marcador isotiocianato de fluoresceína, según Deladino et al. (2017).

2.3 ATR-FTIR

Los espectros ATR-FTIR de las muestras se obtuvieron en un espectrofotómetro de IR (Nicolet, iS 10 ThermoScientific, Madison, USA) con accesorio de cristal de diamante que permitió la obtención de espectros ATR (Reflectancia Total Atenuada).

2.4 Difracción de rayos X

Se utilizó un difractómetro X'Per Pro PAnalyticalModel PW 3040/60 (Almelo, Holanda). Los difractogramas se obtuvieron en el rango de $2\theta = 3-60^\circ$ y el grado de cristalinidad % (GC) se determinó según López et al. (2011).

2.5 Análisis térmico

Las suspensiones de almidón al 20% p/p se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo Q100 (TA Instruments, USA). Los termogramas se registraron a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ en el rango de $10-120^\circ\text{C}$, (López et al., 2011).

2.6 Caracterización reológica

Suspensiones de almidón nativo y modificado (5% p/v) se gelatinizaron 20min a 90°C y se enfriaron hasta alcanzar temperatura ambiente. El comportamiento reológico de las pastas se analizó en un reómetro Rheo Stress 600 ThermoHaake (Haake, Alemania) utilizando un sensor plato-plato (PP35) mediante ensayos rotacionales y dinámicos. Además, se estudió el almacenamiento en condiciones refrigeradas (96 h a 4°C) para evaluar la retrogradación de las pastas de almidón nativo y modificado.

2.7 Análisis estadístico

Se realizaron análisis multifactoriales de varianza mediante el uso del software (InfoStat 2012). Las diferencias se determinaron mediante el test de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) usando un nivel de significación $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

Debido a que el ultrasonido promueve la generación de energía calórica, mecánica y cavitación (Delgado, 2011), se observó un incremento de temperatura de la

suspensión (**Tabla 1**). Luego de 20 min de tratamiento la temperatura final del proceso fue de 60°C ocasionando la gelatinización parcial para el tratamiento con 40% de amplitud y total para las muestras tratadas con 60% amplitud sin baño de hielo.

Tabla 1. Nomenclatura, temperaturas alcanzadas bajo diferentes condiciones de tratamiento y análisis térmico de de almidón de mandioca nativo y modificados físicamente

Muestra/ (Nomenclatura)	Temperatura del proceso (°C)		Análisis térmico (DSC)		
	Inicial	Final	T _o °C)	T _p °C)	ΔH (J/g, base seca)
Nativo (N)			56,8 (0,9) ^a	64,6 (0,6) ^a	15,46 (0,05) ^c
40% sin baño (U40%)	22	60	57,9 (0,1) ^b	64,5 (0,6) ^a	14,18 (0,01) ^a
40% con baño (UB40%)	22	37	56,9 (0,9) ^{ab}	64,4 (1,4) ^a	14,64 (0,26) ^b
60% sin baño (U60%)	22	65	nd	nd	nd
60% con baño (UB60%)	22	24	56,6 (0,1) ^a	64,1 (0,04) ^a	14,88 (0,13) ^b

* Se indican los valores medios obtenidos y las desviaciones estándar entre paréntesis. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05); nd: no detectado.

3.1 Análisis microestructural

La **Figura 1** muestra las micrografías obtenidas por SEM de los gránulos de almidón de mandioca nativo y modificado junto con los histogramas de distribución de tamaño asociados. Con respecto a la morfología se observó que los gránulos estudiados resultaron ser redondos, ovalados-truncados u ovalados. Además, los gránulos nativos evidenciaron superficies lisas y sin grietas. La modificación física no generó cambios en la forma característica del gránulo, pero se detectó un aumento de la rugosidad superficial, la cual se intensificó con el aumento de la amplitud del tratamiento. Los gránulos de almidón de mandioca nativo presentaron una distribución de tamaño bimodal con dos grupos diferenciados centrados en 6,3 y 11,9 μm.

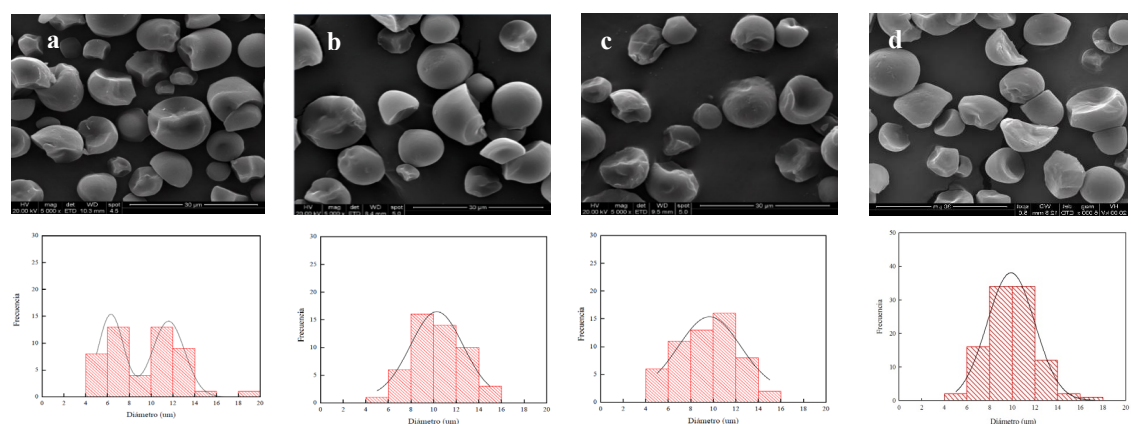


Figura 1. Micrografías de gránulos de almidón de mandioca: nativo (a), tratados con ultrasonido: U40% (b), UB40% (c) y UB60% (d).

Como puede visualizarse en los histogramas insertos en la **Figura 1**, el tratamiento afectó la distribución de tamaños, siendo los gránulos más pequeños los más susceptibles. Así, para la condición más drástica (U40%) la distribución obtenida fue monomodal con un diámetro medio de $10,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$.

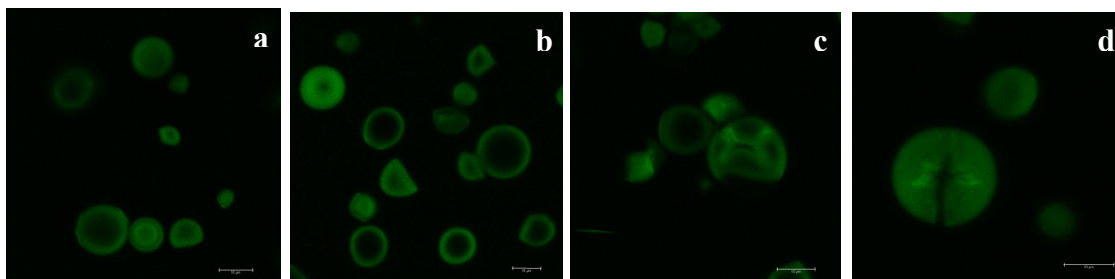


Figura 2. Micrografías obtenidas por CLSM de gránulos de almidón de mandioca nativo (a), tratados con ultrasonido: U40% (b), UB40% (c) y UB60% (d).

El análisis por CLMS permitió la visualización de estructuras internas del gránulo, así como la presencia de cavidades y grietas en su estructura. Se observó que la superficie de los gránulos del almidón nativo no presentó daños (**Figura 2a**). El ultrasonido provocó alteraciones físicas; al incrementar la intensidad del tratamiento se formaron grietas, canales que se profundizaron desde el centro del gránulo (**Figura 2d**).

La suspensión de almidón de mandioca evidenció una amplia transición endotérmica asociada a la gelatinización en el rango de temperaturas de 56 a 84°C en coincidencia con lo informado por otros autores (López et al. 2011) (**Tabla 1**). Como era de esperar los almidones tratados en la condición más drástica (U60%) no presentaron transición térmica, confirmando la gelatinización completa del almidón durante el procesamiento. Para las otras condiciones estudiadas los termogramas presentaron las endotermas típicas de gelatinización, sin variación en la temperatura de pico, observándose una disminución de la entalpía asociada respecto al nativo. Se ha propuesto que el tratamiento con ultrasonido causa una perturbación estructural en las regiones cristalinas de los gránulos precedida por la hidratación reversible de las zonas amorfas (Jambrak et al., 2010).

El espectro FTIR-ATR del almidón de mandioca nativo presentó bandas asociadas al estiramiento, flexión y deformación correspondientes a los principales grupos funcionales característicos del polímero (**Figura 3a**). La banda ancha que aparece a 3260 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos -OH de la amilosa y amilopectina que forman parte de la estructura del almidón. Por otra parte, se

observaron bandas localizadas a 2900 y 2860 cm^{-1} correspondiente a la vibración de los enlaces C-H y una banda situada a 1153 cm^{-1} asignada a la flexión de los enlaces C-O de los grupos hidroxilos. Con el tratamiento de ultrasonido se observó la desaparición del pico a 2860 cm^{-1} y la modificación de las bandas características localizados en la región comprendida entre 1075-1020 cm^{-1} . Con el aumento de la amplitud del tratamiento se intensificó el pico de 920 cm^{-1} correspondiente a los enlaces C-O-C de glucosa y se atenuó el pico a 1047 cm^{-1} , este último pico se ha asociado a la fase cristalina del almidón y concuerda con la disminución en la entalpía de gelatinización de las suspensiones observada por DSC.

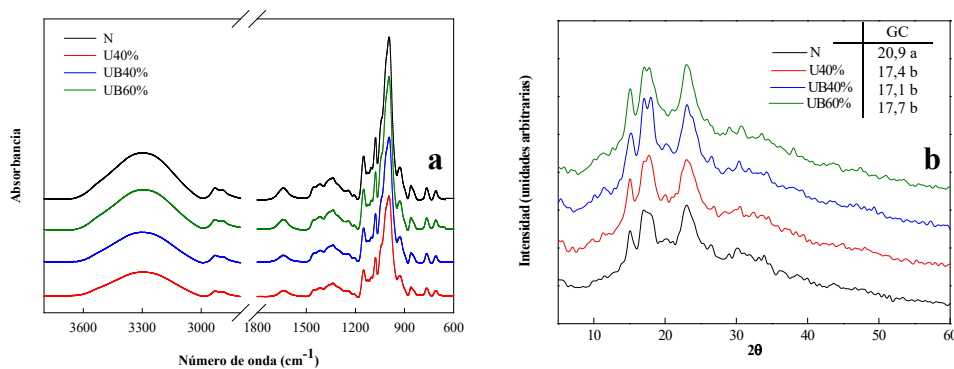


Figura 3. Análisis espectroscópico mediante: (a) FTIR-ATR (b) difracción de rayos X y grado de cristalinidad (%) para almidón nativo y modificados.

La **Figura 3b** muestra los patrones de difracción de rayos X del almidón nativo y de los tratados con ultrasonido a distintas amplitudes con y sin baño de hielo. El patrón de evolución y las intensidades de los picos en aproximadamente $2\theta = 15, 17, 18, 20, 23$ y 30° indicaron que el almidón de mandioca nativo presentó un patrón tipo C y que el mismo no se modificó con el tratamiento. El patrón C es típico de almidones de legumbres y de almidones de frutas y tubérculos tropicales. En la Tabla inserta en la **Figura 3b** se presentan los GC de las muestras. En general se observó que el tratamiento disminuyó el GC de las muestras. Así, los resultados de rayos X se correlacionan con los obtenidos por FTIR-ATR y por DSC.

Comportamiento reológico

Las pastas de los almidones presentaron un comportamiento pseudoplástico tixotrópico ajustando satisfactoriamente los datos experimentales con el modelo de Ostwald de Waele (**Tabla 3**). Sin embargo luego del tratamiento en la condición más

drástica (U 60%) presentaron un comportamiento newtoniano indicando la destrucción de la estructura granular y la despolimerización de los componentes.

Tabla 3. Parámetros reológicos estimados con el modelo de Ostwald de Waele para el almidón nativo y los tratados

Muestra	Viscosidad a 500s ⁻¹ (mPa s)	Tixotropía (Pa s ⁻¹)	Modelo de Ostwald de Waele		
			K (Pa s ⁻ⁿ)	n	r ²
N	412,61 (12,18) ^a	24265 (841) ^a	5,71 (0,05)	0,566 (0,003)	0,9986
U40%	439,10 (5,19) ^a	25115 (1209) ^a	6,61 (0,02)	0,557 (0,008)	0,9989
UB40%	539,12 (17,57) ^b	30330 (3253) ^b	7,00 (0,01)	0,578 (0,005)	0,9990
UB60%	406,48 (15,59) ^a	22040 (282,84) ^a	6,39 (0,15)	0,546 (0,002)	0,9986

*Se indican los valores medios obtenidos y las desviaciones estándar entre paréntesis

La **Figura 4** muestra los espectros mecánicos correspondientes a los almidones nativo y tratados con ultrasonido. Para todas las condiciones ensayadas el módulo elástico (G') fue mayor que el viscoso (G'') en todo el rango de frecuencias analizado, presentando ambos una ligera dependencia con la frecuencia a lo largo del ensayo, lo que indicaría el desarrollo de una estructura tipo gel. Se evidenciaron mayores valores de G' para la condición más drástica asociado a una mayor fuerza del gel. Este comportamiento podría atribuirse a la despolimerización ocasionada por el tratamiento y la consecuente asociación de las cadenas poliméricas para formar esta red viscoelástica. Como se mencionó, el ultrasonido causa la degradación de las cadenas poliméricas de almidón y la desramificación de la amilopectina, lo que facilitaría el proceso de gelación y posterior retrogradación (Hu et al. 2013).

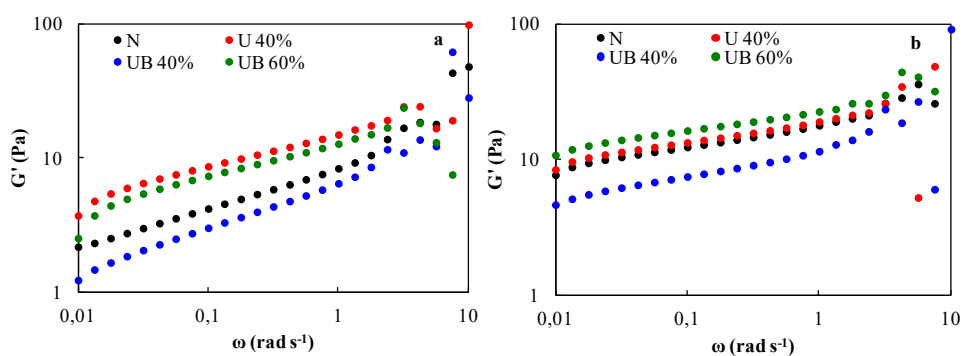


Figura 5. Espectros mecánicos (módulo elástico (G') en función de la frecuencia) para: muestras frescas (a) y retrogradadas a 4°C durante 96h (b).

Las pastas de los almidones modificados resultaron más estables ya que en condiciones de refrigeración a las 96h los valores de G' aumentaron 27% y 106% para el almidón tratado con ultrasonido durante 20min a 40% de amplitud y el nativo respectivamente.

4. Conclusión

El tratamiento del almidón con ultrasonido generó cambios microestructurales evidenciados principalmente en las características morfológicas de los gránulos y en su grado de cristalinidad. Estas modificaciones fueron corroboradas por ATR-FTIR y estudios por SEM y CSLM. La selección de las condiciones de procesamiento es crítica ya que con la máxima amplitud ensayada y sin control de la temperatura (U 60%) se produjo la gelatinización completa del almidón. Los resultados del presente estudio permitieron la obtención de almidón modificado por vía física cuyo procedimiento de obtención podría ser fácilmente adaptado para aplicaciones específicas basadas en el ajuste apropiado de las condiciones de tratamiento con ultrasonido. Esta tecnología simple y eco-compatible indujo cambios estructurales del almidón permitiendo obtener derivados que podrían utilizarse como ingredientes en formulaciones alimentarias donde la estabilidad de los productos obtenidos sea una característica relevante.

5. Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el marco de los proyectos: PICT 2011-1213 y 2015-0921 (ANPCyT, Argentina) y del Proyecto de Vinculación Tecnológica PVT.

6. Bibliografía

- Awad T. S., Moharram H. A., Shaltout O. E., Asker D., Youssef M. M. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48: 410-427.
- Deladino L., Teixeira A. S., Plou F. J., Navarro, A. S. y Molina-García A. D. 2017. Effect of High Hydrostatic Pressure, alkaline and combined treatments on corn starch granules metal binding: Structure, swelling behavior and thermal properties assessment. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 241-249.
- Delgado J. D. 2011. Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. *Revista especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6: 141-152.
- Geng Z.; Zongdao C. y Yimin W. 2007. Physicochemical properties of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and kudzu (*Pueraria hirsute* matsum.) starches, *International Journal of Food Science and Technology*, 2(12):1449-1455.
- Hu, A., Lu, J., Zheng, J., Sun, J., Yang, L., Zhang, X., Zhang, Y. y Lin, Q. 2013. Ultrasonically aided enzymatical effects on the properties and structure of mung bean starch. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 20: 146-151.
- Jambrak A. R., Herceg, Z., Subaric, D., Babic, J., Brncic, M., Brncic, S. R., et al. 2010. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 79: 91-100.
- Kardos N. y Luche J. L. 2001. Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Research*, 332: 115-131.
- López O., Zaritzky N., García M. A. 2011. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100 (1), 160-168.
- Sujka M. y Jamroz J. 2013. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocolloids*, 31: 413-419.