



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA DE MATERIALES CENTRO DE FISICA  
APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA

**“EFECTO DEL AGUA EN EL PROCESO DE RECRISTALIZACIÓN EN  
NANOCRISTALES ORTORRÓMBICOS Y HEXAGONALES PRESENTES EN EL  
ALMIDÓN”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA E  
INGENIERIA DE MATERIALES

**PRESENTA:**

ING. MARIA CAMILA POSADA VÉLEZ

**TUTOR:**

BEATRIZ MARCELA MILLÁN MALO  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**COMITÉ TUTOR:**

DR. MARIO ENRIQUE RODRÍGUEZ GARCÍA  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
DR. JOSÉ DE JESÚS PEREZ BUENO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN  
ELECTROQUÍMICA.

JURIQUILLA, QUERÉTARO, SEPTIEMBRE DE 2022

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# *Agradecimientos*

Agradezco en mi primera instancia a mis padres y hermanos quienes fueron mi apoyo e impulso para culminar mis estudios de posgrado y a México por ser un país de puertas abiertas, así como lleno de grandes oportunidades.

Doy las gracias al Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada CFTA, a mi comité tutor por el acompañamiento durante la realización de esta Tesis de Maestría.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio e impulsarme a seguirme formando como profesional, a la Dr. Beatriz Millán Malo por transmitirme sus conocimientos en cristalografía lo cual fue fundamental para los análisis de este trabajo y a cada uno de los técnicos académicos que facilitaron la caracterización de los materiales analizados en particular al M. en C. Manuel Aguilar Franco de Microscopía Electrónica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por su apoyo económico durante este proceso.

Al PAEP por financiar a la asistencia a congresos, escuelas de verano y salidas de campo.

Al grupo de Investigación en alimentos por su colaboración.

# *Contenido*

<b>1. Introducción</b> .....	9
<b>2. La Estructura cristalina en el almidón</b> .....	13
2.1 Estructura cristalina hexagonal y ortorrómbica .....	21
2.2 Cristalización y Re-cristalinización de la estructura cristalina del almidón. ....	23
2.3 Retrogradación o Cristalización del almidón .....	25
2.4 Recristalización .....	26
2.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) .....	27
2.6 Difracción de Rayos X (DRX) .....	28
2.7 Microscopia Electrónica de transmisión (MET) .....	30
2.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	32
<b>3. Metodología</b> .....	33
3.1 Preparación de la muestra .....	33
3.2 Análisis morfológico (MEB) .....	34
3.3 Análisis estructural (DRX) .....	34
3.5 Análisis cristalino (TEM) .....	35
<b>4. Análisis de resultados</b> .....	37
4.1 Análisis morfológico de los almidones.....	37
4.2 Análisis del patrón de difracción de rayos-X.....	39
4.3 Efecto del agua en los patrones de difracción de rayos X de los almidones aislados húmedos y secos .....	41
4.4 Análisis termogravimétrico.....	47
4.5 Análisis de los nanocristales aislados de almidón tipo-B .....	49
4.6 Parámetros cristalinos .....	52
<b>5. Conclusiones</b> .....	54
<b>6. Referencias</b> .....	56

# *Lista de Figuras*

2.1. Representación esquemática de la estructura de la amilosa y la amilopectina. . . . .	10
2.2 Redes de Bravais para estructuras cristalinas en la naturaleza. . . . .	13
2.3 Estructuras cristalinas (a) Hexagonal y (b) Ortorrómica. . . . .	17
2.4 Componentes que influyen en el proceso de retrogradación del almidón. . . . .	20
2.5 Esquema representativo de un microscopio electrónico de barrido. . . . .	23
2.6 Identificación del scattering elástico e inelástico, región amorfa e identificación del área bajo la curva de un patrón de difracción de rayos X de almidón de maíz rico en amilopectina . . . . .	26
<b>2.7</b> Microscopio electrónico a) esquema de iluminación en STEM y MET, b) formación de imágenes en MET (contraste de fase) y STEM (contraste Z), c) esquema de iluminación en MEB y STEM incluyendo correctores de aberración. . . . .	27
3.1 Proceso para la humectación del almidón de A-Ar, A-Pa y A-Ag. . . . .	31
3.2 Proceso de humectación del almidón para realizar las mediciones en el difractor de rayos X. . . . .	32
3.3 Proceso de aislamiento de los nanocristales de almidón. . . . .	33
4.1 Micrografías MEB de (a) A-Ar a 1.000×, (b) A-Ar a 2.500×, (c) A-Pa a 300×, (d) A-Pa 1.000×, (e) A-Ag a 1.000×, (f) A-Ag a 3.500×, (g) anchura del A-Ar, (h) longitud del A-Ar , (i) anchura del A-Pa, (j) Longitud del A-Pa, (k) Anchura del A-Ag, y (l) Longitud del A-Ag de la distribución de tamaños. . . . .	35
4.2 (a) Muestra el patrón de rayos X del ASAr, y (b) corresponde al patrón de rayos X del almidón seco aislado de ASAg. . . . .	37
4.3 (a) [001] vista de la estructura ortorrómica centrada en el cuerpo; (b) patrón de difracción de rayos X de ASAr, AHAr-I y AHAr-II aislados, (c) Acercamiento del ASAr desde 5 a 20 grados en $2\theta$ en el patrón de difracción de rayos-X, en los almidones húmedos I y II se marcan los índices de Miller (121), (031) y (211). . . . .	39
4.4 (a) [001] vista de la estructura hexagonal. (b) Patrones de difracción de rayos X de ASPa, AHPa-I, AHPa-II y (d) AAHAg-II, AHAg-I, y ASAg. . . . .	42
4.5 Termogramas DSC de almidones de arroz (a), papa (b) y aguacate (c) aislados durante 0 h y 24 h después de la preparación. . . . .	46

4.6 Micrografías TEM de los Np-Aais preparados por hidrolisis acida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (a-f), (b-d-f) acercamiento y ampliación de los planos cristalinos de (a), (c) y (d) respectivamente. .	48
4.7 Proceso de formación de los Np-Aais a partir de la hidrolisis acida de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	.49
4.8 Porcentaje de cristalinidad de la estructura cristalina (a) hexagonal y (b) ortorrómbica. . .	. . . . .51

# *Lista de Tablas*

3.1 Comparación entre el almidón seco teórico y los picos experimentales de AHAr-I y AHAr-II. ....	41
3.2 Comparación entre el almidón seco teórico y los picos experimentales de AHAg-I y AHAg-II. ....	45
3.3 Indexación de las distancias interplanares de la muestra de Np-Aais. ....	50



# *Resumen*

Este trabajo utiliza la técnica de difracción de rayos X y el calorímetro diferencial de barrido (DSC) para estudiar la influencia de las moléculas de agua libres y unidas en las estructuras cristalinas presentes en los almidones. Se estudiaron almidones de arroz (tipo A), papa (tipo B) y aguacate (tipo C). Se aislaron almidones de arroz (A-Ar) y de papa (A-Pa) después de un proceso de secado. Se analizó el almidón de aguacate (A-Ag) rehumidificado y aislado antes del secado. El almidón de aguacate húmedo exhibe el patrón de rayos X más definido debido a su enlace de agua casi completo en las estructuras cristalinas hexagonales y ortorrómbicas, y los almidones de arroz húmedo (AHAr) y papa (AHPa) exhiben el mismo comportamiento para una estructura ortorrómbica y hexagonal, respectivamente. El proceso de secado reduce el número de moléculas de agua por plano, afectando a los factores de forma y estructura, resultando en la pérdida de calidad de cristalinidad de los picos difractados. DSC demuestra que la gelatinización es un proceso térmico irreversible caracterizado por la solvatación de nanocristales

# Capítulo 1

## Introducción

En esta tesis se ha estudiado el almidón por diferentes técnicas de caracterización, se entiende de los resultados de estas caracterizaciones que el almidón es una compleja micropartícula compuesta principalmente por amilosa y amilopectina, acompañados por agua, lípidos, fosfolípidos, fibras solubles e insolubles y algunos minerales [1]. La espectroscopia de absorción atómica y el plasma acoplado inductivo, entre otras técnicas han reportado la presencia de algunos componentes elementales en el almidón como el Ca, K, P, S, Al, Mg, Na y B [2] [3]. Sin embargo, está establecido que los dos componentes principales son la amilosa y la amilopectina, son polisacáridos formados por  $\alpha$ -condensación de unidades de D-glucosa. El almidón aislado es el proceso de extracción del almidón de una fuente botánica.

El almidón aislado se define como el resultado de un proceso físico-químico en el que se separa de la fuente nativa (arroz, aguacate, amaranto, entre otros). Después del aislamiento es bien sabido que el almidón se seca hasta que la humedad oscila entre el 4 y 12%. Este tratamiento puede eliminar agua ligada y libre. Desde el punto de vista físico-químico, el proceso modifica algunos componentes del almidón. La capacidad de los gránulos para absorber agua y dispersarse en un medio acuoso depende en gran medida del contenido de agua. El comportamiento del almidón en ambientes acuosos esta influenciado por las interacciones con sales, azúcares, polisacáridos, proteínas y lípidos.

Dos factores principales pueden influir en las interacciones almidón-agua: en primer lugar, los enlaces intermoleculares entre el agua y los componentes añadidos, lo que reduce la cantidad de agua disponible en el medio; en segundo lugar, las reacciones promotoras entre estos aditivos y los componentes del almidón, que pueden limitar o minimizar las interacciones agua/almidón. Esta interacción influye fuertemente en las aplicaciones

industriales ya que los cambios fisicoquímicos determinan la calidad de los alimentos y los comportamientos influenciados en el almidón.

Es bien sabido que el proceso de absorción de agua del almidón ocurre muy rápido en presencia de calor; en este sentido, el principal evento térmico se llama gelatinización, se puede definir como un evento térmico que involucra un proceso desordenado [3]. Estudios recientes con el almidón de plátano mostraron que la transición a la gelatinización estaba formada por dos aportes térmicos. Es decir, esta transición térmica se asocia directamente con la solvatación de las estructuras nanocristalinas ortorrómbicas (tipo A) y hexagonales (tipo B) [2].

La absorción prolongada y su efecto sobre las propiedades térmicas nunca fueron estudiados, lo que impacta fuertemente a la industria alimentaria porque la producción de alimentos se basa en el proceso de absorción del almidón [4]. Los termogramas evidenciados en la calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran como las temperaturas de transición y la entalpía se alteran debido a la ruptura de los cristales.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA) son técnicas para determinar la transición endotérmica y exotérmica en función de la temperatura, y el peso perdido en función del tiempo en un sistema biopolímero, respectivamente [5] [6] [7]. Ambas técnicas se complementan; mientras que DSC mide la energía requerida para una transformación en función de la temperatura, esto se puede evidenciar en los termogramas que resultan de las de las temperaturas de transición y el cambio de entalpía debido a la fusión de los cristales [8]. TGA mide la pérdida de masa bajo el mismo principio. Sin embargo, cabe resaltar que no hay un conocimiento claro a cerca de que componente del almidón sufre estas transiciones. Recientemente Vega-Rojas [1] asocio la transición endotérmica con la solvatación de la estructura cristalina de almidones de tipo-A y de almidones de tipo-B.

Estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) demuestran que los almidones hidrolizados (tipo A y B) con formas redondas u ovaladas con diámetros que van de 40 a 70 nm. Estos hallazgos confirman la presencia de nanocristales en el almidón. Las estructuras cristalinas presentes en el almidón pueden ser ortorrómbicas (almidón de tipo A) y hexagonales (tipo B). Cuando se presentan las estructuras hexagonales y ortorrómbicas en el almidón se clasifica como tipo C. Esto no es una nueva estructura cristalina, significa que el almidón posee ambas estructuras nanocristalinas, como es el caso del almidón de aguacate [9].

Cada estructura cristalina del almidón posee un número único de moléculas de agua en condición de estado estacionario, 4 y 36 moléculas de agua se reportan en las estructuras ortorrómbicas y hexagonales, respectivamente [2]. Aun así, el proceso de secado podría eliminar una fracción de las moléculas de agua, modificando algunos parámetros en la estructura, como las distancias interplanares y el tamaño del cristal. La mayoría de las caracterizaciones fisicoquímicas en almidón se realizan en seco y se estudian después de su interacción con el agua y el calor. Sin embargo, durante el proceso de humectación del

almidón, es posible que el agua se pueda incorporar en la red. Este hecho puede cambiar las propiedades estructurales, reológicas, térmicas, entre otras.

La difracción de rayos X, permite conocer la estructura cristalina de las estructuras ortorrómbicas y hexagonales. Cuando los cristales del almidón tienen el número total de moléculas de agua su patrón de difracción está más definido, esto sin pasar por un proceso de secado donde se pierde agua ligada o libre, presentando modificaciones en los patrones de rayos X. Los almidones están por formados por la contribución simultánea de fases cristalinas y amorfas esto se evidencia en un patrón de difracción. Algunos trabajos indican que las macromoléculas de amilosa y amilopectina cristalizan [10], y otros artículos indican que el cristal está formado por unidades de glucano [11]. Esta teoría se ha confirmado mediante estudios de la transformación estructural que ocurre durante un proceso de germinación. Después de 5 días de germinación, las macromoléculas de amilosa y la amilopectina se hidrolizan, y la estructura cristalina no presenta cambios [12] [13]. Estos trabajos indican que la región amorfa de los patrones de difracción corresponde a fracciones de la amilosa y la amilopectina. Demostró que después de la germinación del trigo y la malta, el ataque enzimático actúa sobre la amilosa y la amilopectina, y la fracción cristalina no sufre ninguna transformación, lo que indica que las regiones cristalinas de almidón están formadas por cristales de glucosa [12]. El efecto en las propiedades estructurales del almidón de sorgo durante el proceso de malteo evidenció que la estructura cristalina ortorrómbica no presenta ningún cambio. Fracciones simultáneas de amilosa y amilopectina (contribución amorfa) ocurre durante la preparación del mosto, y las solvataciones de cristales ortorrómbicos durante el calentamiento en un disolvente (agua), da como resultado la reducción de azúcares que ayudan en el proceso de la fermentación. Todos los componentes del almidón juegan un papel importante en la interacción almidón/agua. La amilosa, lípidos y la amilopectina que evita o promueve la absorción de agua [14].

Este trabajo tiene como objetivo analizar la inclusión de agua en los patrones de difracción de rayos X de almidones de aguacate y arroz de muestras húmedas a secas y de secas a húmedas, respectivamente. El efecto del agua en las estructuras nanocristalinas ortorrómbicas y hexagonales presentes en el almidón se estudió mediante difracción de rayos X de alta resolución.

# Objetivos

## Objetivo General.

Estudiar el efecto del tiempo de interacción del almidón con el agua, el cual da como resultado el proceso de recristalización u ordenamiento para el análisis de la formación de nanocristales a partir de glucosa.

## Objetivos Específicos.

- Desarrollar un método para la extracción de almidón aislado con estructuras ortorrómbicas (arroz) (tipo A), hexagonales (papa) (tipo B) y tipo C (aguacate).
- Presentar un método para aislar nanocristales de almidón con estructura hexagonal (papa y aguacate) (tipo B y tipo C).
- Caracterizar el almidón aislado para estructuras cristalinas ortorrómbicos (arroz), hexagonales (papa) y aguacate (tipo C) mediante Difracción de Rayos X a diferentes periodos de almacenamiento en condiciones de baja temperatura para determinar su estructura cristalina por efecto de recristalización y por métodos químicos, respectivamente, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) estudiar los nanocristales de almidón.
- Realizar un estudio por refinamiento Rietveld para un ajuste teórico de los parámetros estructurales del almidón ortorrómbico y hexagonal.

# Capítulo 2

## La Estructura cristalina en el almidón

La importancia del almidón para los seres humanos se remonta a la era paleolítica, cuando era probable que los alimentos con almidón provenientes de raíces y tubérculos hubiesen tenido un papel significativo en la evolución de los humanos modernos a partir de los antepasados de los primeros homínidos [15]. Se define el almidón como el principal carbohidrato de almacenamiento de las plantas y un biopolímero de considerable importancia para los seres humanos. Es un microconstituyente de muchos de alimentos y la principal fuente energía en la dieta humana [16].

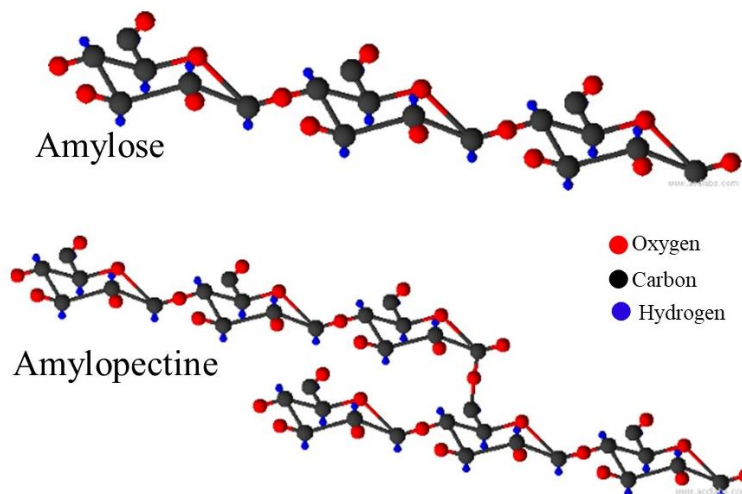
El uso práctico de los productos de almidón se remonta cuando los egipcios, en el periodo pre-dinástico, lo utilizaban como cementación en tiras de papiro. Se reconoció en el año 800 a.C como una sustancia, momento en el cual ya se había aislado en un polvo blanco del grano por un proceso de fermentación parcial y se empleó en cosméticos y medicamentos. Durante la edad media la fabricación de almidón se convirtió en una industria importante en países bajos como Holanda, considerándose de alta calidad. Una forma temprana de modificación de almidón practicada en este periodo implicó que el almidón fuera ligeramente hidrolizado por el vinagre. En este momento, el almidón encontró su uso principal en la lavandería para endurecer las telas. La industria del almidón durante el siglo XIX es testigo de una enorme expansión, debido en gran parte a las demandas de la industria textil, de impresión en color y de papel, además, del descubrimiento de que podía convertirse fácilmente en un producto similar a la goma conocido como dextrina y su uso como edulcorante. Por otro lado, a principios de 1800 es sabido que el almidón y los hidratos de carbono de diferentes fuentes (remolacha, caña, uva, leche, entre otras) se pueden convertir en azúcar [17]. En 1811 se descubre que el almidón podía transformarse en una sustancia dulce por calentamiento con ácido diluido. Este hecho genera gran interés en el almidón debido a los hábitos cristalinos resultantes que se obtienen luego de un proceso químico en un medio ácido, este fenómeno

incremento el interés por conocer la estructura, por otro lado, involucro el crecimiento de las industrias de glucosa. En 1902, Hermann Emil Fischer es galardonado con el premio Nobel en Química, sugiere que la molécula de los polisacáridos se compone de una cadena larga de residuos unidos mediante enlaces. Sin embargo, todavía no se tenía conocimiento a profundidad de la molécula de la glucosa hasta 1920, cuando los grupos de investigación de Irvine en Escocia y Haworth en Inglaterra utilizando técnicas de metilación muestran la estructura cíclica de las moléculas de almidón. Estas consideraciones abrieron un amplio campo de investigación que lleva más de 150 años a partir del descubrimiento del azúcar en el almidón y sus unidades de glucosa, interconectados mediante enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6. El compendio de estas investigaciones permitió considerar el almidón como una estructura constituida por una cadena formada por unidades de  $\alpha$ -glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos. Además de ser la forma de reserva de carbohidratos de la mayoría de las plantas, siendo abundante en cereales, semillas, tubérculos, entre otras fuentes botánicas [18].

Meyer, Brentano y Bernfeld en 1940 adoptan las palabras amilosa y amilopectina luego de realizar un experimento con enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación del almidón, este hecho ayudo a comprender la estructura de la amilopectina la cual se correlaciono con los estudios a cerca de la cristalinidad de los gránulos de almidón [19]. Debido a esta investigación se define la amilopectina como un componente ramificado y principal en gránulos de almidón, por otro lado, la amilosa se describe como un polímero que no tiene ramas. De esta manera se redefine el almidón como un carbohidrato formado con dos principales componentes la amilosa y amilopectina. Siendo la amilosa un homopolímero largo y lineal de (1 $\rightarrow$ 4) unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas, por otro lado, la amilopectina tiene una estructura ramificada de secuencias lineales con los mismos enlaces (1 $\rightarrow$ 4), conectados entre sí a través de enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6), con una distribución bimodal de longitudes de cadena centradas en 15 y 45 unidades de glucopiranosas .El surgimiento de distintas técnicas de caracterización ayudaron a elucidar el concepto de la estructura interna del almidón permitiendo de esta manera tener un mayor conocimiento a cerca de esta partícula, diferentes trabajos mencionan el almidón como una micropartícula debido a la escala nanométrica que se aprecia en las micrografías obtenidas a partir del microscopio óptico de Barrido.

Se describe el almidón como un granulo o partícula que está compuesto por dos macromoléculas: la amilosa y la amilopectina, siendo este el carbohidrato más importante en la vida moderna, con diferentes aplicaciones industriales [20] [21]. La espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente y la espectroscopia de absorción atómica cuantitativa reporta la presencia de componentes elementales mayores y menores de Ca, K, P, S, Al, Mg, Na y B en el almidón. Mediante otras técnicas de caracterización como Difracción de rayos X, Calorimetría Diferencial de Barrido, Microscopia óptica de Transmisión, entre otras han permitido definir el almidón como una micropartícula, que se caracteriza por ser semicristalino es decir tiene una contribución simultanea de la fase amorfa y cristalina, los cristales del almidón se atribuyen a las unidades de glucosa [11], estas se unen en una conformación  $\alpha$ , dando lugar a un giro helicoidal de la cadena polimérica [22] .

Formando dos macromoléculas por enlaces glucosídicos, la amilosa es una cadena lineal con enlaces  $\alpha$  (1-4) y la amilopectina es una cadena ramificada formada por enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6).



**Fig 2.1.** Representación esquemática de la estructura de la amilosa y la amilopectina.

Diferentes autores describen el gránulo de almidón como una estructura de anillo de crecimiento elíptico compuesta de láminas amorfas y cristalinas dispuestas alternadamente, en el que la distribución de la doble hélice formada por las cadenas laterales de amilopectina y la diferencia en los puntos de ramificación hacen que el almidón presente un patrón de difracción específica [23] [24]. Kainuma [22], definió por primera vez la región cristalina como la generación de entrelazamiento de cadenas dobles, para los gránulos de almidón tipo-B, debido a la organización que tiene el agua dentro de la molécula del almidón dejando poco o ningún espacio entre las cadenas de amilosa, amilopectina y el agua. Por otro lado, algunos trabajos reportan el contenido de la región cristalina (entre 15 y 45%), este se les atribuye a las dobles hélices que se embalan y forman los cristalitas; y la región amorfa corresponde a puntos de ramificación.

La amilosa en la literatura se reporta como una molécula individual, intercalada aleatoriamente entre moléculas de amilopectina y en estrecha proximidad unas con otras, tanto en las regiones cristalinas como amorfas [23]. Dependiendo del origen botánico del almidón, la amilosa se encuentra preferentemente en las regiones amorfas (por ejemplo, el almidón de trigo), intercalada entre grupos de amilopectina, o co-cristalizado con amilopectina (por ejemplo, almidón de papa). Por lo tanto, el contenido de amilosa y el origen botánico deben influir considerablemente en la organización cristalina [25].

Dependiendo de su patrón de difracción de rayos X, los almidones se clasifican en tres tipos llamados A, B y C. Imberty [26], propuso un modelo para la configuración de la estructura de doble hélice para explicar la diferencia entre los almidones tipo A y tipo B. las estructuras de tipo A están estrechamente empaquetadas con moléculas de agua entre cada estructura



helicoidal doble, mientras que los tipo B son más abiertos y las moléculas de agua se encuentran en la cavidad central formada por seis hélices dobles. El tipo C se considera la combinación entre los dos tipos de almidón anteriormente mencionados, el patrón de difracción puede diferir de estos debido a los cambios estructurales que presenta [27].

La cristalinidad del almidón presentada en los patrones de difracción se le atribuye a la formación de hélices dobles formadas por cadenas laterales de amilopectina. Por tanto, los almidones ricos en amilopectina son más cristalinos que los ricos en amilosa [28]. Kainuma [22], reporto para almidones con alto contenido de amilosa que la evolución del grado de cristalinidad y como esta se puede trazar en función del contenido de esta macromolécula para gránulos de almidón nativo del mismo origen botánico. Sin embargo, el aumento de la cristalinidad sigue siendo bastante bajo en comparación con el aumento de contenido de amilopectina. La morfología, la forma, el tamaño, el grado de cristalinidad y la reactividad del almidón dependen del origen y la composición de la materia prima que contiene el almidón [29].

Dome [29] propuso calcular el grado de cristalinidad de un patrón de difracción como el área correspondiente a los cristalitos y el área total del patrón de rayos X bajo la curva, luego de tratamientos mecánicos con el objetivo de reducir el área amorfa en función del tipo de almidón y de su estructura cristalina. El grado de cristalinidad se calculó como la relación entre el área correspondiente a la fase cristalina y el área total bajo curva de rayos X utilizando la fórmula:

$$CI = \frac{S_{crxphase}}{S_T} \times 100\% \quad Ec. 1$$

$CI$  es el grado de cristalinidad,  $S_{crxphase}$  es el área correspondiente a la fase cristalina y  $S_T$  es el área total bajo el patrón de rayos X. El grado de cristalinidad se calculó como la relación entre el área correspondiente a la fase cristalina y el área total bajo la curva DRX y se utilizó la fórmula:

$$AM = \frac{CI_o - CI_T}{CI_o} \quad Ec. 2$$

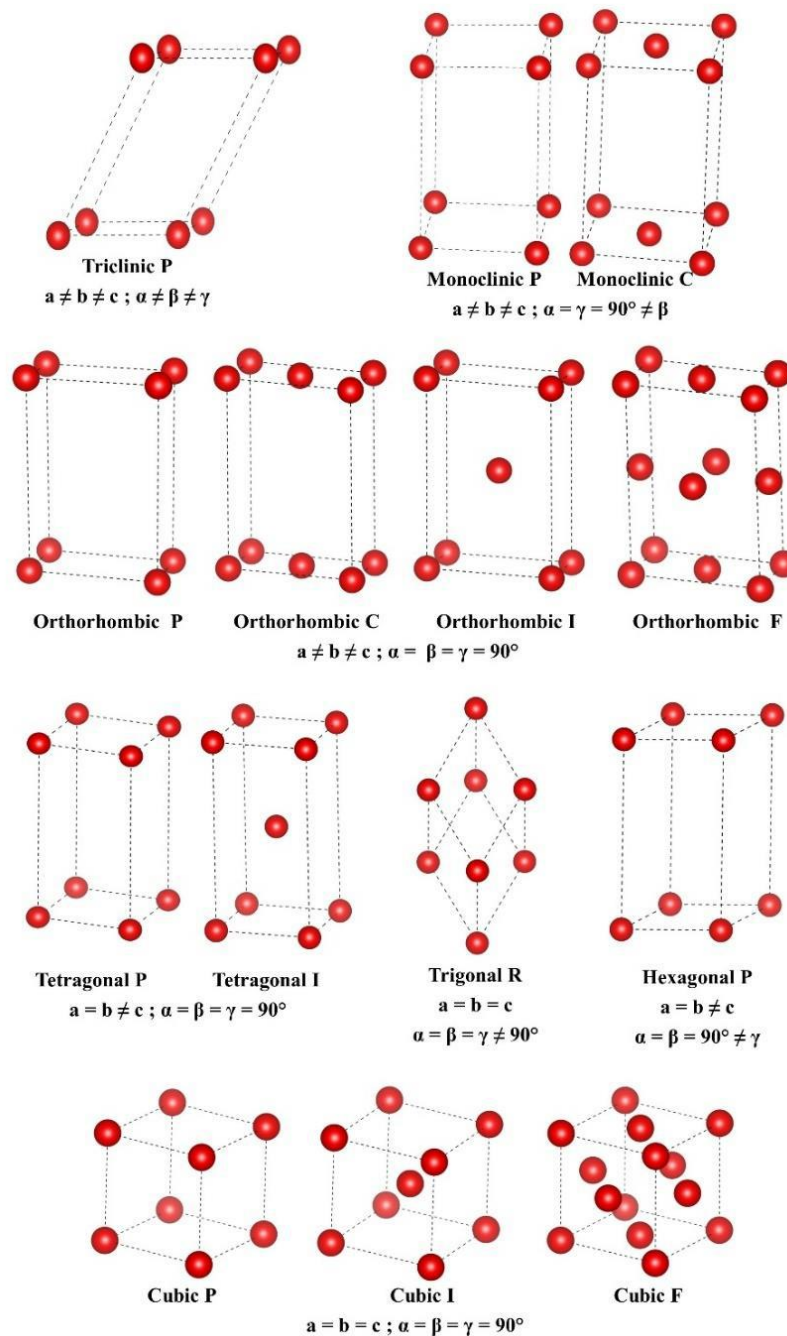
Donde AM es el grado de la región amorfa;  $CI_o$  es el grado inicial de la cristalinidad;  $CI_T$  es el grado de cristalinidad. Los patrones de difracción para el estudio anteriormente mencionados fueron de maíz, papa, y tapioca, estos patrones mostraron picos de difracción característicos de las estructuras cristalinas de tipo A y tipo B que corresponde a  $15.00^\circ$ ,  $22.93^\circ$ ,  $17.02^\circ$  y  $17.92^\circ$ . En el caso de la estructura cristalina tipo C, los patrones de difracción contienen la superposición de los picos anteriormente mencionados [30] [31].

El grado de cristalinidad afecta significativamente las propiedades fisicoquímicas tales como dureza, densidad, transparencia y reactividad. Sin embargo, estas propiedades no dependen únicamente del grado de cristalinidad y también se ven afectadas por el tamaño del granulo y el tipo de estructura cristalina. Estas propiedades se emplearon al realizar la hidrólisis

enzimática de la biomasa mecánicamente pretratada y desarrollar nuevos tipos de alimentos funcionales caracterizados por una mejor biodisponibilidad de nutrientes [32].

Los resultados anteriormente mencionados, desde un punto de vista cristalográfico presentan algunos errores conceptuales debido a la categorización de las estructuras cristalinas "tipo-A, tipo-B y tipo-C". Es bien sabido que algunos materiales presentan más de una estructura cristalina, como es el caso del carbono que forma estructuras polimórficas tridimensionales como el grafito con estructura hexagonal, el diamante con la cara centrada en el cuerpo (FCC), y el grafeno que tiene una estructura bidimensional. El polimorfismo se define como la capacidad de cualquier material para estar en más de una estructura cristalina. Se puede encontrar en muchos materiales cristalinos que incluyen minerales, semiconductores y metales, y es relevante en algunos campos como alimentos, farmacéuticos, pigmentos y agroquímicos debido a que sus propiedades fisicoquímicas dependen fuertemente de la estructura cristalina [33].

Las técnicas de difracción de rayos X en polvo (XRD) se utilizan normalmente para estudiar sistemas nanodimensionados porque son técnicas no destructivas. Sin embargo, la técnica convencional de difracción XRD en la configuración de Bragg Brentano tiene algunas limitaciones que complican el análisis, como es el caso de la materia blanda y las nanopartículas orgánicas. La materia blanda es una variedad de sistemas físicos tales como líquidos, polímeros, coloides, materiales granulares y sistemas biológicos, donde la interpretación y el análisis de patrones XRD que implican dispersión elástica e inelástica no se consideran adecuadamente [34]. La Fig. 2.2 muestra las celdas de Bravais y describe los sistemas cristalinos, mostrando las principales características de los parámetros de celda y sus ángulos. Estas redes se agrupan en siete sistemas de celda: triclínica, monoclínica, ortorrómbica, tetragonal, romboidal, hexagonal y cúbica.



**Fig 2.2** Redes de Bravais para estructuras cristalinas en la naturaleza [3].

Por otro lado, se reporta en la literatura que la combinación de dos materiales puede dar como resultado una reacción química; cuando se toma un patrón XRD, puede cambiar. Si hay una reacción química, se esperan dos resultados: la formación de un material amorfo o una fase o fases cristalinas [35]. Es decir que puede observar algunos cambios en el patrón de difracción relativo a las muestras iniciales antes de cualquier reacción química: en el primer

caso, el material amorfo contribuirá al fondo, pero en el segundo caso, se encontrarán nuevos picos. Entonces, los picos anchos no tienen ninguna relación con la calidad de la muestra a escalas de cristal nanométricas. Cualquiera de las catorce redes de Bravais debe corresponder al material cristalino. Sin embargo, cuando la reacción química no tiene lugar, el patrón XRD es una superposición de cada uno de los materiales iniciales ya que no hay nuevas fases presentes. Entonces, si se reporta como una nueva estructura, como es el caso del almidón tipo C, no tiene sentido físico.

El enfoque principal para identificar una estructura cristalina es el uso de un PDF. La identificación se obtiene mediante la comparación de la curva de difracción de la muestra estudiada (picos difractados) y un estándar conocido o una base de datos en la que se reportan los picos difractados permitidos y sus índices de Miller, así como las intensidades experimentales y calculadas. No obstante, las muestras de almidones se han identificado utilizando un PDF que corresponde a la estructura ortorrómbica. En este punto, es importante recordar que el pico se encuentra en aproximadamente  $5.64^\circ$  en la escala  $2\theta$  utilizada para identificar el tipo B de almidón y corresponde a la (100) dirección de la estructura hexagonal.

La dispersión y la difracción se describen generalmente por separado, pero desde un punto de vista de difracción, está estrechamente relacionado en una descripción conceptual, se considera que es básicamente el mismo fenómeno. La diferencia radica en el orden de exposición de largo alcance por la muestra para la difracción [36].

A lo largo del tiempo, diferentes investigadores han publicado la cuantificación del porcentaje o índice cristalinos para diferentes almidones aislados de varias fuentes. La difracción es un fenómeno definido como redistribución de energía espacial debido a la interacción de la onda electromagnética con la materia donde el espacio entre sus átomos está cerca de la longitud de onda incidente. La configuración geométrica de la intensidad máxima y mínima de la radiación constituye un patrón de difracción de rayos X [33].

La difracción de rayos X por materia es una consecuencia de una combinación de dos fenómenos. El primero está relacionado con la dispersión de átomos individuales, y el segundo es la interferencia entre las ondas dispersadas por estos átomos. El método utilizado es el de polvos debido a su practicidad, se utiliza cuando la muestra no es de un solo cristal como es el caso del almidón. En este caso, la muestra se reduce a un polvo fino, cada partícula sería un cristal o un conjunto de cristales más pequeños, y están orientados al azar en relación con el eje óptico. El resultado es que cada conjunto de planos será capaz de difractar. La relación entre las posiciones de los picos, la intensidad y la forma del patrón de difracción es una mezcla de la posición de cada átomo, así como la longitud de los parámetros de red [33]. Es decir que el cálculo de cualquier intensidad se inicia con el factor de estructura [37] [38], debido a que contiene información sobre la base atómica del cristal y la densidad electrónica. En el caso del almidón, sigue siendo un punto de discusión. Sin embargo, otros factores afectan la intensidad relativa de los picos de difracción en el caso de una muestra en polvo. Estos factores son factor de polarización, factor de estructura, factor de multiplicidad, factor de Lorentz, factor de absorción y factor de temperatura. Además, los picos de difracción son modificados por defectos tales como dislocaciones, vacantes y sustituciones atómicas. El

tamaño del cristal y los otros parámetros alteran la forma y el ancho de los picos de difracción [38].

Además, los experimentos de dispersión se llevan a cabo en una variedad de regiones angulares que se identifican típicamente por la distancia entre la muestra y el detector. La difracción clásica de rayos X en polvo y la dispersión se ejecutan en la subárea de dispersión de rayos X de gran angular, donde el parámetro de la distancia está entre 0.05-0.2 m, y se centra en el estudio de la disposición de los segmentos de cadena en el caso de la materia blanda. La dispersión de rayos X de ángulo pequeño es también una configuración convencional para investigar la materia blanda.

Los patrones de difracción de rayos X se le atribuyen en gran medida a la amilosa y la amilopectina, sin contar con los cristales de glucosa que se encuentran libres en la estructura interna del almidón [39]. La organización jerárquica de polisacáridos como celulosa, almidón y quitina en materiales naturales junto con su estructura semicristalina ha sido un factor clave en la preparación de nanocristales a través de hidrólisis controlada. Las regiones amorfas son más susceptibles a la hidrólisis ácida que las regiones cristalinas [25]. Durante la última década, los nanocristales de almidón (SNC) han atraído un interés creciente debido no solo a su tamaño nanoescalado, sino también a su naturaleza renovable y biodegradable. Los SNC provienen de los gránulos nativos de almidón por hidrólisis de las partes amorfas, utilizando principalmente ácidos [25] [40]. La morfología de estos depende del origen polisacárido; en el caso de la celulosa son "tipo varilla" [41] y en el caso del almidón son "tipo plaqueta" [42]. La clasificación se atribuye en gran medida a la estructura cristalina que se clasifican en hexagonal y ortorrómbica.

## 2.1 Estructura cristalina hexagonal y ortorrómbica

Todos los materiales cristalinos en la naturaleza se clasifican estructuralmente por la forma en que los átomos están dispuestos en una red que es una abstracción matemática llamada celdas de Bravais. Para cada uno de estos materiales, el número mínimo de átomos que se repiten en cada punto de la red forma la base atómica. La base atómica y el cristal están formados por traducciones tridimensionales de la base atómica en cada sitio de la red de Bravais. Algunos materiales presentan más de una estructura cristalina, como es el caso del carbono que forma estructuras polimórficas tridimensionales como el grafito con estructura hexagonal, el diamante con una estructura FCC, y el grafeno que es una estructura bidimensional. El polimorfismo se define como la capacidad de cualquier material para estar en más de una estructura cristalina. Se pueden encontrar en muchos materiales cristalinos que incluyen minerales, semiconductoras y metales.

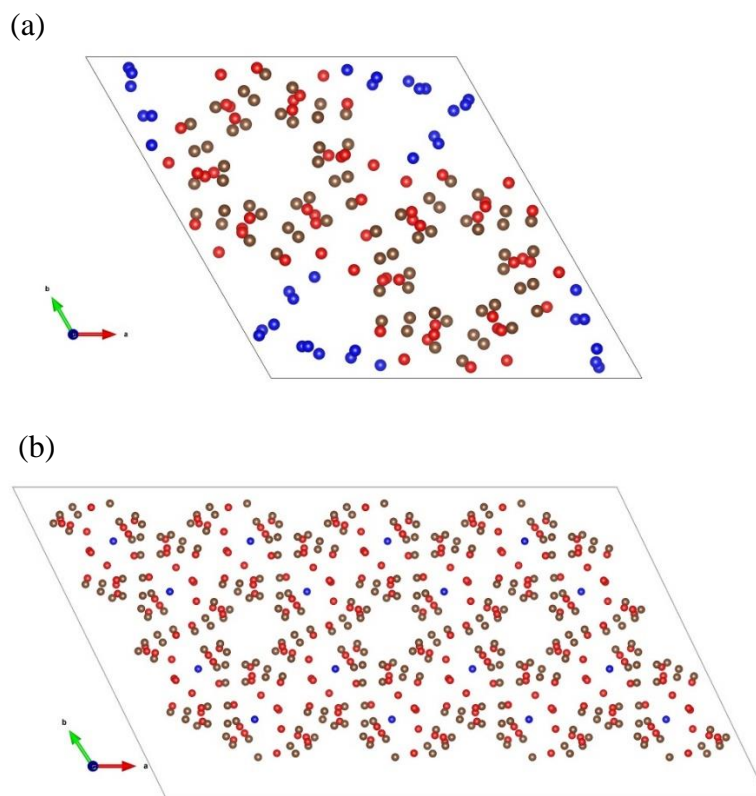
En el almidón las dobles hélices hechas de ramificaciones cortas de amilopectina forman lamelas cristalinas. Su espesor de 5-7 nm presenta alguna variación dependiendo del origen botánico. Los gránulos de almidón exhiben dos tipos amórficos principales. El tipo A ocurre principalmente en almidones de cereales y el tipo B en tubérculos además de almidones ricos en amilosa [43]. Cuando la estructura cristalina hexagonal y ortorrómbica están presentes se conoce como almidón tipo C.

La estructura cristalina en donde hay una superposición de los picos ortorrómbicos y hexagonales (Tipo A y tipo B) es característico de un complejo de amilosa con ácidos grasos y monoglicéridos, que tiene lugar después de un proceso de gelatinización del almidón, por lo tanto, este tipo casi nunca aparece en los almidones nativos. Sin embargo, no hay un archivo de difracción en polvo para la identificación de este complejo.

Las estructuras ortorrómbicas (tipo A) y hexagonales (tipo B) difieren en la geometría de sus unidades de una sola célula, la densidad de embalaje de sus hélices dobles y la cantidad de agua dentro de la estructura cristalina. Generalmente la estructura cristalina de los almidones granulares nativos depende principalmente de su fuente vegetal, incluyendo la estructura de la amilopectina. La amilopectina de los almidones con estructuras cristalina tipo A y B es diferente. Los almidones con estructura ortorrómbica generalmente muestran una mayor longitud media de cadena ramificada que la de los almidones con estructura cristalina hexagonal, debido a que la amilopectina de los almidones con estructura cristalina ortorrómbica tiene una proporción mayor de cadenas cortas ramificadas y una proporción menor de cadenas largas ramificadas en comparación con la amilopectina de los almidones con estructura cristalina hexagonal [44]. La amilopectina en los almidones de tipo A tienen algunos puntos de ramificación ubicados en la región cristalina, pero la amilopectina de los almidones de tipo B tiene la mayoría de los puntos ramificados en la región amorfa [45].

En la estructura ortorrómbica, descrita como una celda de unidad centrada en el cuerpo con un grupo espacial no especificado, una de las dos hélices dobles paralelas trenzadas a la

derecha se encuentra en la esquina y el otro en el centro de la celda. Ocho moléculas de agua ocupan el espacio vacío entre las hélices dobles.



**Fig. 2.3** Estructuras cristalinas (a) Hexagonal y (b) Ortorrónica.

Las hebras individuales en la estructura cristalina hexagonal están en una conformación helicoidal, enrolladas paralelamente un alrededor de la otra. Las hélices dobles contienen una disposición hexagonal, dejando un canal abierto que se llena con hasta 36 moléculas de agua. Una de hélices se encuentra en  $x=2/3$ ,  $y=1/3$  y la otra en  $y=2/3$ , cada hélice contiene seis residuos de D-glucosa.

Estudios estructurales de difracción electrónica en la estructura cristalina ortorrónica, proponen una estructura descrita en una célula unitaria del mismo volumen, pero con simetría monoclinica y grupo espacial B2 [46] [26]. En esta celda, los 12 residuos de glucosa se encuentran en dos hélices dobles de hebras paralelas dirigidas a la izquierda están empaquetadas de manera paralela en lugar de las hélices paralelas dirigidas a la derecha, empaquetadas de manera antiparalela. [26] En el caso de la estructura hexagonal las cadenas de amilosa se cristalizan en una red hexagonal que pertenece al grupo espacial P6, con parámetros de red  $a=b$  1.85 nm y  $c$  = 1.04 nm. Sin embargo, la estructura reportada para amilosa en el Archivo

de Difracción de Polvo (PDF) Emitido por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD) con la tarjeta N0. 00-043-1858, es ortorrómbica I con lo siguiente parámetros de celda  $a=10.69$ ,  $b=11.72$ , y  $c= 17.71$  nanómetro y se asocia con A-tipo.

Los patrones simulados exhiben picos amplios para los cristales más pequeños debido a que el factor principal es la contribución simultánea de las contribuciones elásticas e inelástica debida a la dispersión de rayos X, esto se debe a que el tamaño del cristal de la muestra está cerca de la longitud de onda incidente. Sin embargo, los patrones de difracción cristalinos se pueden ver afectados por distintos factores que influyen en los cristales que forman la molécula, como es el caso de la interacción con distintos solventes.

## **2.2 Cristalización y Re-cristalinización de la estructura cristalina del almidón.**

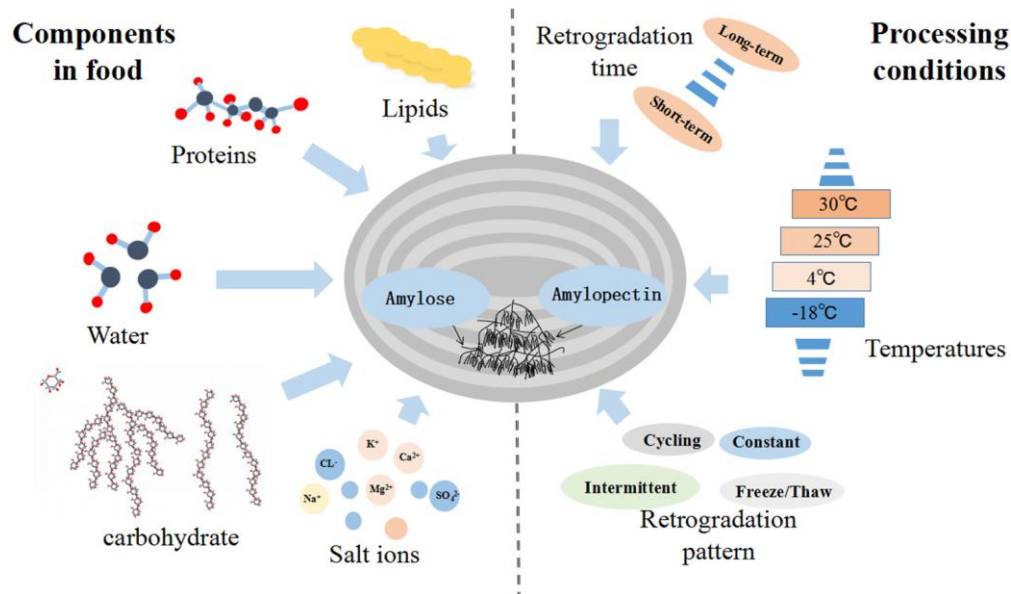
La interacción del almidón/agua produce cambios en su estructura cristalina, debido a los componentes que influyen en esta interacción, como sus dos principales constituyentes, la amilosa y la amilopectina forman hélices dobles de cadenas cortas a las cuales se les atribuye el proceso de cristalización, las cadenas laterales de la amilopectina pueden cristalizar en estructuras tipo A y B (ortorrómbicas y hexagonales) dependiendo de la fuente botánica que se esté estudiando [47]. Se define como proceso de cristalización a la organización tridimensional de átomos/moléculas y como consecuencia hay una disminución de energía total del sistema. En el caso de los polímeros la cristalización se ve afectada por el estado físico y movilidad.

La morfología semicristalina nativa de los gránulos de almidón se destruye en el llamado proceso de gelatinización, aplicando calor en presencia de agua u otros aditivos. Los eventos físicos acompañantes se denomina retrogradación o cristalización. Dado que la amilosa se cristaliza mucho más rápido que la amilopectina en el proceso térmico, la fracción de amilosa tiene un efecto más importante en el desarrollo de la cristalinidad durante la retrogradación que en el granulo de almidón nativo (donde está contribuyendo principalmente la fracción amorfa).

La gelatinización es un proceso irreversible de hinchazón en los gránulos de almidón ocurre cuando una suspensión acuosa es calentada sobre una temperatura característica (temperatura de gelatinización) [48]. Este proceso es afectado por varios factores los cuales se pueden observar en la figura 4, estos factores incluyen los componentes del almidón (amilosa y amilopectina) entre otros ingredientes (por ejemplo, agua, lípidos, proteínas, carbohidratos y iones), y las condiciones de procesamiento (temperatura, tiempo de retrogradación y patrón de retrogradación). La hinchazón viene acompañada por la pérdida del orden, de la cristalinidad y la solubilización de la amilosa. Sobre los  $100^{\circ}\text{C}$  hay poca evidencia de la liberación de cantidades sustanciales de amilopectina. Por lo tanto, el calentamiento resulta en un fluido, compuesto de poros, gelatinizados e hinchados con un esqueleto de



amilopectina, suspendida en una solución caliente de amilosa. El enfriamiento convierte el fluido viscoelástico turbio en una pasta o en una concentración muy alta de almidón (6%, w/w) un gel elástico opaco.



**Fig.2.4** Componentes que influyen en el proceso de retrogradación del almidón (Q. Chang. [49]).

Sin embargo, la literatura describe la gelatinización como un proceso continuo. El grado de gelatinización incrementa a medida que la temperatura aumenta en cierto rango, este valor se relaciona directamente con la estabilidad de ciertos almidones. Una vez se alcanza la temperatura de inicio de gelatinización, se destruye la estructura relativamente inestable (la zona amorfa) en los gránulos de almidón. La zona cristalina de la amilopectina en el almidón nativo tiene una estructura de clúster, y por lo tanto su temperatura de gelatinización es más alta que la de la zona amorfa.

El almidón en solución acuosa a baja temperatura (por debajo de la temperatura de gelatinización) absorbe agua, pero solo se hincha ligeramente. La interacción del agua con la zona amorfa es mayor con respecto a la zona cristalina. El espacio entre las cadenas del almidón en la zona amorfa incrementa después de la interacción con el agua, mientras que los cristales de almidón permanecen intactos a este proceso se le conoce como recristalización. Cuando el sistema de almidón-agua está en un ambiente de mayor temperatura, la interacción entre cadenas laterales cortas de amilopectina se destruye, lo que permite que las moléculas de agua plastifiquen las cadenas de almidón. En esta etapa, las cadenas de almidón son más móviles, y el fenómeno de la birrefringencia de la destrucción del almidón granulado nativo desaparece. Mientras tanto, el estiramiento de la cadena de almidón hace que los aglomerados pierdan su forma compacta, y la estructura ordenada del almidón nativo se destruye [50].

La gelatinización es un proceso que implica la destrucción estructural del almidón, mientras que la retrogradación es un proceso de reconstrucción estructural, aunque no regenera la estructura del almidón hasta su estado anterior gelatinizado [51]. Este último proceso implica la re-asociación de amilosa y amilopectina en estructuras ordenadas para formar cristales y alcanzar un estado ordenado estable, y ha mostrado una potencial reducción de la digestibilidad del almidón [52].

### **2.3 Retrogradación o Cristalización del almidón**

La retrogradación del almidón puede dividirse en retrogradación a corto y largo plazo [53]. La retrogradación a corto plazo se describe como la formación de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo de moléculas de almidón de amilosa durante el enfriamiento. Mientras que la retrogradación a largo plazo es un proceso mucho más lento, que reordena principalmente las cadenas ramificadas externas de amilopectina. Se cree que la retrogradación de la amilopectina se puede dividir en dos procesos: la repolimerización entre cadenas de la estructura de doble hélice y el empaquetamiento de las dobles hélices de las cadenas de almidón [54].

El proceso de la retrogradación da como resultado una serie de cambios físicos como el aumento de la viscosidad y la turbidez de la pasta (resultado del proceso de gelatinización), formación de gel, exudación de agua y mayor grado de cristalinidad con la aparición de polimorfos cristalinos de tipo B debidas al reordenamiento y asociación de las ramas cortas más externas de la amilopectina [55]. Las cadenas de la amilosa dispersas forman asociaciones de doble hélice de 40 a 70 unidades de glucosa a través de enlaces de hidrogeno [56]. La retrogradación se define como un proceso continuo donde las cadenas de almidón se reasocian y forman una estructura de doble hélice, estas hélices dobles se envasan en cristales, que inicialmente implica una rápida cristalización de las moléculas de amilosa seguidas de una lenta cristalización de las moléculas de amilopectina. La retrogradación de amilosa determina la dureza inicial de un gel de almidón y la digestibilidad de los alimentos procesados. El desarrollo a largo plazo de la estructura de gel y la cristalinidad del almidón procesado, que se puede evidenciar en alimentos como el pan y el pastel, se consideran debido a la recristalización de la amilopectina [57].

la cristalización se puede dividir en tres etapas, la nucleación (formación de núcleos de cristal), la expansión (crecimiento de núcleos de cristal), y la maduración (perfección o mayor crecimiento de los cristales), estas etapas dependen de la temperatura. Sievert, Czuchajwska y Pomeranz [58] descubrieron que cuando la temperatura ambiente se acerca a la temperatura de transición vítrea del almidón, la tasa de formación de un núcleo cristalino es alta, pero la tasa de propagación de los cristales es baja. A temperatura de fusión de cristal, la tasa de nucleación de las cadenas de almidón es baja, mientras que la tasa de propagación es grande.

Como la retrogradación del almidón es un proceso complejo que involucra una serie de eventos moleculares y fisicoquímicos, se ha aplicado una diversidad de métodos físicos y químicos para investigar los cambios que tienen lugar en las propiedades del almidón. Estos métodos incluyen varias técnicas, reológicas, espectroscópicas, cromatográficas, difracción de rayos X y dispersión.

## 2.4 Recristalización

Siendo la retrogradación un proceso de desorden-orden posterior a un tratamiento térmico, en el cual el almidón tuvo interacción con agua u otros solventes, el proceso de recristalización es una transición orden-orden del mismo tipo. En la literatura se define como un proceso mediante el cual la estructura cristalina del almidón se organiza espontáneamente luego de pasar por un proceso a altas temperaturas. Sin embargo, a bajas temperaturas la amilosa puede interactuar rápidamente formando hélices dobles, mientras que la amilopectina necesita un periodo de tiempo mucho más largo para formar hélices dobles [59].

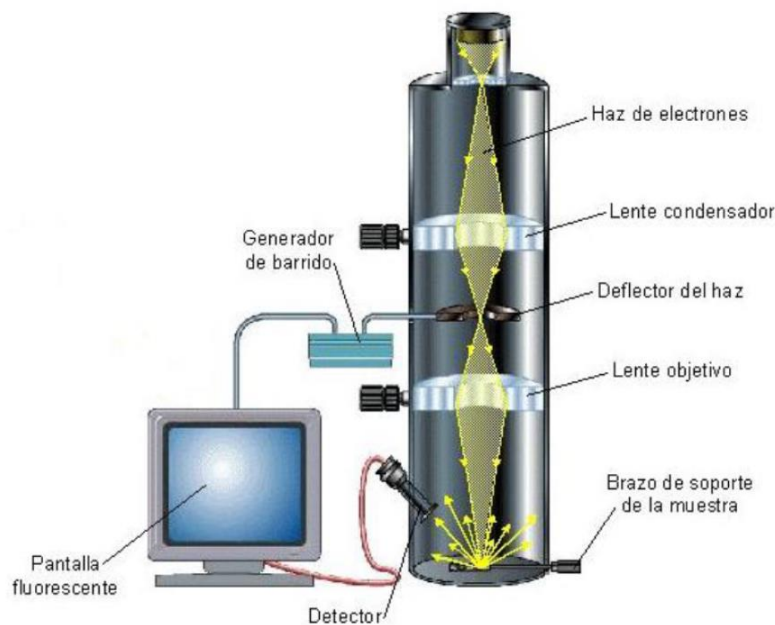
El proceso de recristalización se ve afectado por la fuente del almidón, contenido de agua, así como la presencia de sales, ácidos, lípidos y azúcares, este se lleva a cabo entre 4 a 25°C. El comportamiento de las moléculas de almidón en un medio acuoso depende de su estructura y las condiciones ambientales bajo las cuales las moléculas están expuestas. En las suspensiones de almidón, la temperatura influye en como el almidón interactúa con el agua. Por ejemplo, en un medio acuoso a baja temperatura, los gránulos nativos de almidón se hinchan debido a la difusión y absorción de agua en las regiones amorfas. Sin embargo, este proceso es reversible y al secarse, los gránulos hinchados volverían a su forma nativa, teniendo el mismo contenido de agua ligada o libre que se evaporó durante el proceso de secado. Dependiendo del contenido de agua, estos cambios se definen como gelatinización (contenido de agua superior alrededor del 60% p/p) o fusión (contenido de agua inferior al 60%). La fusión depende en gran medida del contenido de agua y de la fuente de almidón [60].

La interacción entre el almidón y el agua es uno de los factores más importantes que determina las propiedades fisicoquímicas del almidón, esta puede controlarse siguiendo el cambio en el estado físico del agua dentro del almidón. El agua ligada y libre determina el estado de la estructura cristalina. Mediante técnicas de caracterización se puede determinar la influencia de las diferentes modificaciones fisicoquímicas que se le realizan a la molécula de almidón.

## 2.5 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido (MEB) escanea la muestra con un haz de electrones enfocado para producir una imagen reflejada de mayor aumento con respecto al microscopio óptico. La detección de los electrones en la muestra se utiliza para generar una imagen reflejada que contiene la topología y la composición de la superficie [61]. El tamaño y la forma del granulo están influenciados por el tipo de fuente botánica.

Las imágenes MEB se producen bombardeando la superficie de la muestra con un haz enfocado de electrones, liberados con energías bajas. Este equipo proporciona imágenes con apariencia tridimensional. Se compone de un cañón electrónico, una columna de alto vacío, lentes electrónicas y un sistema de observación. Funciona haciendo incidir el haz de electrones sobre la muestra, se emite una señal y esta se registra en una pantalla por un tubo de rayos catódicos. El haz pasa por una columna de vacío en la cual hay unas lentes que disminuyen el diámetro de los electrones emitidos, esto se hace para “barrer la muestra”, posteriormente y debido al sistema de barrido que tiene en la columna el microscopio genera electrones secundarios, los cuales dan como resultado la imagen final.



**Fig.2.5** Esquema representativo de un microscopio electrónico de barrido.

El alto vacío impide la formación de gases como aire, vapor de agua (principalmente) en la columna para de esta manera generar el desplazamiento de los electrones los cuales no se dispersarían o se detendría por las moléculas anteriormente mencionadas. Es adecuado este tipo de sistema debido a la distancia entre el cañón de electrones y la pantalla. Así mismo,

mediante la aplicación de alto vacío se incrementa la vida útil del filamento dado que bajo otras condiciones este se oxida fácilmente afectando su eficiencia de igual manera evita descargas de alta tensión [62]. Otros componentes como la unidad óptico-electrónica, detectores, detectores de señales, tubo de rayos catódicos, sistema de registro fotográfico, sistema computacional y portamuestras son los componentes principales del MEB. El portamuestras realiza movimientos con diferentes ángulos de rotación, se emplean generalmente cilindros a los que se adhiere la muestra con la ayuda de cinta doble de grafito que es conductora. Las señales emitidas son las responsables de la imagen resultante y pueden ser clasificadas en tres categorías: señales con carácter de onda electromagnética como los rayos X y catodoluminiscencia, las señales compuestas por electrones- se comprenden los electrones reflejados, los secundarios, los transmitidos y los absorbidos, la tercera categoría aplica únicamente para muestras de materiales semiconductores que dan señales de fuerza electromotriz. De las anteriores señales las que resultan de interés son las que generan electrones secundarios [63].

La microscopia electrónica de barrido se utiliza para el estudio morfológico de diferentes tipos de muestras. En el caso del almidón el estudio por MEB tiene dos ventajas principales: la profundidad del foco, la resolución y el aumento.

## 2.6 Difracción de Rayos X (DRX)

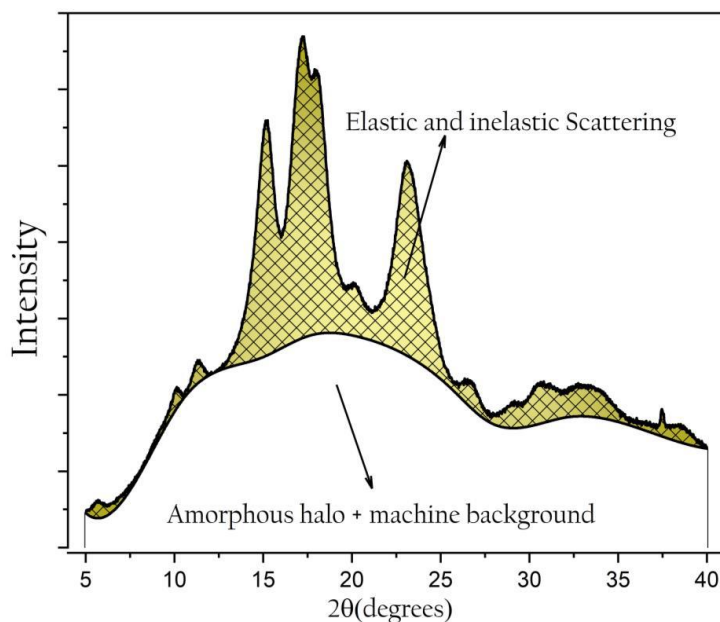
La difracción de rayos X es una técnica en la que se pueden medir propiedades estructurales como la composición de fase, defectos estructurales, orientación preferencial, tamaño de grano y tensiones, así como ordenamientos y espaciados atómicos de materiales amorfos y las interfaces, incluyendo los polímeros, además es una técnica no destructiva [64]. El conocimiento de la ubicación de los átomos en un material y la fuerza de sus enlaces permite la comprensión de las propiedades fisicoquímicas del material y eventualmente a partir de esto lograr realizar una modificación para mejorar sus propiedades.

Los átomos constituyentes dentro de un sólido presentan una distribución regular y simétrica a lo largo de la red cristalina, en donde se puede apreciar una celda unidad característica que se repite en las tres direcciones del espacio. Para que la observación de la difracción de los sólidos sea posible, las ondas empleadas deben tener una longitud de onda menor o igual al espacio entre los átomos constituyentes del material [64]. Cuando un haz de rayos X entra en contacto con la superficie de un cristal, los átomos provocan una dispersión de la onda incidente produciendo un fenómeno de interferencia que para direcciones de incidencia dadas resulta destructivo y en otras constructivo, de manera que surge la difracción; de lo anterior se obtiene un patrón de intensidades característico que se puede ser interpretado con la ayuda de la ley de Bragg.

Las técnicas de difracción de rayos X en polvo (DRX) se utilizan normalmente para estudiar sistemas nanodimensionados porque son técnicas no destructivas. Sin embargo, esta técnica

convencional de difracción en la configuración de Bragg Brentano tiene algunas limitaciones que complican el análisis, como es el caso de la materia blanda y las nanopartículas orgánicas. La materia blanda es una variedad de sistemas físicos tales como líquidos, coloides, materiales granulares y sistemas biológicos, donde la interpretación y el análisis de patrones DRX que involucran la dispersión elástica e inelástica no se consideran adecuadamente. Sigue siendo un área de estudio emergente [34].

En estos materiales, la distribución de longitud de la cadena molecular (distribución de masa molecular) y la distribución de tamaño de cristal o heterogeneidad de entidades estructurales como fibrillas o pilas laminares, juegan un papel muy importante en el patrón de DRX. Es habitual confundir los picos difractados producidos por una muestra que tiene baja calidad cristalina con picos de un material nanocristalino, ya que, en ambos casos, las muestras producen picos difractados amplios, como se reporta para almidones aislados de diferentes fuentes botánicas. En un patrón de difracción como el mostrado en la Fig.3 se identifican tres regiones cristalinas, amorfa y ruido (fondo de la maquina). Sin embargo, es importante mostrar que la región que se ha utilizado para describir la contribución cristalina de una muestra nanocristalina, está formada por contribuciones elásticas e inelásticas; este hecho no permite identificar cada una de estas señales de forma independiente. De hecho, hay la literatura habla a cerca de la separación de la dispersión y el desafío que esto implica. Este es un problema instrumental y físico en diferentes áreas de la física en la que tanto la dispersión inelástica y elástica están presentes. En la Fig.3, se definen las regiones de dispersión elástica e inelástica que involucra información sobre el carácter nano-tamaño de los cristales y la calidad cristalina, la región amorfa.



**Fig.2.6** Identificación de la dispersión elástico e inelástico, región amorfa e identificación del área bajo la curva de un patrón de difracción de rayos X de almidón de maíz rico en amilopectina [33].

Los primeros diagramas de difracción de rayos X reportados de almidón se obtuvieron la década de 1930 [65], los intentos de obtener una comprensión inequívoca de la disposición cristalina siguen siendo un factor de estudio. Distintos modelos postulados estructurales sugirieron una hélice de doble cadena para el polimorfo B [66]. Los modelos aceptados luego de diferentes estudios para almidones A y B se establecieron sobre la base de datos de difracción de polvo de rayos X y un extenso modelado de moléculas computarizado [67]. Ambas estructuras A y B fueron interpretadas sobre la base de hélices dobles de cadena paralela diestra, empaquetadas de una manera antiparalela. Siendo casi idénticas en conformaciones moleculares. La amilosa A y B difieren considerablemente en el empaque cristalino del dúplex. A partir de la biosíntesis el empaquetamiento paralelo de hélices dobles de cadena paralela, tienen la misma polaridad, es decir la polaridad de la cadena puede derivarse de datos bioquímicos, que se basan en la disposición paralela de las moléculas [68] [69].

Trabajos posteriores sobre el crecimiento in vitro de cristales individuales de amilosa y los estudios de difracción [70] [71], después un punto de vista físico permitió describir en detalle una nueva estructura tridimensional para el almidón tipo A (estructura cristalina ortorrómbica) [26].

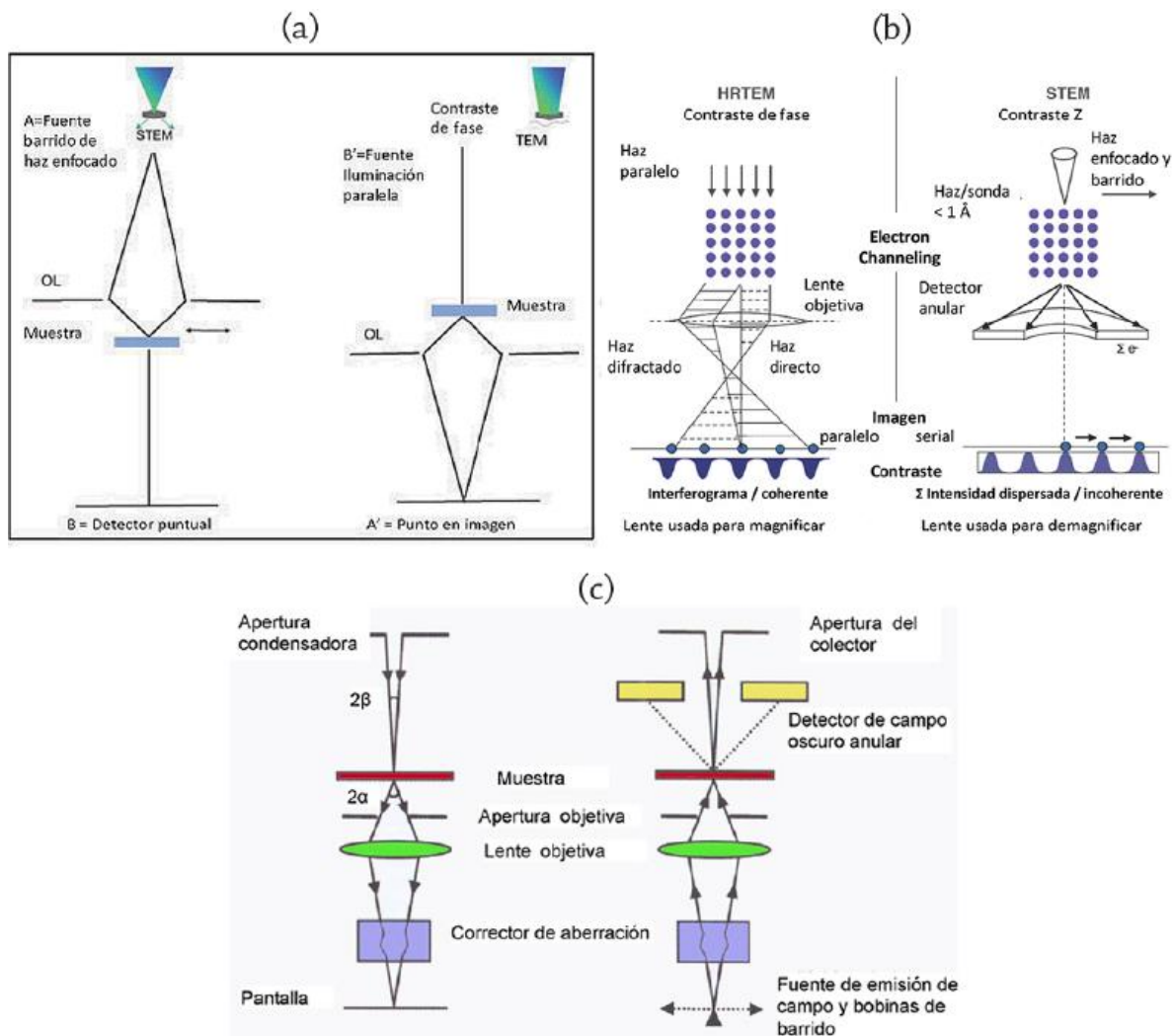
## 2.7 Microscopia Electrónica de transmisión (MET)

La microscopia electrónica es una herramienta utilizada en la caracterización de nanomateriales. La alta resolución permite obtener imágenes de las columnas de átomos que componen una muestra. El resultado obtenido muestra una imagen con intensidades específicas.

El microscopio electrónico de transmisión (MET) funciona irradiando una muestra delgada con un haz de electrones. Parte de los electrones colisionados son transmitidos, dispersados o dan lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, esto en función de su grosor y del tipo de átomos que lo forman. Esta emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de una muestra. La transmisión de electrones se realiza en muestras de poco espesor, para que el paso de electrones se facilite. Si la muestra es cristalina, hay una estructura de planos periódica, que cumple con la condición de la ley de Bragg, dando como un diagrama de difracción, que es una imagen de distintos puntos ordenados respecto a un punto central (electrones transmitidos

no desviados) estos aportan información sobre la orientación y estructura del/los cristales presentes [72].

En MET la imagen se forma mediante una lente objetiva de manera que la corrección de aberración instrumental se realiza en ese punto para lograr una imagen libre de aberración o corregida. Las interacciones entre el haz de electrones y la muestra dan como resultado cambios en las estructuras o arreglos atómicos originales de esta. Estos cambios se pueden generar por mecanismos tales como el desplazamiento de átomos o difusión en intervalos de tiempo muy cortos, siendo difíciles de detectar [73].



**Fig.2.7** Microscopio electrónico a) esquema de iluminación en STEM y MET, b) formación de imágenes en MET (contraste de fase) y STEM (contraste Z), c) esquema de iluminación en MEB y STEM incluyendo correctores de aberración [73].



El estudio mediante MEB de la morfología y regiones cristalinas se ha utilizado para investigar la estructura del almidón, geles y complejos de amilosa. En la literatura se reporta como la similitud de amilosa y amilopectina en la composición química y densidad de electrones genera la no diferenciación en el MEB. La estructura interna de los gránulos de almidón se revela solo a través de una serie compleja y larga de deshidratación, incrustación, seccionamiento, tratamiento químico y pasos de tinción o sombreado que a menudo producen artefactos que limitan la interpretabilidad de las micrografías de electrones de transmisión [74].

La alta resolución del microscopio electrónico de transmisión ha permitido estudiar la estructura cristalina del almidón. Las micrografías obtenidas permiten obtener el espacio recíproco, distancias interplanares y realizar indexaciones para conocer la posición atómica dentro del cristal. En la literatura se describen procedimientos en los cuales se realiza el aislamiento de los nanocristales de almidón mediante un tratamiento enzimático u ácido, este último tiene la finalidad de hidrolizar las cadenas de amilosa y amilopectina para de esta manera estudiar la estructura cristalina del almidón [39] [74].

## **2.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).**

La calorimetría diferencial de barrido permite determinar la cantidad de calor absorbido o liberado por una muestra cuando se mantiene a una determinada temperatura y tiempo de exposición. Por medio de esta técnica se puede conocer la estabilidad térmica de un material y caracterizar sus transiciones [75]. En el caso particular del almidón esta caracterización estudia la transición de fase para sistemas acuosos, proporciona temperaturas y entalpías características de la transición [76]. La endoterma en DSC es debida a la vibración atómica que se genera en la estructura cristalina, el calor que proporciona el equipo da como resultado la solvatación de los enlaces de Van-der Waals.

Existen otras aplicaciones para DSC como la determinación de la medida de capacidad calorífica aparente, cinética de cristalización de un material, determinación de temperaturas de transición (transición vítrea, cristalización, fusión ebullición, entre otras) [75].

El equipo funciona con una muestra referencia y la muestra en estudio, estas se calientan de modo independiente, permitiendo medir la diferencia de flujo de calor de manera que la temperatura constante y la misma en los dos platos. Los sistemas DSC emplean portamuestras de aluminio con capacidades de 10 a 40  $\mu\text{L}$ . la calibración del equipo se realiza con un metal puro, generalmente indio (In).

# Capítulo 3

## Metodología

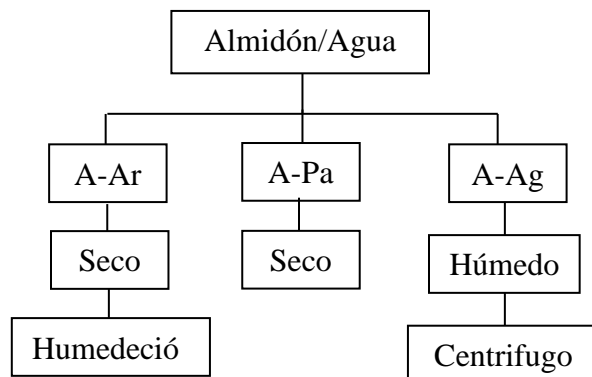
### 3.1 Preparación de la muestra

Las muestras de almidón de Arroz (A-Ar) (Tipo A), Papa (A-Pa) (Tipo B) y Aguacate (A-Ag) (Tipo C) y fueron aislados y obtenidos mediante la metodología propuesta por Gutiérrez-Cortez [77], Pineda-Gómez [6], Esquivel-Fajardo [78], respectivamente.

Los gránulos de arroz se dejaron en remojo cerca de 24 h, posteriormente pasaron por un proceso de molienda húmeda y un tamiz, este proceso se realizó 3 veces. El producto obtenido en cada ciclo se depositó en un recipiente, este se dejó precipitar, se centrifugo a 3200 rpm, durante 1 min, este proceso se realizó 3 veces. Posteriormente se secó en un horno a 40°C durante 24 h.

Los tubérculos se pelaron, y se dejaron en remojo aproximadamente 24 h, posteriormente se realizó una molienda húmeda, se realizó el mismo proceso para la extracción del almidón de arroz.

Las semillas del almidón de aguacate fueron separadas, lavadas, peladas y cortadas en pequeñas piezas de alrededor de 1cm<sup>3</sup>. Luego, estas piezas fueron molidas sin utilizar solventes en un molino (Vitamix Vita-Mix Corporation USA, 2.5 HP) para obtener partículas que van desde 1 a 2 mm. La pasta resultante se puso en un contenedor con un pistón a presión de 12 ton/cm<sup>2</sup> con una prensa hidráulica para obtener una pasta. La cual se puso en ultrasonido, se centrifugo a 3200 rpm y se obtuvo el almidón de aguacate. El estudio de la influencia del agua en las propiedades estructurales de los almidones se llevó a cabo con el A-Ag húmedo (es decir sin pasar por un proceso de secado) y A-Ar después de un proceso de secado y luego fue humedecido. En ambos casos, la fracción líquida del fue centrifugada y el sobrenadante desechado, el proceso se describe en la figura 3.1.



**Fig.3.1** Proceso para la humectación del almidón de A-Ar, A-Pa y A-Ag.

### 3.2 Análisis morfológico (MEB)

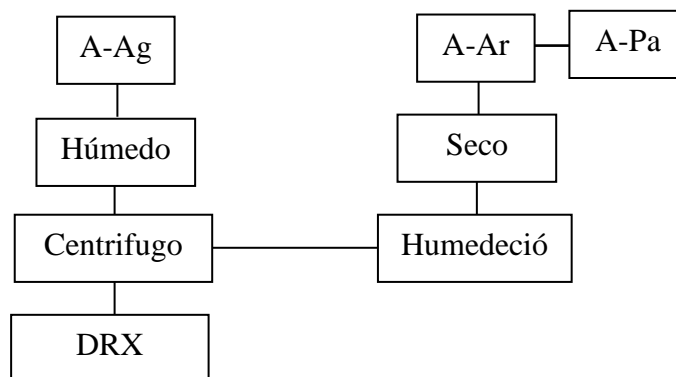
El microscopio electrónico de barrido (MEB) se utilizó para estudiar la morfología de los almidones de A-Ar, A-Pa y A-Ag, estas fueron obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido JSM-6060LV, JEOL Ltd con una resolución entre 1000 y 10000× en modo HV. Los almidones nativos fueron puestos en unos tubos de aluminio y se recubrieron con oro/paladio (60:40) en pulverización catódica. Las condiciones de análisis fueron tensión de aceleración de electrones de 10 K a una presión de 12-20 Pa.

### 3.3 Análisis estructural (DRX)

Los patrones de difracción de los almidones aislados mojados de A-Ar, A-Pa y A-Ag fueron estudiados usando el difractómetro de rayos X (DRX). El estudio de los cambios en la estructura cristalina se llevó a cabo en las muestras secas, estas fueron nombrados ASAr, ASPa y ASAg. Durante el análisis de rayos-X, las muestras húmedas perdieron agua A-Ag, estas se nombraron AHAr-I (Almidón húmedo de arroz), AHPa-I (almidón húmedo de papa) y AHAg-I (Almidón húmedo de aguacate). Después de la primera corrida, el segundo patrón para ambas muestras se nombró AHAr-II, AHPa-II y AHAg-II. Por esta razón, se realizaron medidas de pérdida de porcentaje de humedad mediante el analizador de humedad electrónico MA35.

Los patrones de difracción fueron corridos en el difractómetro Rigaku Ultima IV, operado a 40kV y 30 mA, con  $\text{CuK}\alpha$  radiación  $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ . Las medidas fueron realizadas desde 4 a 60 grados en una escala de  $2\theta$  con un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y 2 grados por minuto.

La figura 3.2 describe el procedimiento que se llevó a cabo para realizar las mediciones en el difractómetro de rayos X.



**Fig.3.2** Proceso de humectación del almidón para realizar las mediciones en el difractor de rayos X.

Los parámetros de celda unitaria para una estructura cristalina hexagonal se calcularon utilizando la Ec.1 y la ley de Bragg [4]:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad \text{Eq.1}$$

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad \text{Eq.2}$$

donde hkl son el índice de Miller, a y c son los parámetros de red de la celda unidad, d es la distancia interplanar (Ec. 2),  $\lambda$  es la longitud de onda de rayos X, y  $\theta$  es el ángulo en el que se permiten las difracciones, esto en el caso de una celda hexagonal.

En el caso de una celda ortorrómbica se utilizó la siguiente ecuación para encontrar los parámetros de la celda unidad [4].

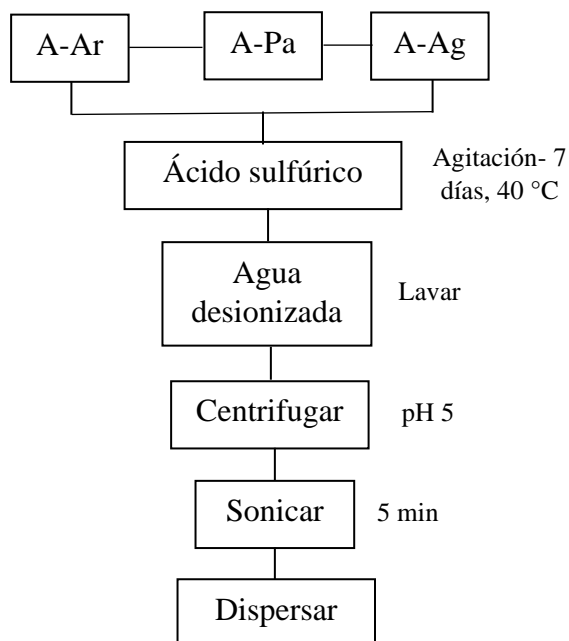
$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad \text{Eq. 3}$$

### 3.4 Análisis termogravimétrico (DSC)

El tratamiento termoalcalino de almidones nativos A-Ar, A-Pa y A-Ag se llevó a cabo en un equipo DSC Mettler toledo, con una tasa de calentamiento de 10 °C/min, desde la temperatura ambiente hasta 95 °C, bajo nitrógeno (50 mL/min). Las suspensiones (2:12) de las diferentes fuentes nativas de almidón (aguacate y arroz) se prepararon en cápsula hermética de aluminio DSC. Otro conjunto de muestras se preparó 4h, 18h y un día antes, se almacenaron en refrigeración antes de la medición durante 24 horas a 4 grados.

### 3.5 Análisis cristalino (TEM)

El estudio de los nanocristales de almidón nativos A-Ar, A-Pa y A-Ag se llevó a cabo en el equipo JEM-2200FS, las medidas fueron realizadas a 500, 100, 50 y 20 nm. Las muestras se dispersaron en alcohol isopropílico y sonicaron durante 5min, se nombraron ortorrómbicas y hexagonales debido a las estructuras cristalinas de los almidones aislados. El estudio de los nanocristales de almidón se realizó mediante la metodología propuesta por Gong [39]. El procedimiento se detalla en la fig.3.3, los almidones se suspendieron en una solución de alcohol isopropílico



**Fig.3.3** Proceso de aislamiento de los nanocristales de almidón.

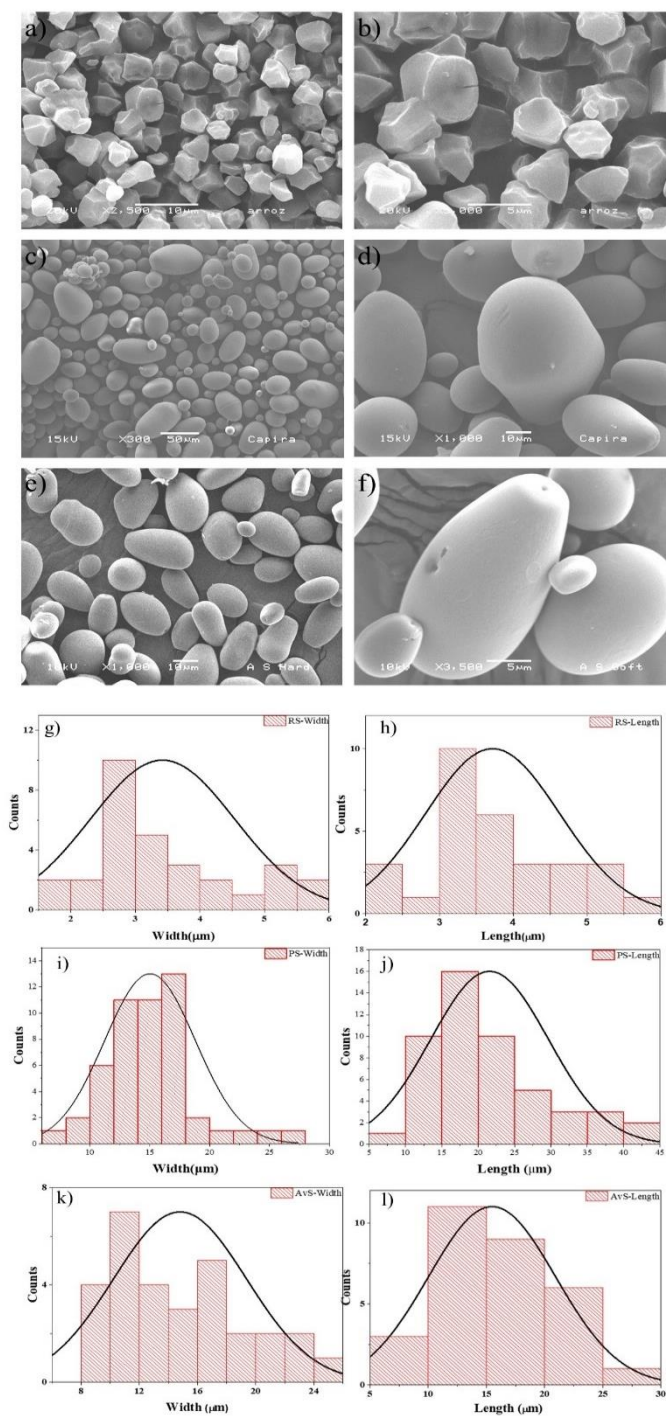
# Capítulo 4

## Análisis de resultados

### 4.1 Análisis morfológico de los almidones

Las imágenes MEB de los gránulos de A-Ar in la fig.4.1 (a) y (b) muestran diferentes aristas puntiagudas con una forma irregular, poligonal o poliédrica. Los gránulos del almidón aislado de A-Ar son lisos, sin daños ni fracturas; las distribuciones de longitud y anchura del almidón se obtuvieron de las fig. 4.1 (g) y (h), la anchura media es  $3.72 \pm 0.33 \mu\text{m}$ , y su longitud media es  $3.42 \pm 0.41 \mu\text{m}$ . Estas imágenes confirman que los gránulos de almidón son micropartículas.

La fig. 4.1 (c) y (d) muestra las imágenes MEB de A-Pa, estos exhiben formas de almidones pequeños y grandes. Los gránulos pequeños tienen formas esféricas; la fig.4.1 (i) y (j) muestra la anchura y la longitud medias de los gránulos, la cual es  $8,10 \pm 2,01$  y  $7,30 \pm 3,01 \mu\text{m}$ , respectivamente. En el caso del almidón de A-Ag estos gránulos exhiben morfológicas lenticulares, esféricas e irregulares similares a las peras. Las distribuciones de longitud y anchura de los almidones aislados fueron obtenidas de la fig.4.1 (c) y (d), la fig 4.1 (k) y (l) muestra su anchura media es de  $14.84 \pm 1.67 \mu\text{m}$  y su longitud media es  $15.48 \pm 2 \mu\text{m}$ . Por supuesto que la difusión de agua dentro de estas macroestructuras es afectada por sus tamaños, formas y composición.



**Fig.4.1** Micrografías MEB de (a) A-Ar a 1.000 $\times$ , (b) A-Ar a 2.500 $\times$ , (c) A-Pa a 300 $\times$ , (d) A-Pa 1.000 $\times$ , (e) A-Ag a 1.000 $\times$ , (f) A-Ag a 3.500 $\times$ , (g) anchura del A-Ar, (h) longitud del A-Ar , (i) anchura del A-Pa, (j) Longitud del A-Pa, (k) Anchura del A-Ag, y (l) Longitud del A-Ag de la distribución de tamaños.

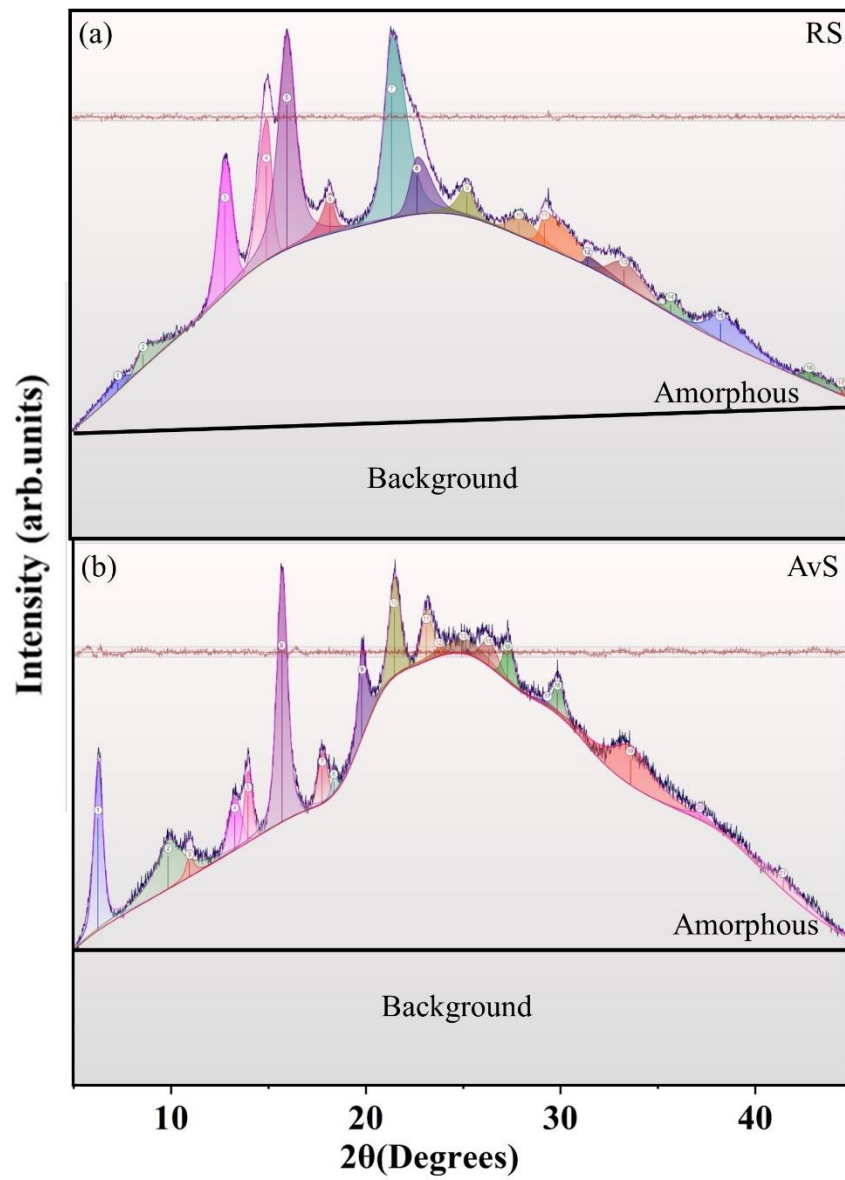
## 4.2 Análisis del patrón de difracción de rayos-X.

Antes del análisis de los patrones de difracción de rayos X de estas muestras, es importante señalar que un patrón de rayos X está formado por tres componentes: fondo, región amorfa y región cristalina. El fondo incluye el instrumento y el ruido electrónico. La región amorfa se origina a partir de la dispersión de rayos X en los compuestos amorfos. Finalmente, la región cristalina corresponde a la dispersión elástica de los cristales; en el caso de los nanocristales, esta región tiene la contribución simultánea de dispersión elástica e inelástica [79].

La terminología utilizada para estudiar las propiedades estructurales del almidón sigue siendo confusa. Desde un punto de vista físico, la cristalización es un proceso de concentración de una solución a un estado sobresaturado para causar la formación de cristales ordenados sólidos en una fase homogénea. Además, es el proceso en el que los cristales se forman ya sea a partir de algo que se ha fundido o de una solución. El sistema sufre un desorden para ordenar la transición (aumentando la entalpía del sistema). Mientras que el término recristalización se refiere a una mejora de un material ya cristalizado (ordenado a una estructura más ordenada), y puede ocurrir por procesos físicos, químicos o combinados. Este proceso es el que ocurre cuando el almidón se seca, la pérdida de moléculas de agua; cuando el almidón se humedece de nuevo, la estructura es más cristalina. Este proceso es relativo a cada almidón y se refleja en su patrón de rayos X. La recristalización es un parámetro relacionado con el orden estructural de la estructura cristalina. Buena calidad cristalina se puede observar en una X-patrón de rayos, y se refiere a una comparación de estructura ordenada alta entre un patrón bien conocido que por lo general tiene una estructura ordenada alta tiene un alto orden y otro patrón de la misma composición que estaba sujeto a cualquier tratamiento físico-químico.

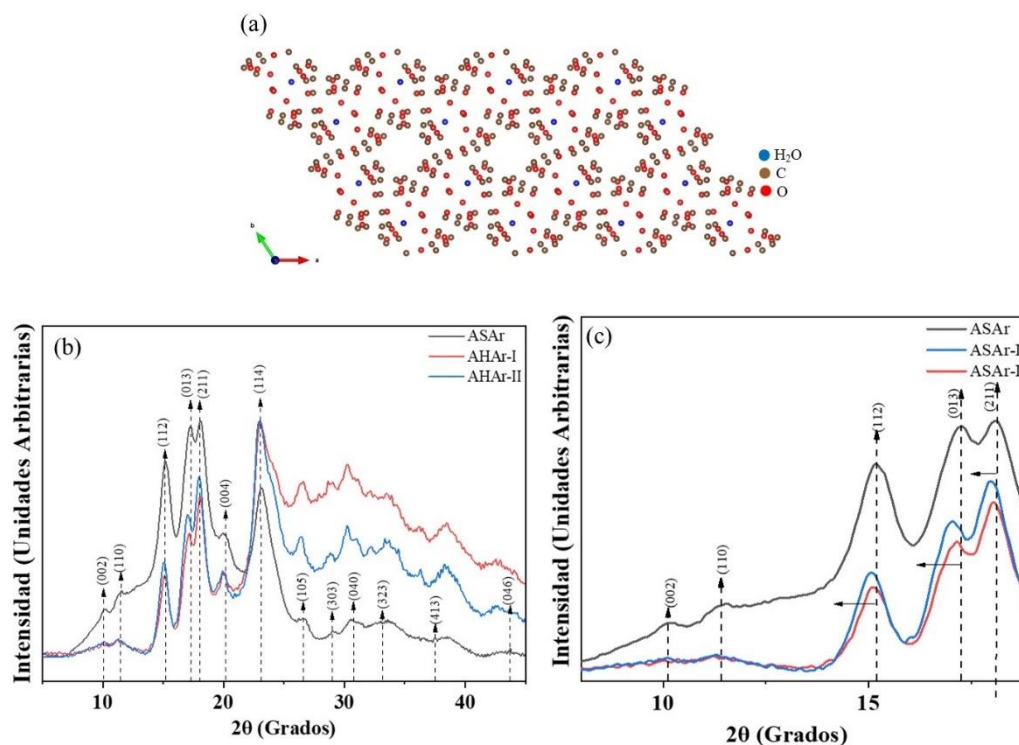
Fig.4.2 (a) muestra los de rayos-X de SAAR y (b) corresponde al patrón de difracción del almidón aislado de SAAG. La región cristalina fue cuantificada usando el software Jade Versión 8.5. En estos patrones, se identificaron el fondo, lo amorfo y las partes cristalinas. La parte cristalina del patrón representa todos los picos de difracción permitidos. El patrón para A-Ar indicó que el 10,68% corresponde a una región cristalina, y para AHAg fue del 8,69%. Estos hallazgos confirman que el almidón está en parte formado por estructuras cristalinas. Según Kim [80] y Kim [74], la parte cristalina del patrón está formada por nanocristales. Gong [39], mostraron que los cristales presentes en el almidón tienen tamaño nanométrico; este hecho implica que el patrón de rayos X del almidón exhibe picos amplios debido a la contribución simultánea de la dispersión elástica e inelástica [79], y no se debe al carácter semicristalino o amorfo de las estructuras presentes en el almidón. Sobre la base de las imágenes SEM y los patrones de rayos X, el almidón puede redefinirse como una micro o submicro partícula que contiene compuestos amorfos y nanocristalinos. En la siguiente sección, estos almidones serán indexados usando la indexación propuesta por Rodríguez-García [11]. Fig. .4.2(a) Patrón de rayos X de A-Ar aislado, (b) Patrón de rayos X de A-Ag aislado húmedo. Ambos mostraban la región amorfa.





**Fig. 4.2** (a) Muestra el patrón de rayos X del ASAr, y (b) corresponde al patrón de rayos X del almidón seco aislado de ASAg.

### 4.3 Efecto del agua en los patrones de difracción de rayos X de los almidones aislados húmedos y secos



**Fig. 4.3** (a) [001] vista de la estructura ortorrómbica centrada en el cuerpo; (b) patrón de difracción de rayos X de ASAr, AHAr-I y AHAr-II aislados, (c) Acercamiento del ASAr desde 5 a 20 grados en  $2\theta$  en el patrón de difracción de rayos-X, en los almidones húmedos I y II se marcan los índices de Miller (121), (031) y (211).

La [001] vista de la estructura ortorrómbica centrada en el cuerpo se muestra en la Fig. 4.3 (a), las moléculas de agua representadas en esta figura (azul) están unidas. Fig. 4.3 (b) muestra los patrones de rayos X de ASAr, AHAr-I y AHAr-II para tres condiciones de humectación diferentes. Los patrones se movieron hacia arriba para la visualización. La humedad inicial para las muestras fue del 48,60 %, después de la primera pasada fue del 45,05 %; para la segunda pasada, la humedad inicial fue del 45,05 % y el 43,53 % final, y para la tercera pasada, La humedad inicial fue del 43,53 % y la humedad final del 36,42 %. Un punto importante en estos patrones es que el fondo se rige en parte por la presencia de agua. Según las medidas de humedad, si la humedad (agua) disminuye. El exceso (sin consolidar) de agua también participa en la dispersión no elástica. Las líneas negras identifican los picos de difracción más intensos para la estructura cristalina ortorrómbica. El efecto del agua en esta estructura es completar el agua enlazada y mejorar su estructura cristalina, lo que resulta en la recristalización de la estructura.

Como en el caso de ASAg, los picos de almidones húmedos muestran diferentes comportamientos. En este caso, esta estructura no se completa en comparación con una estructura hexagonal. No tiene un patrón de difracción tan cristalino como el de la estructura hexagonal. La tabla 1 compara el deslizamiento de los picos reportados por Rodríguez-García [11]. Los picos de difracción de una estructura hexagonal no se encontraron en el SR utilizando el segundo criterio derivado para indexar el patrón, lo que significa que el almidón de arroz puede clasificarse como un tipo A.

Fig. 4.3(c) muestra una sección en diferentes  $2\theta$  de los patrones de difracción mencionados anteriormente (ver Fig. 4.3(b), 5 a 17.5 °), donde se puede observar el desplazamiento correcto de los picos entre almidones húmedos y secos (ver flechas), indicando un aumento en los parámetros de la red; mostrando un patrón más cristalino de ASAr-II. Los almidones estudiados mostraron que el agua a temperatura ambiente actúa como un elemento de recristalización en muestras secas porque estos almidones tienen una estructura cristalina incompleta. La difusión (entrada) y difusión de las moléculas de agua en estas estructuras son reversibles.

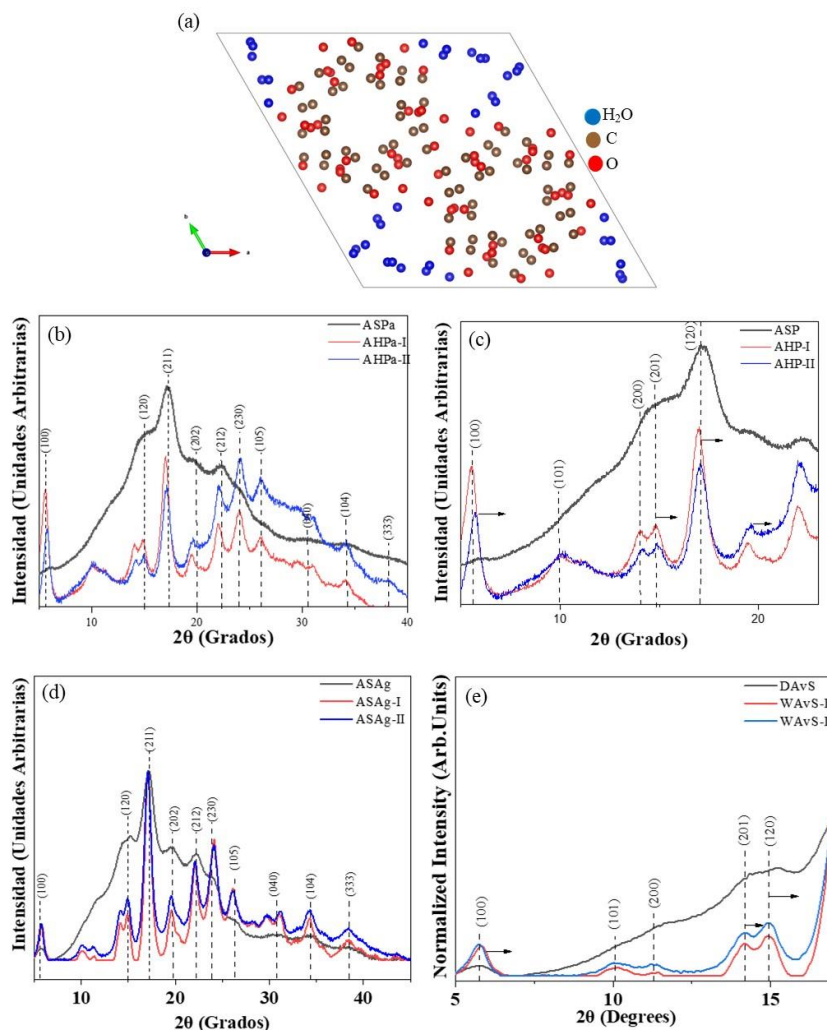
**Tabla 3.3** Comparación entre el almidón seco teórico y los picos experimentales de AHAr-I y AHAr-II.

Posición teórica del pico* ( $2\theta$ )	ASAr (posición del pico $2\theta$ )	AHAr-I (posición del pico $2\theta$ )	AHAr-II (posición del pico $2\theta$ )	Indice Miller	Diferencia $2\theta_D$	Diferencia $2\theta_I$	Diferencia $2\theta_{II}$	Fase
9.980	9.9600	----	9.980	002	0.002	---	0	Ortorrombica
11.1939	11.4300	----	11.2233	110	-0.2361	----	0	Ortorrombica
15.0180	15.0700	15.0880	15.0880	112	-0.052	0	0	Ortorrombica
17.1435	17.3300	17.1634	17.0390	103	-0.1865	0.088	0.221	Ortorrombica
18.9081	18.1300	18.0838	17.9500	211	0.7781	-0.074	0.059	Ortorrombica
20.0366	19.9500	20.0366	20.0366	004	0.0866	0	0	Ortorrombica
23.6838	23.1600	23.0290	22.9500	213	0.5238	0	0.079	Ortorrombica
24.2364	----	24.2364	----	130	----	0	----	Ortorrombica
26.2609	26.8100	26.5703	26.4280	015	-0.549	0.099	0.241	Ortorrombica
29.2504	29.0600	28.8900	28.8480	303	0.1904	0.360	0.402	Ortorrombica
30.4843	30.3700	30.2040	30.2240	040	0.1143	0.348	0.328	Ortorrombica

<b>32.1523</b>	----	----	32.1480	042	----	----	0.004	Ortorrombica
<b>33.0773</b>	33.2100	33.4510	----	323	-0.1327	-0.246	----	Ortorrombica
<b>36.3803</b>	36.5600	36.3803	----	242	-0.1797	0	----	Ortorrombica
<b>38.3572</b>	38.8200	38.5330	----	422	-0.4628	-0.178	----	Ortorrombica
<b>43.4826</b>	43.7100	43.1450	----	046	-0.2274	0.337	----	Ortorrombica
<b>47.6441</b>	----	47.4733	----	345	----	0.171	----	Ortorrombica

\*Rodríguez-García [33]

Los parámetros de celda unitaria para el ASAr aislado se calcularon como en el caso de ASAg usando la Ec. (3). Los valores constantes de los parámetros obtenidos para ASAr son  $a = 10.6901$ ,  $b = 11.7199$ , y  $c = 17.7117 \text{ \AA}$ , para las distancias interplanares 9.1522, 7.8980 y 4.6896 Å de (101), (110), y (211) aviones, respectivamente. Para el caso de AHAr-I y AHAr-II, el valor de los parámetros de celosía es  $a = 10.6344$ ,  $b = 11.5732$ , y  $c = 17.7060$  para las distancias interplanares 5.1605, 5.8653 y 4.4265 Å para (103), (112) y (004), respectivamente. El método de Cohen corroboró los valores de los parámetros de almidones y féculas (Cullity & Stock [38]). Como se puede ver, el agua enlazada aumenta los parámetros de la red



**Fig. 4.4** (a) [001] vista de la estructura hexagonal. (b) Patrones de difracción de rayos X de ASPa, AHPa-I, AHPa-II y (d) AAHAg-II, AHAg-I, y ASAg.

Fig. 4.4 (a) muestra la ocupación de moléculas de agua en el canal central a lo largo de [001] para la estructura hexagonal [33]. Fig. 4.4 (b) muestra los patrones de difracción de rayos X de ASPa, AHPa-I, AHPa-II, para ver los cambios estructurales todos los ángulos bajos Fig. 4.4 (c) muestra la amplificación de estos patrones de 5 a 17.5°. Como se puede ver, la entrada de agua en los cristales, mejora la estructura cristalina, revelando cada uno de los picos de difracción permitidos.

La muestra húmeda (A-Ag) se estudió mediante difracción de rayos X para comprender el efecto de las moléculas de agua sobre las estructuras cristalinas presentes en el almidón. Fig. 4.4 (d) muestra los patrones de rayos X de AHAg-II, AHAg-I y ASAg. La humedad inicial (agua contenida y añadida en almidón) para esta muestra fue del 48,60 % después de las 24

horas. La humedad de la muestra en el segundo patrón fue del 39,84 %. El tercer recorrido se realizó después de 4 h y su humedad fue del 14 %. Las líneas de rayas en estos patrones corresponden a la indexación cristalina e identifican los picos relativos más intensos para la fase hexagonal. Este proceso ayudó a identificar los picos del difractograma de rayos X. Sin embargo, exhibe la presencia de cristales ortorrómbicos, como también fue reportado por Esquivel-Fajardo [78]. Fig. 4.4 (e) muestra la amplificación de estos patrones de 5 a 17.5°. Cuando el contenido de humedad disminuye (AHAg-I), el patrón de rayos X muestra un fondo cero entre 5 y 15°, y casi todos los picos difractados permitidos se revelan, lo que indica que la mejor calidad del cristal se logra cuando las moléculas de agua completan la estructura. Cuando el almidón pasa por un proceso de secado, pierde agua disminuyendo la calidad cristalina.

En cuanto a la intensidad del patrón de rayos X, si el número de moléculas de agua enlazadas disminuye, se modifican la estructura y los factores de forma; por lo tanto, la intensidad cambia. Estos patrones muestran que el agua juega un papel esencial en su formación. Cuanto mayor sea el contenido de humedad, más definidos serán los patrones. Cuando el contenido de humedad disminuye (AHAg-I), el patrón de rayos X muestra un fondo cero entre 10 y 20°, y casi todos los picos difractados permitidos se revelan, lo que indica que la mejor calidad del cristal se logra cuando hay una molécula de agua completa en la estructura. Cuando el almidón pasa por un proceso de secado, pierde agua disminuyendo la calidad cristalina. El patrón de ASAg exhibe picos amplios característicos de los nanocristales [1]. Después de 4 h, la muestra seca (ASAg) exhibe un patrón en el que algunos picos difractados no se evidencian, métodos matemáticos como la deconvolución permiten observar de estos picos. Desde un punto de vista cristalográfico, el cristal está formado por una estructura (redes de Bravais) y una base. Como se puede ver en la Fig. 4.4(a) la base por punto contiene unidades de glucosa y agua que se pierde por el secado.

La presencia de componentes amorfos se refleja en el ensanchamiento del pico y la elevación basal, que pueden asociarse con el trastorno en la muestra, el tamaño cristalino nanométrico y las cepas macro. El cambio máximo se debe a la finalización de la estructura cristalina (ver Fig. 4.4 (b)). Entre los almidones húmedos, se puede concluir que AHAg-II tiene un patrón de difracción más definido. La Tabla 1 compara el deslizamiento de los picos reportados por Rodríguez-García [11].

Al completar el cristal, el patrón de difracción muestra desplazamientos en los picos teóricos (considerando el contenido de agua completo). El criterio de la segunda derivada se utilizó para calcular la posición del pico y su desplazamiento: Aunque permitió encontrar picos intrincados de la estructura ortorrómbica. El cambio máximo de almidones húmedos se calculó a partir de los picos teóricos del almidón seco. El ASAg mezcla ambos tipos de nanocristales, pero los hexagonales tienen más moléculas de agua que los ortorrómbicos. En el caso de A-Ag aislados, la fase hexagonal encontrada hasta la fecha es la que tiene la mejor definición de pico e indexada. Aquí, el desplazamiento a la izquierda no corresponde al crecimiento del cristal. Por el contrario, los cristales reducen los parámetros de la red cuando el almidón está seco.

**Tabla 3.2** Comparación entre el almidón seco teórico y los picos experimentales de AHAg-I y AHAg-II.

Posición del pico teórico (20)	ASAg (Posición del pico 20)	AHAg-I (Posición del pico 20)	AHAg-II (Posición del pico 20)	Indice Miller	Diferencia 20 <sub>D</sub>	Diferencia 20 <sub>I</sub>	Diferencia 20 <sub>II</sub>	Fase
5.5056	5.7056	5.8375	5.8375	100	-0.200	-0.3319	-0.3319	Hexagonal
10.0140	9.8939	10.1217	10.1217	101	0.1201	-0.1077	-0.1077	Hexagonal
11.0240	11.5617	11.2233	11.2212	200	-0.537	-0.1993	-0.1972	Hexagonal
13.8500	14.2578	14.1619	14.1632	201	-0.407	-0.3119	-0.3132	Hexagonal
14.6003	14.9850	14.9180	14.9186	120	0.0959	-0.3177	-0.3186	Hexagonal
17.6550	17.1671	17.0880	17.0850	102	0.4879	0.567	0.570	Hexagonal
19.1537	19.6120	19.0853	19.0591	220	-0.458	0.0684	0.0946	Hexagonal
22.1516	22.2959	22.0759	22.0759	400	-0.144	0.0757	0.0757	Hexagonal
24.1679	24.1053	24.1679	24.1608	230	0.0626	-----	0.0007	Hexagonal
26.1167	26.3337	26.1092	26.1092	310	-0.217	0.0007	0.0007	Ortorrombica
28.0219	28.2140	28.3640	28.3640	312	-0.192	-0.3421	-0.3421	Ortorrombica
28.7266	-----	28.6936	28.6936	231	-----	0.033	0.033	Ortorrombica
29.2949	-----	29.7709	29.7703	213	-----	-0.476	-0.4754	Hexagonal
30.3578	30.4092	30.4710	30.4710	303	-0.051	-0.1132	-0.1132	Hexagonal
30.6599	-----	31.2856	31.2850	421	-----	-0.6257	-0.6251	Hexagonal
31.0195	-----	31.0553	31.0550	510	-----	-0.036	-0.036	Hexagonal
34.3669	34.2088	34.2777	34.2779	104	0.1581	0.0892	0.089	Hexagonal
38.1101	38.4347	38.4379	38.4379	342	-0.324	-0.3278	-0.3278	Hexagonal
43.6013	-----	43.4751	43.4751	442	-----	0.1262	0.1262	Hexagonal

En la Tabla 2, se reportan los valores de las posiciones de los picos teóricos, experimentales de los almidones secos y húmedos, respectivamente. Los valores teóricos se reportaron por Rodríguez-García [11] para almidones secos, sin embargo los valores reportados para los almidones húmedos mostraron picos más intensos tanto para la estructura ortorrómbica como para la hexagonal.

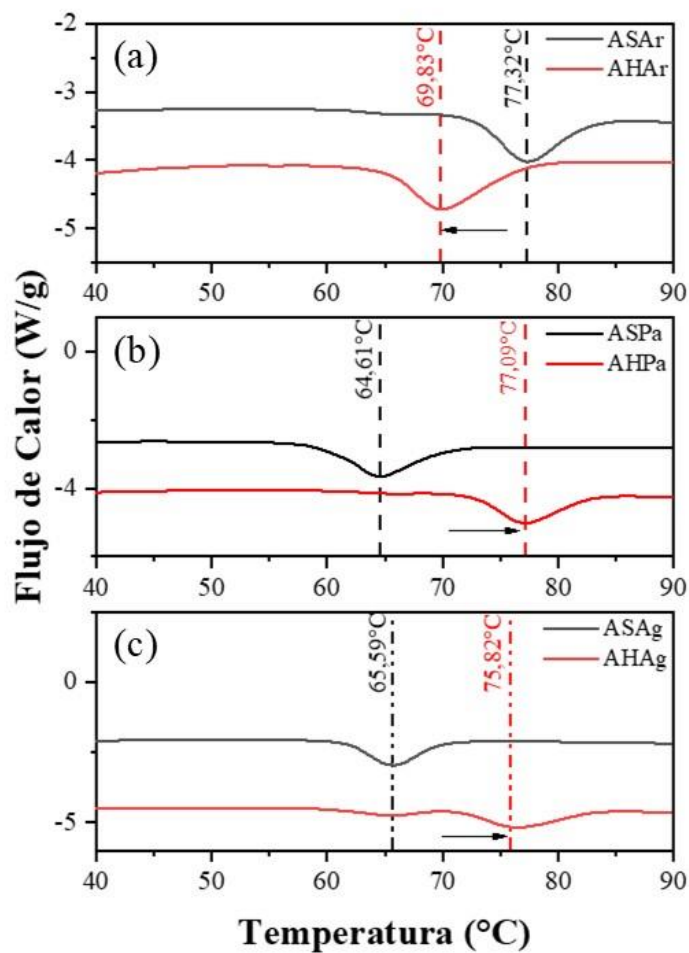
Los valores de parámetro obtenidos para ASAg son  $a=b=18.5202 \text{ \AA}$  y  $c=10.5701 \text{ \AA}$  se obtuvieron a partir de las distancias interplanares  $16.0389 \text{ \AA}$  y  $8.8258 \text{ \AA}$  para (100) y (101), respectivamente. En el caso de AHAg-I y AHAg-II, el valor de los parámetros de celosía es  $a=b=18.2611$  y  $c=10.4686$  calculados a partir de las distancias interplanares  $15.8146$  y  $8.7293 \text{ \AA}$  para (100) y (101), respectivamente.

#### 4.4 Análisis termogravimétrico

La Fig. 4.5 (a), (b), y (c) muestra los termogramas DSC de almidón aislado de arroz, papa y aguacate obtenidos inmediatamente después de la preparación de la muestra y después de las 24 h. En estas figuras se presenta un evento endotérmico. Este evento se conoce como gelatinización, Fig. 4.2 (b), Fig. 4.3 (b), y (d) muestran que la inclusión de agua produce una recristalización en los nanocristales hexagonales y ortorrómbicos. Estos cristales no son perfectos, porque algunos defectos como vacantes, inclusiones, átomos sustitutivos o intersticiales provenientes de los minerales afectan el orden cristalino y la cristalinidad [38]. Estos defectos juegan un papel importante en el proceso de gelatinización. Esquivel-Fajardo [78] definió la gelatinización como la transición irreversible del desorden de orden que tiene lugar debido a la solvatación de nanocristales en presencia de calor y agua. Según Pérez & Bertoft [81], los componentes cristalinos comprenden nanocristales plaquetarios que ya han sido identificados y caracterizados, y otros "componentes Blocklet" caracterizados, que hasta ahora están aún en estudio.

Fig. 4.5 (a) muestra el termograma DSC de ASAr y AHAr (24 h); debido al proceso de humectación en condiciones de temperatura casi constante (4°C), algunas moléculas de agua pueden entrar en la estructura de nanocristales (ortorrómbica) y estar situado en los sitios de celda que corresponde al agua estructural. Para el arroz, esta agua mejora la calidad cristalina, aumentando la energía interna del sistema para tiempos de remojo cortos, como se demostró usando patrones de rayos X. Sin embargo, para tiempos de remojo prolongados, el termograma DSC muestra un cambio a la izquierda en la temperatura de gelatinización. Podría interpretarse como que el exceso de agua durante períodos prolongados afecta la estructura interna de estos nanocristales. Fig. 4.5 (b) muestra el termograma DSC para almidón de papa que muestra una tendencia opuesta. Aquí, es importante recordar que las estructuras hexagonales tienen más moléculas estructurales de agua y el secado elimina algunas de ellas y después de humedecer estas moléculas se incorporan de nuevo en la estructura, aumentando su energía interna y requiriendo más energía para ser solvatada. Estos termogramas indican que la solvatación es el proceso físico que produce la gelatinización. Hasta el momento no se ha informado sobre la solvatación polimérica.





**Fig. 4.5** Termogramas DSC de almidones de arroz (a), papa (b) y aguacate (c) aislados durante 0 h y 24 h después de la preparación.

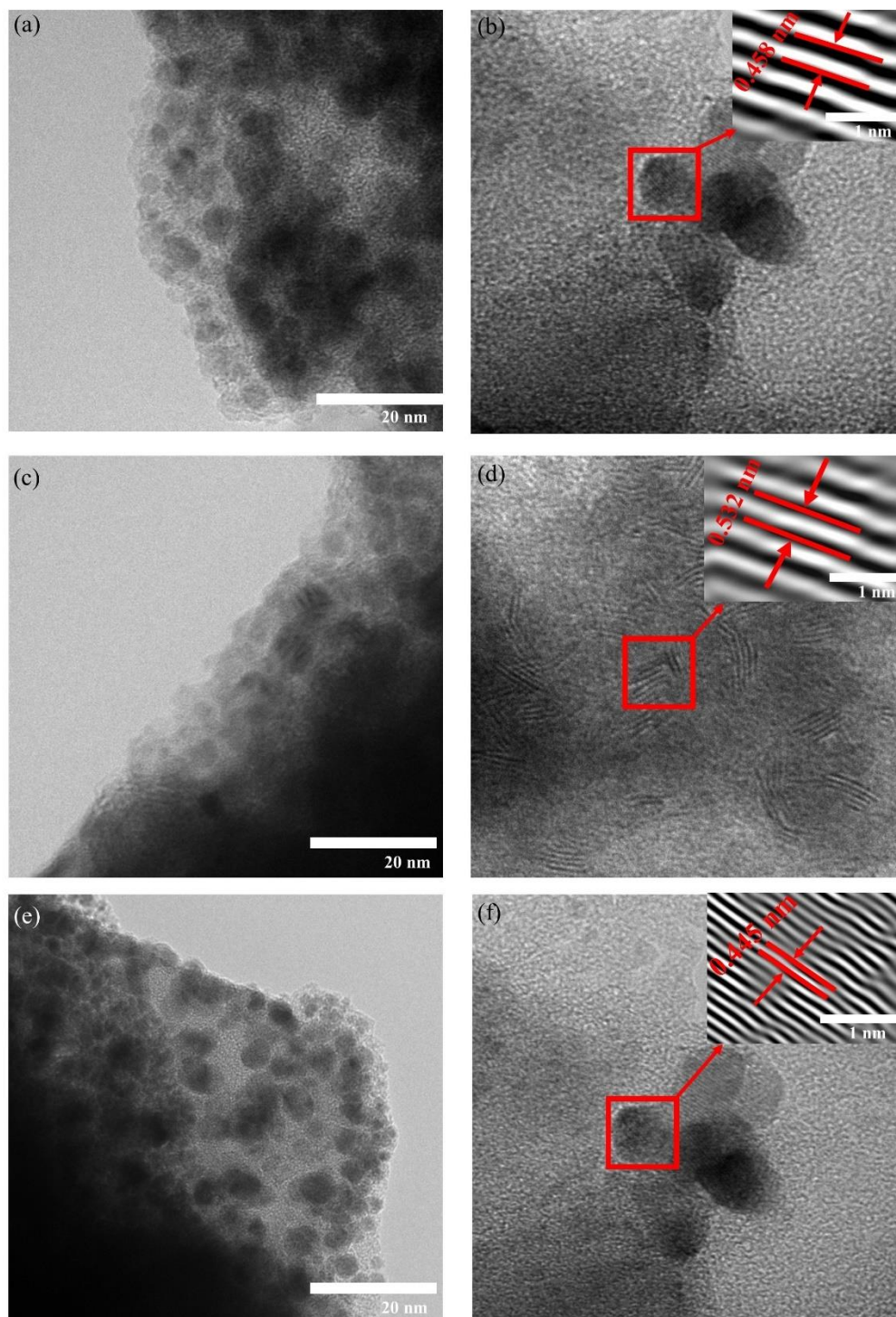
## 4.5 Análisis de los nanocristales aislados de almidón tipo-B

Los nanosistemas obtenidos a partir de almidón pueden clasificarse en dos grupos principales: nanocristales de almidón y nanopartículas de almidón. Los primeros se obtienen por la hidrólisis de la fase amorfa del gránulo de almidón, esto permite aislar la fase cristalina. Por otro lado, las nanopartículas son completamente amorfas se obtienen por la precipitación controlada de almidón gelatinizado [25].

El aislamiento de los nanocristales de almidón se realizó mediante la metodología descrita en la Fig.4.6 Las muestras se caracterizaron por medio del Microscopio electrónico de Transmisión (MET), la Fig. 4.6 (a), (c) y (e) muestra los nanocristales de almidón tipo-B con formas redondas u ovaladas que van desde los 10 a 20 nm, la morfología y el tamaño de los Np-Aais no es exactamente igual que en los gránulos de almidón puede variar de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos utilizados para su preparación [80]. Gong [39], definió los nanocristales como partículas libres que se encuentran dentro de la estructura interna del almidón junto con componentes amorfos (amilosa, amilopectina, grasas, proteínas, lípidos) completamente degradables después de un proceso químico. Esto apoya la afirmación de que la estructura cristalina de los Np-Aais preparados se obtiene de la cristalinidad de los gránulos normales de almidón [80] [82].

La muestra de Np-Aais se estudió mediante el Microscopio electrónico de Transmisión para corroborar la existencia de cristales presentes en la estructura interna del almidón nativo. La Fig.4.6 (a), (c) y (e) muestra los Na-As para el almidón de AAg que posee una estructura cristalina hexagonal y ortorrómbica clasificándose como tipo-C, esto puede corroborarse con los resultados obtenidos en difracción de rayos X (ver Fig.4.4 (d)) donde se puede apreciar casi todos los picos difractados de ambas estructuras después de un proceso de interacción con moléculas de agua [9]. Se realizaron las mediciones luego de un tratamiento de hidrólisis con  $H_2SO_4$  (durante 7 días) y amoníaco, las imágenes obtenidas mediante el MET muestran la eliminación de regiones amorfas, debido a que las regiones cristalinas en los gránulos de almidón son más resistentes a la hidrólisis acida, por lo tanto, las mitades cristalinas pueden ser aisladas. Quedando de esta manera los nanocristales de almidón en la solución [80].

Los análisis de las imágenes se realizaron mediante el Software DigitalMicrograph, la Fig.4.6 (b), (d) y (f) muestra las ampliificaciones (ver flechas) de las distancias interplanares, siendo 0.458 (202), 0.532 (300) y 0.445 (130) nm los valores respectivos teniendo en cuenta los planos de cada uno. Como en el caso del A-Ag los Np-Aais exhibieron la presencia de cristales hexagonales y ortorrómbicos [78]. Las micrografías MET muestran la disposición de los planos cristalinos en diferentes direcciones lo que corrobora la existencia de ambas fases cristalinas. La indexación de las distancias interplanares se pueden observar en la Tabla 3, los valores obtenidos se compararon con los reportados por Rodríguez-García [11].

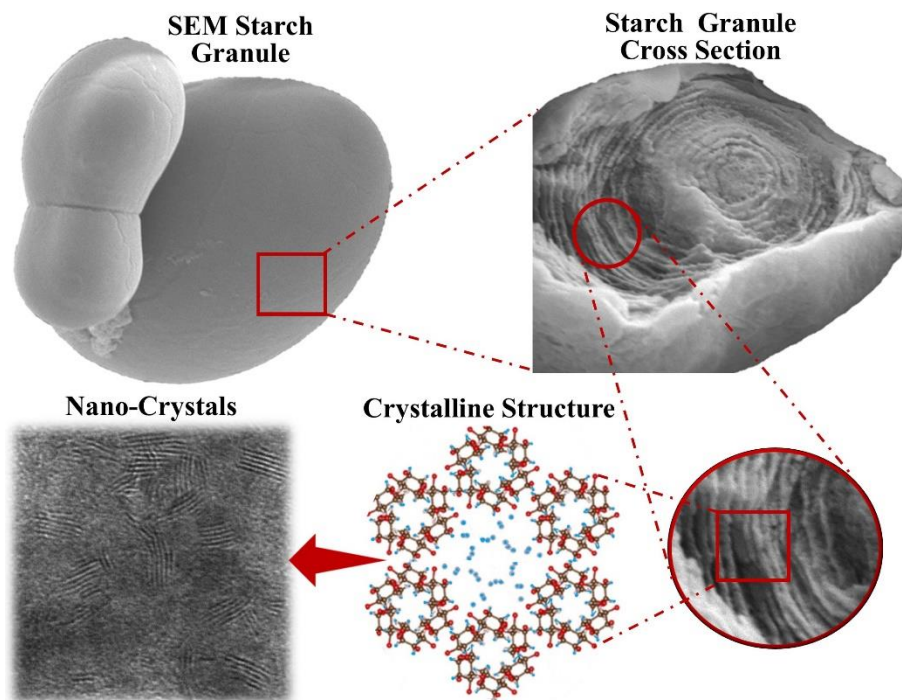


**Fig.4.6** Micrografías TEM de los Np-Aais preparados por hidrolisis acida con  $H_2SO_4$  (a-f), (b-d-f) acercamiento y ampliación de los planos cristalinos de (a), (c) y (d) respectivamente.

**Tabla 3.3** Indexación de las distancias interplanares de la muestra de Np-Aais.

Distancia Interplanar (Å)	Índice de Miller	Fase
6.3888	201	Hexagonal
6.0621	120	Hexagonal
5.3263	300	Hexagonal
5.8933	112	Ortorrómico
4.4484	130	Hexagonal
4.5761	202	Ortorrómico
4.2410	221	Hexagonal
3.4834	222	Hexagonal
3.3632	105	Ortorrómico
3.2589	033	Ortorrómico
3.1943	402	Hexagonal
3.0312	420	Hexagonal
2.9587	331	Hexagonal
2.8644	215	Ortorrómico
2.6395	242	Hexagonal
2.5734	411	Ortorrómico

La Fig. 4.7 muestra esquemáticamente la formación de Np-Aais a partir de la hidrolisis acida de los gránulos de almidón, las regiones amorfas del almidón se rompen mientras que la fase cristalina se mantiene. Como resultado los nanocristales libres representan la morfología.



**Fig. 4.7** Proceso de formación de los Na-As a partir de la hidrolisis acida de  $H_2SO_4$ .

## 4.6 Parámetros cristalinos

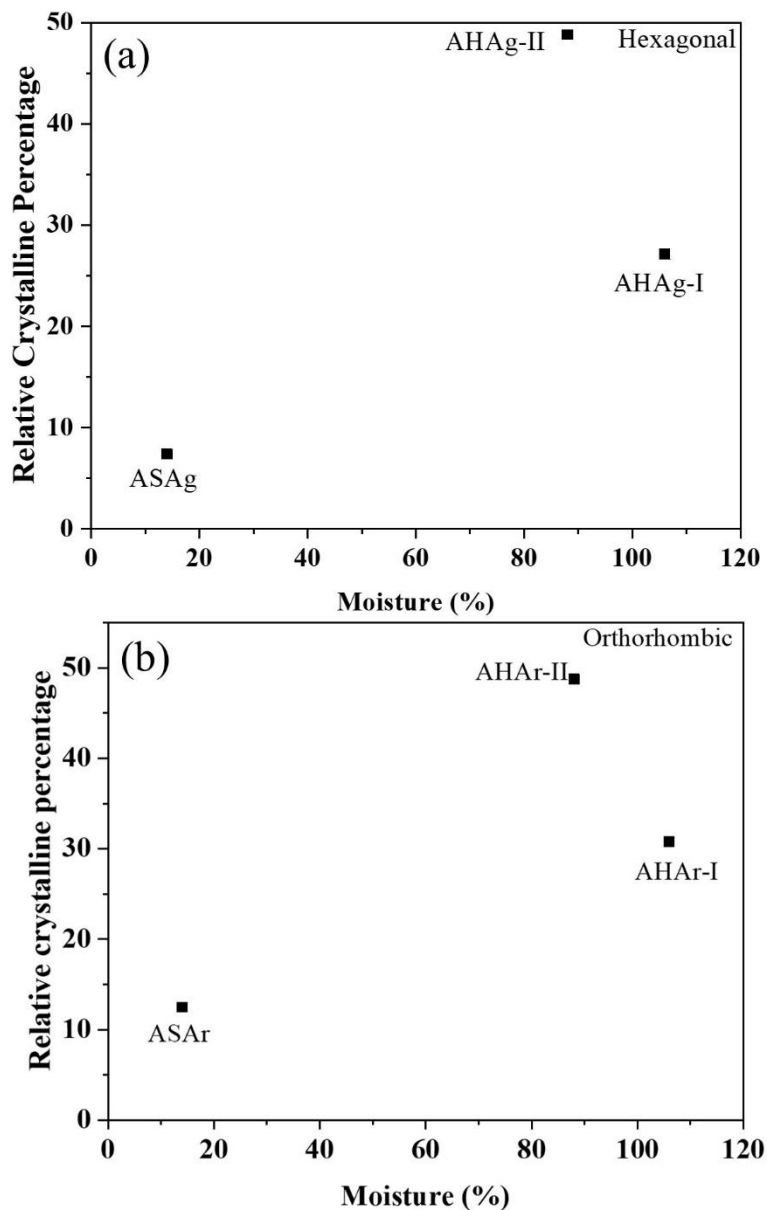
Uno de los problemas relacionados con la determinación y cuantificación de la calidad de la cristalinidad es la definición de un parámetro o parámetros que evalúan el estado cristalino. El porcentaje de cristalinidad se ha obtenido solo en muestras secas. Se relaciona con el porcentaje de la región cristalina respecto al área total del patrón [83]. Sin embargo, como fue mencionado por Londoño-Restrepo [79], el patrón de rayos X del cristal nanométrico incluye las contribuciones de dispersión elástica e inelástica. Esto significa que el área cristalina incluye una fracción de la función instrumental del sistema (dispersión inelástica). Teniendo en cuenta el análisis anterior, la intensidad de los picos difractados aumenta para algunos contenidos de agua. Este hecho se basa en la ocupación de moléculas de agua en estos planos que contribuyen a los factores de forma y estructura. Entonces, el porcentaje cristalino debe ser referido como un porcentaje cristalino relativo.

La humedad juega un papel importante porque el patrón de difracción de rayos X del almidón depende de la cantidad de agua unida. Este hecho puede ser corroborado por los resultados obtenidos por difracción de rayos X donde los almidones húmedos exhibieron un patrón más cristalino con respecto al almidón seco. La mejor manera de obtener un patrón de rayos X para identificar la estructura cristalina del almidón es cambiando el contenido de humedad y estudiando los comportamientos de intensidad. Como se demostró, la intensidad del patrón de rayos X depende de la cantidad de moléculas de agua en la red. Ec. 4 puede ser utilizado para determinar la % cristalinidad,  $A_T$  es el área total del patrón, el ruido corresponde al ruido electrónico e instrumental. Aquí, es importante recordar que la inclusión de área cristalina bajo la curva en el caso de las nanopartículas está formada por las contribuciones elásticas e inelásticas.

$$\%Crystallinity = \frac{CrystallineArea(elastic+inelasticscatering)}{A_T - Noise} \quad Eq. 4$$

Volviendo a la determinación del área cristalina, la Fig. 4.8 (a) y (b) muestra el porcentaje cristalino relativo en función del contenido de humedad para almidones hexagonales (A-Pa) y ortorrómbicos (A-Ar) obtenidos usando la Ec. 4. Como puede verse, la cristalinidad de estos cristales depende de la cantidad de agua enlazada. Las muestras secas se modificaron extrayendo moléculas de agua. Las moléculas de agua entran en la estructura cristalina durante la hidratación, modificando los factores de forma y estructura, originando cambios en su intensidad. La intensidad depende de parámetros extrínsecos como preparación de muestras, acondicionamiento de muestras y parámetros instrumentales como condiciones de funcionamiento de tensión y corriente, entre otros, mientras que los parámetros intrínsecos están directamente relacionados con el número y tipo de átomos en la base por punto cristalográfico que contribuyen a los factores de forma y estructura. Esta figura muestra que

el exceso de agua produce un pariente perdido en el porcentaje cristalino porque el agua actúa como un agente dispersivo.



**Fig. 4.8** Porcentaje de cristalinidad de la estructura cristalina (a) hexagonal y (b) ortorrómbica.

# Capítulo 5

## Conclusiones

En esta tesis se estudió el papel que juega el agua en la estructura del almidón y como se refleja esto en los patrones de difracción de rayos X por polvos, debido al proceso de recristalización. Así mismo, se estudiaron los almidones con la técnica DSC para observar los cambios en la gelatinización debido a la incorporación de moléculas de agua en la estructura cristalina.

De los resultados de los almidones húmedos por DRX se concluyó que el agua forma parte de la estructura del almidón y los patrones de difracción lo evidencian debido a la cristalinidad que se aprecia en los diferentes picos. De esta manera las características observadas en un patrón de difracción de cualquier almidón consisten en: el fondo que incluye el ruido electrónico, la región amorfa que está relacionada por macromoléculas de amilosa y amilopectina y la región cristalina, que se atribuyen a los nanocristales de glucopiranosos los cuales se encontraron que pueden ser hexagonales y/o ortorrómbicos. De hecho, la cristalización en almidón no corresponde con ninguna cristalización polimérica. El ensanchamiento máximo de los picos permitidos difractados se originó por el tamaño de los nanocristales, y la contribución amorfa está relacionada con las fases amorfas y el exceso de agua. El agua enlazada contribuye a completar las estructuras cristalinas y mejorar la definición de los picos.

El agua juega un papel esencial en la recristalización, que es el procedimiento de incorporar agua en la red de cristal de almidón después de un proceso de interacción. Además, es un proceso reversible que se demostró con el patrón cristalino A-Ar, donde hubo una pérdida de las moléculas de agua debido a un proceso de secado que modificó su cristalinidad. Los patrones de difracción de rayos X de los almidones húmedos mostraron los parámetros de la red completa.

Estos valores se reportan en las Tablas 1 y 2 para las estructuras cristalinas hexagonales y ortorrómbicas. El proceso de incorporación de agua muestra que el almidón aislado de

cualquier fuente botánica no tiene una estructura cristalina única, como en el caso del aguacate.

Por otro lado, los experimentos de DSC demostraron que el agua juega un papel importante en la gelatinización, y esto puede definirse como una transición irreversible de orden-desorden, debido a la solvatación de estructuras cristalinas hexagonales y/o ortorrómbicas.

Por último, se logró el aislamiento de los nanocristales que corroboran la existencia de cristales ortorrómbicos y/o hexagonales dentro de la estructura interna del almidón, las micrografías TEM muestran las distancias interplanares y planos, estos valores se reportan en la Tabla 3 con la fase cristalina correspondiente. Este proceso reafirma que el almidón puede presentar ambas estructuras cristalinas (hexagonal y ortorrómbica), como se pudo observar en los resultados de rayos X para el caso del almidón de aguacate.

Por ahora se logró el aislamiento de los nanocristales de almidón de aguacate, se espera en un futuro realizar el aislamiento de nanocristales de almidón de otras fuentes botánicas y realizar un estudio a mayor profundidad por medio de diferentes técnicas de caracterización como Difracción de Rayos X, calorimetría diferencial de Barrido, entre otras.



# Referencias

- [1] Londoño-Restrepo, S.M., Rincón-Londoño, N., Contreras-Padilla, M., Millán-Malo, B., & Rodríguez-García, M.E. «Morphological, structural, thermal, compositional, vibrational, and pasting characterization of white, yellow, and purple Arracacha Lego-like starches and flours (Arracacha xanthorrhiza),» *Inte. J Biological Macromol*, vol. 113, pp. 1188-1197, 2018.
- [2] Vega-Rojas, L.J., Londoño-Restrepo, S.M., & Rodríguez-García, M.E. «Study of morphological, structural, thermal and pasting properties of flour and isolated starch unripe plantain (» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 183, pp. 1723-1731, 2021.
- [3] Zhou, T., Zhang, L., Liu, W., & Hu, H. «Rheological behaviors and physicochemical changes of doughs reconstituted from potato starch with different sizes and gluten,» *Food Research International*, p. 110397, 2021.
- [4] Kim, H.R., Choi, S. J., Choi, H.D., Park, C.S., & Moon, T.W. «Amylosucrase-modified waxy potato starches recrystallized with amylose: The role of amylopectin chain length in formation of low-digestible fractions,» *Food Chemistry*, vol. 318, p. 126490, 2020.
- [5] Kousksou, T., Jamil, A., El Omari, K., Zeraoui, Y., Le Guer, Y. «Effect of heating rate sample geometry on the apparent specific heat capacity: DSC applications.,» *Thermochimica Acta*, vol. 519, pp. 59-64, 2011.
- [6] Pineda-Gomez, P., Gónzales, N.M., Contreras-Jimenez, B., & Rodríguez-García, M.E. «Physicochemical Characterisation of starches from six potato cultivars native to the Colombian Andean Region.,» *Potato Research*, vol. 64, pp. 21-39, 2020.
- [7] Ruggero, F., Carretti, E., Gori, R., Lottu, T., & Lubello, C. «Monitoring of degradation of starch-based biopolymer film under different composting conditions, using TGA, FTIR and SEM analysis,» *Chemosphere*, p. 125770, 2020.
- [8] Wang, S., Li, Copeland, L., Niu, Q., Wang, S. «Starch Retrogradation: A Comprehensive Review,» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 14, pp. 568-585, 2015.
- [9] Esquivel-Fajardo, E.A., Martínez-Ascencio, E.U., Osguera-Toledo, M.E., Londoño-Restrepo, S.M., Rodríguez-García, M.E. «Influence of physicochemical changes of the

avocado starch throughout its pasting profile: Combined extraction.,» *Carbohydrate Polymer*, vol. 281, p. 119048, 2022.

- [10] Gutiérrez-Cortez, E., Hernandez-Becerra, E., Londoño-Restrepo, S.M., Rodríguez-García, M.E. «Physicochemical characterization of Amaranth starch insulated by mechanical separations.,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 177, p. 430–4, 2021.
- [11] Rodríguez-García, M. E., Hernández-Landaverde, M. A., Delgado, J. M., Ramírez-Gutiérrez, C. F., Ramírez-Cardona, M., Millán-Malo, B. M., & Londoño-Restrepo, S. M. « Crystalline structures of the main components of starch.,» *Current Opinion in Food Science*, vol. 37, pp. 107-111, 2021.
- [12] Oseguera-Toledo, M.E, Contreras-Jimenez, B., Becerra-Hernandez, E., & Rodríguez-García, M.E. «Physicochemical changes of starch during malting process of sorghum grain.,» *Journal of Cereal Science*, vol. 95, p. 103069, 2020.
- [13] Contreras-Jiménez, B., Torres-Vargas, O. L., & Rodríguez-García, M. E « Physicochemical characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and isolated starch.,» *Food Chemistry*, vol. 298, p. 124982, 2019.
- [14] Li, Y., Qi, Y., Li, H., Chen, Z., Xu, B, « Improving the cold water swelling properties of oat starch by subcritical ethanol-water treatment.,» . *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 194, pp. 594-601, 2022.
- [15] Hardy, K., Brand-Miller, J., Brown, K., Thomas, M.G., & Copeland, L. «The importance of dietary carbohydrate in human evolution.» *The quarterly review of biology*, 2015.
- [16] Ahituv, H., & Henry, A.G. «An initial key of starch grains from edible plants of the Eastern Mediterranean for use in identifying archaeological starches,» *Jornal Archaeol Science* , vol. 42, 1910
- [17] B. Herstein, «The Centenary of Glucose and the Early History of Starch,» *Journal of industrial* , pp. 311-330, 1910.
- [18] W. Hassid, «The molecular constitution of starch and the mechanism of its formation,» *the quarterly review of biology*, 1943.
- [19] K. Seetharaman., & E. Bertoft. «Perpectives on the history of research on starch part V: On the conceptualization of amylipectin structure,» *Starch- Starke*, vol. 65, n° 1-2, pp. 1-7, 2012.
- [20] Londoño-Restrepo, S.M., Rincon-Londoño, N., Contreras-Padilla, M., Acosta-Osorio, A.A., Bello-Perez, L.A., Lucas-Aguirre, V.D, Pineda-Gomez, P., Rodríguez-García, M.E. «Physicochemical morphological, and rheological characterization of

Xanthosoma robustum lego-like starch,» *International Journal Biological Macromolecules*, pp. 222-228, 2004.

- [21] Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. and Tang, M.C. «Form and Functionality of Starch. Food Hydrocolloid,» *Food Hydrocol*, pp. 1527-1534, 2009.
- [22] Kainuma, K., French, D «Naegeli Amylodextrin and Its Relationship to starch granule structure. II. Role of water in crystallization of B-Starch,» *Biopolymers*, vol. 11, pp. 2241-2250, 1972.
- [23] Oates, C. «Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis,» *Trends Food Science technology*, vol. 8, n° 11, pp. 375-382, 1997.
- [24] Perez, S., Baldwin, P.M., Gallant, D.J. «Structural features of starch granules,» de *Starch: Chemistry and technology* , New York, BeMiller, J, Whistler R, 2009, p. 176.
- [25] LeCorre, D., Bras, J., Dufresne, A .«Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals,» *Journal of nanoparticle research*, vol. 13, n° 12, pp. 7193-7208, 2011.
- [26] Imberty A, Chanzy H, Pérez S, Buleon, Tran V.«The doublehelical nature of the crystalline part of A-starch,» *Journal Molecular Biological* , vol. 201, pp. 365-378, 1988.
- [27] J Jane, J.L., Wong, K.S., McPherson, A.E.«Branch-structure difference in starches of A- and B type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans,» *Carbohydrated Research*, vol. 300, n° 3, pp. 219-227, 1997.
- [28] Cheetham, N.W.H., Tao, L. «Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study,» *Carbohydrated Polymers*, vol. 36, n° 4, pp. 277-284, 1998.
- [29] Dome, K., Podogorbunskikh, E., Bychkov, A., Lomovsky, O. «Changes in the Crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment,» *Polymers* , vol. 12, n° 3, p. 641, 2020.
- [30] Singh V., Ali S.Z., Somashekar R., Mukherjee P.S., «Nature of crystallinity in native and acid modified starches,» *International Journal Food Properties*, vol. 9, p. 845–854., 2006.
- [31] Munoz L.A., Pedreschi F., Leiva A., Aguilera J.M. «Loss of birefringence and swelling behavior in native starch granules: Microstructural and thermal properties,» *Microstructural and thermal properties. J. Food Eng.*, 2015.

- [32] Gavrilova K.V., Bychkov A.L., Bychkova E.S., Akimenko Z.A., Chernonosov A.A., Kalamber Y.A., Lomovskii O.I. «Mechanically activated hydrolysis of plant-derived proteins in food industry.,» *Foods Raw Mater*, 2019.
- [33] Rodriguez-Garcia M.E., Londoño-Restrepo S.M., Ramirez-Gutierrez, C.F., Millam-Malo B.M. «Effect of the crystal size on the X-Ray patterns of isolated orthorhombic starches: A-type».
- [34] Stribeck, N. «X ray scattering of soft matter,» *Springer- verlag*, 2002.
- [35] Gernat, C., Radosta, S., Anger, H., & Damaschun, G. «Crystalline parts of three different conformations detected in native and enzymatically degraded starches,» *Starch/Stärke*, vol. 45, n° 9, pp. 309-314, 1993.
- [36] Wennerstrom, H. «Scattering and diffraction described using the momentum representation,» *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 205, pp. 105-112, 2014.
- [37] Kittel, C. de *Introduction to Solid State Physics*, New York, Jhon Willey & Sons, 1996.
- [38] Cullity, B.D., & Stock, S.R. de *Elementas of X-ray diffraction*, London, Person New International edition, 2014, p. 375.
- [39] Gong, B., Lui, W., Tan, H., Yu, D., Song, Z., Lucia, L-A. «Understanding shape and morphology of unusual tubular starch nanocrystals,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 151, pp. 666-675, 2016.
- [40] M. J. K. & C. P. Alonso, «Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules,» *Ad. Drug Delivery Review*, vol. 47, pp. 83-97, 2001.
- [41] Eichhorn S. J., Dufresne A., Aranguren M., Marcovich N. E., Capadona J. R., Rowan S. J., Weder, C., Thielemans, W., Roman, M., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Nogi M., Nakagaito A. N., Mangalam A., Simonsen J., Benight A. S., Bismarck A., Berglund L. «Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites,» *Jornal Materials Science*, vol. 45, pp. 1-33, 2010.
- [42] Putaux, J. L., Molina-Boisseau, S., Momaur, T. & Dufresne, A. «Platelet Nanocrystals Resulting from the Disruption of Waxy Maize Starch Granules by Acid Hydrolysis,» *Biomacromolecules*, vol. 4, pp. 1198-1202, 2003.
- [43] Buléon A, Gérard C, Riekel C «Details of the crystalline ultrastructure of C-starch granules revealed by synchrotron mapping,» *Macromoleculaes*, vol. 31, pp. 6605-6610, 1998.

- [44] Hizukuri, S. «Relationship between the distribution of the chain length of amylopectine and the crystalline structure of starch granules,» *Carbohydr Res*, vol. 141, pp. 295-306, 198.
- [45] Jane J-L, Wong KS, McPherson AE. «Branched-structure difference on starches of A-and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans.,» *Carbohydr Res*, vol. 300, pp. 219-227, 1997.
- [46] Imberty A, Perez S «A revis it to the three-dimensional structure of B-type starch,» *Biopolymers*, vol. 27, pp. 1205-1221, 1988.
- [47] Blanshard, J. M. V.,«Starch: properties and potential,» *John Wiley & Sons*, pp. 16-54, 1987.
- [48] J. Blanshard, «In starch, properties and Potential,» *John Wiley & Sons* , pp. 16-54, 1987.
- [49] Chang, Q., Zheng, B., Zhang, Y., Zeng, H.«A comprehensive review of the factors influencing the formation of retrograded starch,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 186, pp. 163-173, 2021.
- [50] Zhu, F.,Wang, S. «Physicochemical properties, molecular structure, and uses of sweetpotato starch,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 36, pp. 68-78, 2014.
- [51] M. Schirmer, M. Jekle, T. Becker .«Starch gelatinization and its complexity for analysis,» *Wiley Online Library*, vol. 67, pp. 30-41, 2014.
- [52] Ding, L., Zhang, B., Tan Ping, C., Fu, X., Huang, Q .«Effects of limited moisture content and storing temperature on retrogradation of rice starch,» *International Journal of Biological Macromolecules* , vol. 137, pp. 1068-1075, 2019.
- [53] R. Colussi, J. Singh, L. Kaur, E.D.R. Zavareze, A.R.G. Dias, R.B. Stewart and H. Singh «Microstructural characteristics and gastro-small intestinal digestion in vitro of potato starch: Effects of refrigerated storage and reheating in microwave,» *Food Chemistry*, vol. 226, pp. 171-178, 2017.
- [54] Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., & Ring, S. G. «The roles of amylose and amylipectin in the gelation and retrogradation of starch.,» *Carbohydrate Research*, vol. 2, pp. 271-281, 1985.
- [55] Hoover R, Hughes T, Chung HJ, Liu Q «Composition molecular structure, properties, and modification of pulse starches: a review.,» *Food Research international*, vol. 43, pp. 399-413, 2010.

- [56] Jane J, Robyt JF. «Structure studies of amylose-V complexes and retro-graded amylose by action of alpha-amylases, and new method for preparing amyloextrins,» *Carbohydrated Research*, vol. 132, 1984.
- [57] Fadda C, Sanguinetti AM, Del Caro A, Collar C, Piga A. «Bread staling; updating the view,» *Comprehensive review food science* , vol. 13, pp. 473-92, 2014.
- [58] D. Sievert, Z. Czuchajowska, Y. Pomeranz «Enzyme-resistant starch. III X-ray diffraction of autoclaved amylo maize VII starch and enzyme-resistant starch residues,» *Cereal chem*, vol. 68, pp. 86-91, 1991.
- [59] Gidley, M. «Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation,» *Macromolecules*, vol. 22, pp. 351-358, 1989.
- [60] Bouvier, J.M., Campanella, O.H. «Extrusion processing technology hoboken,» *Wiley*, 2014.
- [61] RF, Egerton, «Physical principles of electron microscopy,» 2005.
- [62] Ibarra, C., Muñoz, R., Ramirez, M. «Microscopia electronica de barrido,» *Seminario ID424, Ciencia de los materiales II*, 2001.
- [63] Renau-piqueras, Jaime, Faura, Magdalena. «Principios básicos del microscopia electrónico de barrido,» de *Sección de Microscopia electrónica* , Valencia, España , 1994.
- [64] Bijani, S. *Electrodeposición y Caracterización de laminas de Cu<sub>2</sub>O*, España, 2007.
- [65] Katz, J & van Italie, T.B. *Physuk Physuk. Chem (A)* , vol. 90, pp. 90-100, 1930.
- [66] K. & F. D. Kainuma, *Biopolymers* , vol. 11, pp. 2241-2250, 1972.
- [67] H. H. & S. A. Wu, *Carbohydrate Research*, vol. 61, pp. 7-25, 1978.
- [68] F. G. D. G. A. M. C. & R. J. Duprat, *In Les Polumeres Vegetaux* , pp. 176-229, 1980.
- [69] D. & M. N. Manners, *Carbohydrated Research*, vol. 90, pp. 99-110, 1981.
- [70] A. D. F. B. F. P. & C. H. Buléon, *Carbohydrated Polymers* , vol. 4, pp. 161-173, 1984.
- [71] V. & B. A. Tran, *Appli Csyrallographic*, vol. 21, pp. 1887-1897, 1987.
- [72] D. v. D. J. v. L. G. v. T. S. Amelinckx, «Transmission electron microscopy,» de *Electron microscopy- Principes fundamentals*, 1997.

- [73] Calderon, H.A. «Microscopia electronica de transmisión para observar atomos: principios y desarrollo,» *Mundo Nano*, vol. 25, n° 13, pp. 133-156, 2020.
- [74] Kim, H.Y., Park, S.S., Lim, S.T. «Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 126, pp. 607-620, 2015.
- [75] Sandoval, A., Rodriguez, E., Fernandez, A., «Aplicacion del analisis por calorimetria diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidon,» *Revista de la facultad de minas*, vol. 72, n° 146, pp. 45-53, 2005.
- [76] Bello-Perez, L., Mendez Montevalvo, M., Acevedo, E. «Almidon: definicion, estructura y propiedades,» *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*, 2006.
- [77] Gutierrez-Cortez, E., Hernandez-Becerra, E., Londoño Restrepo, S.M, Rodriguez-Garcia, M.E. «Physicochemical characterization of amaranth starch insulated by mechanical separations,» *International Journal Biological macromolecules*, vol. 177, pp. 430-436, 2021.
- [78] Martinez-Ascencio, E.U., Osguera-Toledo, M.E., Londoño-Restrepo, S.M., Rodriguez-García, M.E. «Influence of physicochemical changes of the avocado starch throughout its pasting profile: Combined extraction,» *Carbohydrated Polymers*, vol. 281, p. 199045, 2022.
- [79] Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Millán-Malo, B.M., Rivera-Muñoz, E.M., Rodriguez-Garcia, M.E. «Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones,» *Report Scientific*, 2019.
- [80] Kim, H. Y., Lee, J. H., Kim, J. Y., Lim, W.J., Lim, S.T. «Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches,» *Starch-Starke*, vol. 64, n° 5, pp. 367-373, 2012.
- [81] Pérez, S., & Bertoft, E. «The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review,» *Starke*, pp. 389-420, 2010.
- [82] Lopez-Rubio, A., Flanagan, B.M., Gilbert, E.P & Gidley, M.J. «A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: a combined XRD and NMR study,» *Biopolymers*, vol. 89, pp. 761-768, 2008.
- [83] Liang, X., Mei, D., Cao, M., Qu, D., Deng, B. «Effects of structural patterns and degree of crystallinity on the performance of nanostructured ZnO as anode material for lithium-ion,» *Journal of alloys and Compunds*, vol. 627, pp. 455-462, 2015.





