



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MEZCLAS DE ALMIDÓN DE MAÍZ CEROSO MODIFICADO Y κ -CARRAGENINA:
INTERACCIÓN, COMPORTAMIENTO VISCOSO Y MICROESTRUCTURA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

RAFAEL SAENZ ALARCÓN



CDMX

2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Alberto Tecante Coronel

VOCAL: M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas

SECRETARIO: Dr. Roeb García Arrazola

1er SUPLENTE: I. en A. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez

2º SUPLENTE: I. en A. Mariana Ramírez Gilly

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 313, Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Alberto Tecante Coronel

SUPERVISOR TÉCNICO:

Mariana Ramírez Gilly

Índice de contenido

1	Introducción	1
	Hipótesis	2
	Objetivos	2
2	Marco teórico	3
	2.1 Importancia de mezclas almidón-hidrocoloides	3
	2.2 Almidón	3
	2.2.1 Amilosa	4
	2.2.2 Amilopectina	5
	2.2.3 Gelatinización del almidón	8
	2.2.4 Modificaciones químicas del almidón (Almidones entrecruzados)	8
	2.2.5 Microestructura del gránulo de almidón	10
	2.3 Carrageninas	12
	2.3.1 Generalidades y usos	12
	2.3.2 Estructura química de las carrageninas	13
	2.3.3 Propiedades de las carrageninas	15
	2.3.4 κ -carragenina	16
	2.3.5 Conformaciones de la κ -carragenina	16
	2.3.6 Microestructura de la κ -carragenina	18
3	Materiales y métodos	20
	3.1 Materiales	20
	3.2 Efecto de los procedimientos de mezclado del CH10 con la κ-carragenina. Difracción láser	20
	3.2.1 Gelatinización del gránulo de almidón / Tratamiento térmico	21
	3.2.2 Tamaño de partícula por difracción láser	21
	3.3 Tamaño del gránulo de almidón para distintas concentraciones de κ-carragenina	21
	3.4 Microscopia confocal de barrido láser (CLSM)	22
	3.4.1 Tinción del gránulo de CH10	22
	3.4.2 Tinción de la κ -carragenina para CLSM	23
	3.4.3 Mezcla de κ -carragenina y CH10 (componentes marcados)	23
	3.5 Comportamiento viscoso	24
	3.5.1 Cizalla estacionaria	24
	3.5.2 Curvas de flujo	24
4	Resultados y discusión	26
	4.1 Tamaño del gránulo de almidón	26
	4.1.1 Tipo de mezclado con κ -carragenina	26
	4.1.2 Distintas concentraciones de κ -carragenina	26

4.2 Microestructura	30
4.2.1 Microscopía confocal de barrido láser	30
4.3 Mediciones de viscosidad	38
4.4 Discusión	40
5. Conclusiones generales	42
Referencias	43

Resumen

Las mezclas almidón-hidrocoloides son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos para modificar y controlar la textura de los alimentos, como espesantes y para aprovechar el efecto sinérgico en el aumento de la viscosidad de las mezclas en comparación con las suspensiones de almidón gelatinizado sin hidrocoloide. Dichas características, entre otras, dependen principalmente de las interacciones fisicoquímicas que se establecen entre los biopolímeros y otros componentes.

En el presente trabajo se estudió un sistema de dos componentes macromoleculares formado por un hidrocoloide: κ -carragenina (κ C) y por almidón ceroso modificado químicamente (CH10) usando como fase dispersante agua desionizada (DI). Las mezclas fueron sometidas a un tratamiento térmico controlado para alcanzar la temperatura de gelatinización del gránulo de almidón. El principal objetivo fue conocer cómo se ve afectada la viscosidad de una pasta de almidón y el tamaño del gránulo de almidón por la adición de distintas concentraciones de κ C y cómo interactúan estas dos macromoléculas a nivel de su microestructura. Para ello se hicieron pruebas de cizalla estacionaria, determinación de tamaño de partícula por difracción láser y microscopia confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés).

Para las pruebas de viscosidad la concentración de CH10 fue 4% masa y 0, 0.1 y 0.5% masa de κ C. La adición de κ C resultó en un aumento de la viscosidad de las pastas de almidón en el intervalo de concentraciones utilizado. La pasta con mayor concentración de κ C presentó la mayor viscosidad y mostró un comportamiento no Newtoniano. El tamaño de partícula se examinó para concentraciones de 2% masa de CH10 y 1, 10, 50, 100 μ g/g y 1, 2, 3, 4 y 5 mg/g de κ C. La difracción láser muestra que al aumentar la concentración de κ C aumenta el tamaño del gránulo de almidón en el intervalo de concentraciones de κ C examinado. Para las observaciones en CLSM el almidón se marcó de manera no covalente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y con ácido-8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico (APTS). La κ C se marcó de manera covalente con isotiocianato de rodamina B (RITC). Las observaciones permiten postular que la κ C se adsorbe sobre la superficie del gránulo de almidón lo que explica el aumento aparente en el diámetro del gránulo gelatinizado.

Abstract

Starch-hydrocolloid mixtures are widely employed in the food industry to modify and control the texture of products. They can be used as thickeners and also to take advantage of the synergistic effect by increasing the viscosity of mixtures (compared to non-hydrocolloid gelatinized starch suspensions). These characteristics, among others, depend mainly on the physicochemical interactions that are established between biopolymers and other components.

In this investigation, a system of two macromolecular components formed by κ -carrageenan (κ C) and by chemically modified waxy starch (CH10) were studied, using deionized water (DI) as the dispersing phase. The mixtures were subjected to a controlled heat treatment, in order to reach the gelatinization temperature of the starch granule. The main purpose was to know the effect of the addition of different κ C concentrations on the viscosity of starch pastes and the size of the gelatinized starch granule; also, how the microstructure of these two molecules is developed. In order to obtain the final results, stationary shear tests, particle size determination by laser diffraction, and confocal scanning laser microscopy (CLSM) were carried out.

For the viscosity tests, the concentration of CH10 was 4% mass and 0, 0.1, and 0.5% mass of κ C. The addition of κ C increased the viscosity of starch pastes in the range of concentrations used. The paste with the highest level of κ C presented the highest viscosity and showed a non-Newtonian behavior. The particle size was examined for levels of 2% mass of CH10 and 1, 10, 50, 100 μ g/g, and 1, 2, 3, 4, and 5 mg/g of κ C. Laser diffraction shows that as the concentration of κ C increases, the size of the starch granule increases in the range of κ C levels examined. For observations in CLSM, starch was non-covalently labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and with -8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS). The κ C was covalently tagged with Rhodamine B isothiocyanate (RITC). The observations make it possible to postulate that κ C is adsorbed on the surface of the starch granule, which explains the apparent increase in the diameter of the gelatinized granule.

1 Introducción

El almidón es un polisacárido ampliamente usado en la industria de alimentos debido a su capacidad de espesamiento o de aumento de viscosidad. Debido a que la forma nativa del almidón no resiste tratamientos mecánicos y térmicos es sometido a procesos de transformación, modificación, como el reticulado químico para mejorar sus propiedades y resistencia a dichos tratamientos. Otra alternativa utilizada para solucionar las limitaciones del almidón es la combinación con otras macromoléculas, principalmente hidrocoloides. La adición del hidrocoloide apropiado puede minimizar las limitaciones del almidón nativo, por ejemplo, puede proteger los gránulos de almidón de la ruptura durante la gelatinización, mejorar la textura, el comportamiento reológico del producto final, mantener la humedad y evitar la sinéresis (BeMiller, 2011). Las mezclas de almidón con otros hidrocoloides se caracterizan por presentar un efecto sinérgico, lo cual, reológicamente se traduce en un incremento de la viscosidad de las pastas, o bien, de la rigidez de geles formados (Núñez-Santiago, 2007) en relación con los componentes separados. Uno de estos hidrocoloides es la κ -carragenina, una macromolécula cargada negativamente, i.e., polielectrolito, que se utiliza como espesante y como gelificante debido a su capacidad de formar redes tridimensionales en presencia de iones.

Es de importancia esclarecer la interacción y las propiedades de las mezclas almidón- κ -carragenina ya que la información reportada en la literatura sobre estas mezclas es menos abundante en comparación con la de hidrocoloides y almidón sin mezclar. Además, el comportamiento reológico de las mezclas es particular de cada una y se ve modificado por la concentración, o propiamente la fracción volumen, de la fase dispersa, el comportamiento reológico de la fase continua y por condiciones experimentales como la preparación de las pastas (Tecante & Doublier, 1999).

Se ha recurrido a la microscopia confocal de barrido láser para elucidar la interacción de ambas macromoléculas mezcladas, ya que dicha técnica es una poderosa herramienta de imagen frecuentemente utilizada para observar la estructura de polisacáridos (Blennow et al., 2003). Para ello, la κ -carragenina y el almidón son etiquetados con dos marcadores fluorescentes distintos en emisión y absorción, los suficientemente selectivos que permitan distinguir cada molécula. La κ -carragenina fue marcada de manera covalente mientras que

el almidón se marcó con 2 fluorocromos distintos, uno de manera covalente y el otro no covalente.

Hipótesis

- Las mezclas de almidón- κ -carragenina tendrán un efecto sinérgico, lo cual reológicamente se traduce en un aumento en la viscosidad de las pastas, en comparación con la viscosidad de una pasta de almidón de concentración 4% masa.
- Se modificará el tamaño de partícula de las pastas de almidón, es decir, el gránulo gelatinizado en suspensión, reportado como el diámetro mediano, el cual aumentará con el aumento en la concentración de κ -carragenina en ausencia de iones potasio. El aumento del gránulo será ocasionado por un fenómeno de adsorción física de la κ -carragenina en la superficie del gránulo de almidón gelatinizado. Dicho fenómeno se podrá apreciar en microscopía confocal de barrido láser.

Objetivos

- Objetivo general. Determinar el tamaño del gránulo de almidón gelatinizado con distintas concentraciones de κ -carragenina en ausencia de iones potasio y observar la microestructura del gránulo gelatinizado mezclado con κ -carragenina para conocer las características morfológicas de las macromoléculas en las mezclas y entender cómo interaccionan ambos componentes. Determinar la viscosidad de mezclas de almidón con κ -carragenina para conocer el comportamiento de flujo y el efecto que ocasiona la presencia del hidocoloide en la pasta de almidón gelatinizado.
- Objetivos específicos. Preparar pastas de almidón en distintas concentraciones de κ -carragenina y determinar el tamaño del gránulo gelatinizado para evaluar el efecto de la κ -carragenina y su concentración sobre esta característica. Marcar de manera diferencial la κ -carragenina y el CH10 con fluorocromos para observar la interacción de ambas moléculas en microscopía confocal de barrido láser. Realizar pruebas de cizalla estacionaria con una pasta de almidón como blanco y otras con distintas concentraciones de κ -carragenina para comparar la viscosidad de las mezclas.

2 Marco teórico

2.1 Importancia de mezclas almidón-hidrocoloides

Los almidones modificados son aditivos comúnmente utilizados en la industria de alimentos debido a sus propiedades reológicas y de textura como la formación de geles firmes y su capacidad espesante. Son utilizados en diversos productos como sopas, salsas, conservas, productos lácteos, entre otros (Multon, 2000). Las mezclas de almidones y otros hidrocoloides son empleadas ampliamente en una gran variedad de alimentos. En el caso particular de la mezcla con κ -carragenina existe alguna información en la literatura sobre las propiedades y características que tienen este tipo de pastas. Es de gran importancia el conocimiento de las interacciones y propiedades de estas mezclas, para su aplicación en alguna matriz alimenticia teniendo en consideración diversos factores externos como la concentración de iones monovalentes, y temperatura entre otros.

En general se acepta que las pastas de almidón de cereales, como el maíz, mezcladas con κ -carragenina, producen suspensiones de gránulos gelatinizados de almidón dispersos en un medio macromolecular donde los gránulos hinchados, principalmente amilopectina, son la fase dispersa mientras en la fase continua está la κ -carragenina disuelta y la amilosa (Chaudemanche & Budtova, 2007). Las mezclas almidón-carragenina han sido empleadas en alimentos procesados de uso diario desde aproximadamente 1950 para obtener una amplia gama de propiedades de textura y sensoriales (BeMiller, 2011), principalmente en el área de alimentos tipo postre de bajo contenido calórico, ya que pequeñas cantidades de estos componentes proveen la consistencia necesaria para sustituir las grasas contenidas en los mismos (Descamps et al., 1986).

2.2 Almidón

El almidón es el polisacárido de reserva principal en plantas y forma parte de los carbohidratos digeribles en la dieta humana, y provee entre 70 y 80% de la energía consumida por los humanos (Fennema, 2002). Está compuesto por subunidades de glucosa unidas en enlaces α -(1 \rightarrow 4) (amilosa) y α -(1 \rightarrow 6) (amilopectina), la proporción de estas estructuras

depende de la fuente de obtención del almidón; los almidones obtenidos de maíz, cebada y arroces céreos tienen un contenido de hasta 98% de amilopectina.

El almidón espesa una gran cantidad de alimentos, tales como sopas, salsas, bebidas, alimentos procesados, entre otros. Presenta una gran variedad de propiedades reológicas y de textura como consecuencia de las diversas fuentes botánicas de donde es extraído, así como las modificaciones químicas a las que es sometido. Existen diversos factores que pueden tener influencia en el procesamiento del almidón y en sus propiedades reológicas, factores extrínsecos como son la presencia de otros componentes como grasas, proteínas, azúcares, hidrocoloides e intrínsecos como condiciones de tratamientos térmico y mecánico a los que son sometidos, por ejemplo, una temperatura superior a la de cocción, condiciones de deformación y velocidad de calentamiento (Núñez-Santiago, 2007).

El almidón se diferencia de todos los demás carbohidratos en que en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas llamadas gránulos (Fennema, 2002). Los gránulos de almidón son relativamente densos e insolubles, y se hidratan mal en agua fría. Pueden ser dispersados en agua, dando lugar a la formación de suspensiones de baja viscosidad que pueden ser fácilmente mezcladas (Fennema & Tannenbaum, 1992).

La capacidad de formar disoluciones viscosas, i.e., la capacidad espesante, es alcanzada sólo cuando la suspensión de los gránulos es sometida a la acción del calor. Al calentar una suspensión al 5% de gránulos de almidón no modificado hasta unos 80 °C (175 °F), con agitación, se produce una alta viscosidad (Fennema, 2002) comparado con una suspensión sin calentar a la misma concentración de gránulos. Una segunda propiedad única es que la mayoría de los gránulos de almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y otro muy ramificado llamado amilopectina.

2.2.1 Amilosa

La amilosa (Figura 1) es una cadena larga relativamente, es lineal compuesta de α -glucanos y un 99% de sus enlaces es α -(1 \rightarrow 4), su tamaño y estructura varían dependiendo su origen botánico. Tiene una masa molar promedio de $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Da (Buléon et al., 1988), con un grado de polimerización número (DP_n) de 324 a 4920 y con alrededor de 9 a

20 puntos de ramificación que pueden no tener la misma distancia entre ellos, y que equivalen de 3 a 11 cadenas por molécula (Mizukamy et al., 1999) Cada cadena contiene de 200 a 700 residuos de glucosa que son equivalentes a una masa molar de 32400 a 113400 (Tester et al., 2004). En disoluciones acuosas, la amilosa adopta una conformación de hebra flexible pero rígida.

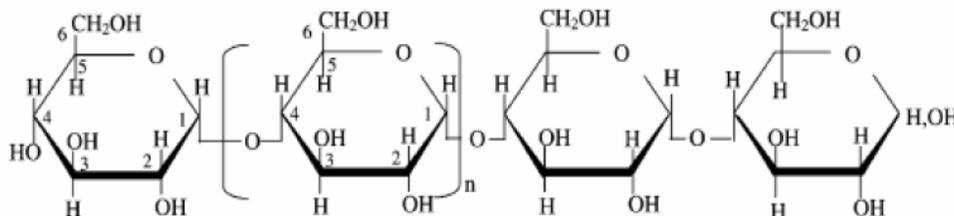


Figura 1. Representación esquemática de la amilosa (Tester et al., 2004). Valor promedio de $n = 1000$

2.2.2 Amilopectina

La amilopectina tiene una estructura ramificada, la naturaleza microcristalina de los gránulos de almidón es debida principalmente a esta estructura. La masa molar de la amilopectina es mucho mayor que la de la amilosa y está en un intervalo de 1×10^7 a 1×10^9 Da y una estructura construida con alrededor de 95% de enlaces $\alpha - (1 \rightarrow 6)$ y 5% de enlaces $\alpha - (1 \rightarrow 4)$ (Figura 2). Las ramificaciones se encuentran unidas al tronco central mediante enlaces $\alpha - (1 \rightarrow 6)$, localizados de cada 12 a 23 unidades de glucosa lineales de glucosa (Tester et al., 2004). El grado de polimerización fluctúa entre 9600 a 15900, pero abarca tres grados de polimerización: 13400 a 26500, 4400 a 8400 y 700 a 2100 (Takeda et al., 2003). Al igual que la amilosa su masa molar, su tamaño molecular y su estructura dependen de la fuente botánica de la cual es obtenida. La amilopectina se encuentra en todos los almidones, constituyendo 75% de los almidones más comunes como maíz, papa, tapioca y trigo. Algunos están formados exclusivamente de amilopectina y se les llama almidones céreos (Fennema, 2002).

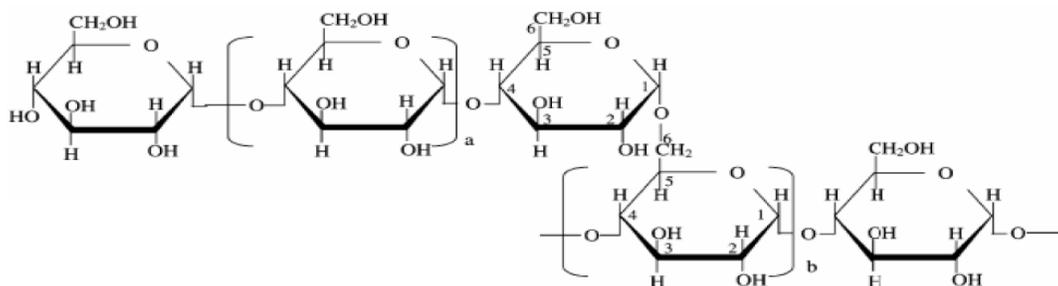


Figura 2. Representación esquemática de la amilopectina (Tester et al., 2004). Para cadenas exteriores $a = 12$ a 23 . Para cadenas interiores $b = 20$ a 30

A diferencia de la amilosa, las cadenas de amilopectina son relativamente más cortas y con un patrón de ramificaciones amplio. El modelo de ramificaciones se describe de dos maneras: (1) regiones lineales exteriores de amilopectina en forma de dobles hélices cristalinas y (2) con dos puntos de ramificación $1 \rightarrow 6$ distribuidos con cierta variación periódica en puntos densos de ramificación, localizados cada 12 a 23 unidades lineales de glucosa (Tester et al., 2004).

Los gránulos de almidón están formados por moléculas de amilosa y/o amilopectina distribuidas de manera radial, sin embargo, producen arreglos de empaquetamiento diferentes. En el gránulo, la amilopectina se pliega en dobles hélices cuando se encuentra en la parte exterior del gránulo, estas asociaciones en conjunto forman regiones ordenadas, láminas cristalinas, separadas por zonas amorfas que son puntos de ramificación (Donald et al., 1997) (Figura 3). En la figura se observan tres zonas: (a) todas las láminas microcristalinas separadas por la formación de anillos amorfos, (b) una ampliación de las zonas amorfas y cristalinas y (c) estructuras helicoidales, formadas por cadenas adyacentes de amilopectina, dando origen a la lámina cristalina. Dicha estructura le confiere al gránulo propiedades ópticas como la birrefringencia.

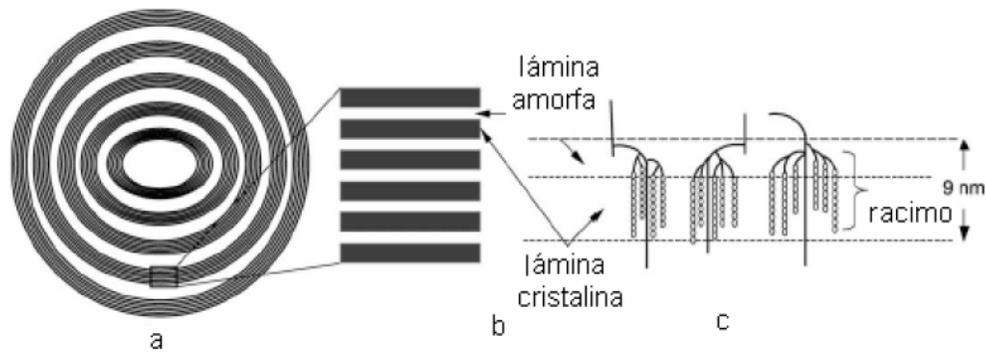


Figura 3. Representación de la estructura laminar de los gránulos de almidón (Donald et al., 1997).

La disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón en un gránulo resulta evidente al observar la cruz de polarización, cruz blanca sobre un fondo negro, también llamada “cruz de malta”, la cual es consecuencia de la naturaleza cristalina del gránulo cuyo índice de refracción varía en la dirección del paso de la luz a través de la sustancia. El centro de la cruz se corresponde al hilio, el centro de crecimiento del gránulo (Fennema, 2002).

2.2.3 Gelatinización del almidón

Usualmente en la industria de alimentos, el almidón es procesado mediante tratamientos térmicos y mecánicos en presencia de agua, dando lugar a diversos fenómenos, de los cuales destaca la gelatinización. La gelatinización es un proceso en el que los gránulos insolubles en agua fría, debido a su estructura altamente ordenada, se calientan (70-90 °C) y empieza un cambio lento de absorción de agua, el gránulo se hincha y manifiesta cambios irreversibles en sus propiedades como su tamaño, la disociación de las dobles hélices y la pérdida de la birrefringencia y del orden cristalino. La gelatinización comienza en el hilio del gránulo, el cual se hincha rápidamente hacia la periferia, por lo tanto, ocurre inicialmente en zonas amorfas porque los puentes de hidrógeno son más débiles ahí (Jenkins & Donald, 1998). En el estado inicial de la gelatinización no se observan cambios en las láminas de amilopectina, sin embargo, al final del proceso, adicionalmente a la pérdida del orden cristalino, las observaciones con rayos X demuestran que se presenta también la pérdida del orden laminar (Jenkins & Donald, 1998). Como resultado del continuo calentamiento en exceso de agua, hay un mayor hinchamiento del gránulo, ocurre una lixiviación de los compuestos solubles, amilosa principalmente, y eventualmente una disrupción total de los gránulos debida al exceso de hinchamiento o a la aplicación de esfuerzos de cizalla. Algunos almidones presentan mayor resistencia al tratamiento mecánico que otros. Por ejemplo, los almidones de maíz ceroso modificados químicamente presentan una mayor resistencia al rompimiento de los gránulos inclusive cuando se calientan más allá de la temperatura de gelatinización. Los almidones nativos tienden a la ruptura del gránulo una vez gelatinizados (Núñez-Santiago, 2007).

2.2.4 Modificaciones químicas del almidón (Almidones entrecruzados)

La modificación del almidón es una alteración a las propiedades fisicoquímicas de los almidones nativos y mejora de sus características funcionales. Estas modificaciones implican cambios en la estructura del gránulo e involucran la eterificación, acetilación o formación de ésteres con anhídrido acético, entrecruzamiento e inserción, entre otras (Heinze et al., 2006).

La modificación química implica la introducción de los grupos funcionales en la molécula de almidón, resultando en una modificación de sus propiedades fisicoquímicas.

La modificación más común es el entrecruzamiento o reticulación, i.e., cross-linking, mediante un reactivo químico polifuncional capaz de reaccionar con los abundantes grupos hidroxilo del almidón, creando enlaces covalentes entrecruzados que sirven como puentes de unión intermoleculares en diversos puntos de la estructura granular (Shogren, 2003) (Figura 4.) Las pastas de almidón entrecruzado son menos susceptibles al rompimiento de los gránulos y pueden tolerar altas temperaturas, altas deformaciones y condiciones ácidas.

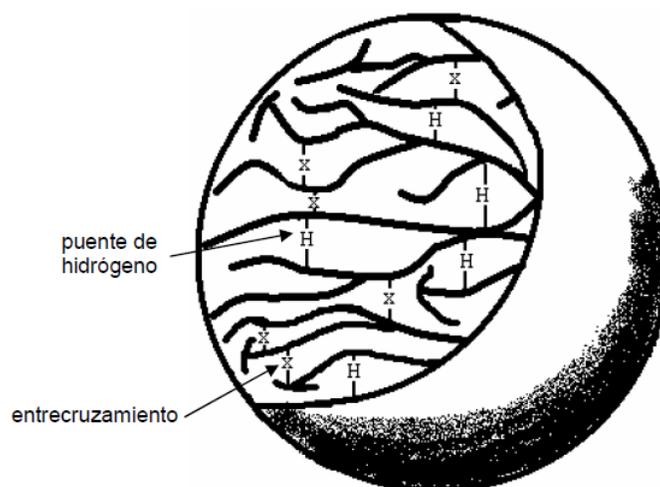


Figura 4. Representación de la estructura de un gránulo de almidón entrecruzado (Thomas & Atwell, 1999). Cada “x” representa un enlace covalente de entrecruzamiento.

El entrecruzamiento con mezclas de ácido adípico y anhídrido acético se realiza con el almidón en suspensión acuosa, 0.12% de ácido adípico y 5% de anhídrido acético en relación con la cantidad de almidón, ajustando el pH a 8 y a 40 °C. La reacción tiene duración de hasta una hora y al término se ajusta el pH a 5.5 con HCl, se centrifuga para recuperar el almidón y se seca (Fitton & Gonze, 1988). La mezcla de los anhídridos de esta reacción (Figura 5) forma enlaces de ésteres orgánicos y grupos acetilo estables a pH neutro, aunque en condiciones extremas de pH son menos estables.

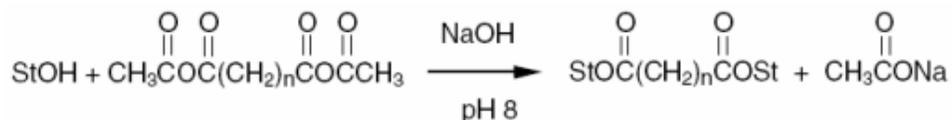


Figura 5. Reacción química de entrecruzamiento de almidón con una mezcla de anhídridos adípico y acético St = polímero de almidón (Thomas & Atwell, 1999).

2.2.5 Microestructura del gránulo de almidón

La visualización de los gránulos de almidón es de gran importancia para una mejor comprensión del comportamiento del almidón y las pastas de almidón. La microscopía de luz normal se usa con frecuencia para estudiar la forma característica, el tamaño de los gránulos y la distribución del tamaño de los almidones de diversas fuentes botánicas (Moss, 1976). Recientemente, se emplean otras técnicas microscópicas, como la microscopia confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés), para una mejor visualización de la superficie del gránulo haciendo uso de algún compuesto fluorescente o fluorocromo compatible con el gránulo de almidón. La CLSM permite obtener una sección óptica de un solo plano focal a través de un espécimen tridimensional (Matignon et al., 2014a). El contraste se obtiene por diferencias en la fluorescencia y en esta técnica es posible observar dos o tres componentes cuando están marcados con fluorocromos que emiten luz a diferentes longitudes de onda (Dürrenberger et al., 2001). La posición de un componente con respecto a los otros en la microestructura de una mezcla se puede determinar y puede conducir a una mejor comprensión de las interacciones entre los componentes.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés) es un fluorocromo que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno. El FITC se usa para el marcado de diversas biomoléculas como inmunoglobulinas, lecitinas, diversas proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligo y polisacáridos; tiene un máximo de absorción a 490 nm y un máximo de emisión a 520 nm. Dicho fluorocromo es comúnmente usado para teñir los gránulos gelatinizados y crudos de almidón. En otros estudios más profundos sobre la estructura del gránulo se utiliza un fluorocromo en reacción covalente con el almidón: el ácido-8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico (APTS por sus siglas en inglés) (Blennow et al., 2003).

El APTS tiñe los gránulos de almidón mediante la aminación reductiva de la glucosa (O'Shea et al., 1998) (Figura 6). El procedimiento de derivatización más común para los

carbohidratos que poseen un grupo final reductor, como el almidón, es la aminación reductiva, que permite la introducción de una etiqueta cromofórica o fluorofórica adecuada para aumentar la sensibilidad de detección en presencia de un agente reductor (Figura 7).

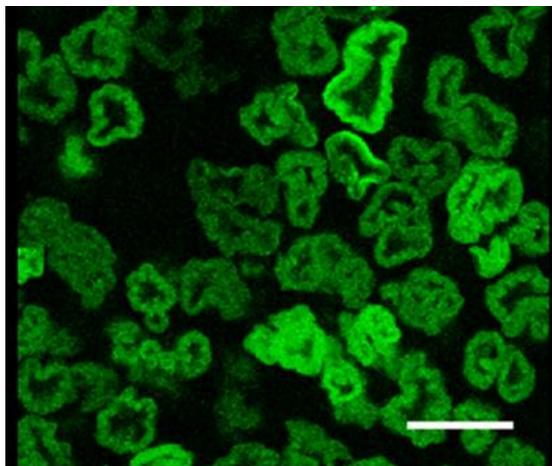


Figura 6. Microscopia en CLSM de una pasta de almidón al 2% marcada con APTS (Matignon et al., 2014b)

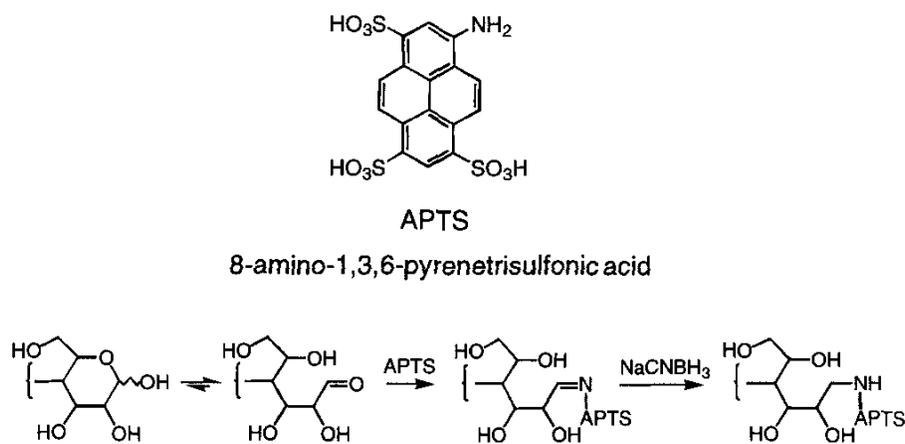


Figura 7. Etiquetado fluorescente de los extremos reductores de carbohidratos por aminación reductiva usando APTS

2.3 Carrageninas

2.3.1 Generalidades y usos

Las carrageninas son polímeros sulfatados que se encuentran en las algas rojas marinas de la familia *Rhodophyceae* (Snoeren, 1976). La palabra carragenina se deriva del nombre coloquial irlandés para esta alga marina, “carragenano”, que significa "pequeña roca". La principal fuente de obtención es *Chondrus crispus*, que se encuentra a lo largo de las costas de Norte América desde Boston hasta Halifax y las especies *Eucheuma*, cultivadas en aguas bajas alrededor de Filipinas (Whistler & BeMiller, 1997). La extracción acuosa de algas rojas para obtener estos hidrocoloides es conocida en Irlanda desde 1810 (Stanley, 1987). Todas las algas rojas que producen carrageninas como material principal de la pared celular pertenecen a *Rhodophyta*, aunque casi no hay información disponible sobre la biosíntesis de las carrageninas y la genética de la pared celular de las algas rojas de este género (De Ruiter & Rudolph, 1997). Las carrageninas constituyen entre 30 y 80% de la pared celular de estas algas y el rendimiento depende principalmente de la especie, la estación de año y las condiciones de crecimiento (Núñez-Santiago & Tecante, 2007).

En la industria de alimentos, las carrageninas son ampliamente usadas debido a sus excelentes propiedades físicas funcionales como la capacidad de espesamiento, gelificación y estabilización, y se han utilizado para mejorar la textura del requesón, para controlar la viscosidad y la textura de postres lácteos gracias a la alta capacidad de interacción con las proteínas de la leche y como aglutinantes y estabilizantes en la industria de procesamiento de carne para la fabricación de salchichas y hamburguesas con bajo contenido de grasa (Prajapati et al, 2014). Las carrageninas también son empleadas en los productos congelados debido a la alta estabilidad a la congelación-descongelación. Algunos atributos sensoriales que proporcionan las carrageninas en formulaciones de alimentos son la suavidad, la cremosidad y el cuerpo de los productos que las contienen. Las carrageninas también se utilizan en diversos productos no alimenticios, como las formulaciones farmacéuticas, cosméticas, de impresión y textiles (Imeson, 2000). Las carrageninas estabilizan las preparaciones de pasta de dientes, absorben los fluidos corporales cuando están formulados en apósitos para heridas e interactúan con el caroteno humano para dar a la piel suavidad y al cabello sedosidad. Han demostrado ser útiles como excipientes de tabletas debido a la

buena compatibilidad, alta robustez y viscoelasticidad persistente de la tableta durante la compresión (Prajapati et al, 2014).

2.3.2 Estructura química de las carrageninas

Fennema (2002) define a las carrageninas como cadenas lineales de unidades repetitivas de D-galactosa y 3,6 anhidro-D-Galactosa (3,6 AG) unidas mediante enlaces (1→3)- α -D- y (1→4)- β -D-glicosídicos alternantes, a excepción de la λ -carragenina, que sólo está compuesta de unidades de D-Galactosa. La mayoría de las subunidades de azúcar presentan uno o dos grupos sulfato esterificados en el grupo hidroxilo de los átomos de carbono C-2 o C-6. Ello proporciona un contenido en sulfato del 15 al 40% que varía dependiendo del tipo de carragenina.

Como se muestra en el Cuadro 1 las carrageninas son clasificadas dependiendo de la presencia de 3,6 AG y la posición y número de grupos éster-sulfato, por lo cual dichos componentes determinan las características y propiedades de los distintos extractos de carragenina.

Cuadro 1. Contenido de componentes químicos y peso molecular de carrageninas de importancia comercial (Solís-Bravo, 2007)

Tipo de carragenina	Peso molecular (kDa)	Ester sulfato (%)	3,6 Anhidro galactosa (%)
κ -carragenina I	100-300	24-25	34-36
κ -carragenina II	300-500	25-28	32-34
λ -carragenina	500-700	32-39	0
ι -carragenina	>700	28-39	25-30

Con base en lo anterior existen los tipos κ -carragenina I y II, iota (ι) y lambda (λ) carragenina que son de importancia comercial, y otros denominados: mu (μ), nu (ν), xi (ξ), y theta (θ) (Stanley, 1987), que se pueden encontrar en las carrageninas nativas o cuando se utilizan métodos de extracción suaves. En la Figura 8 se muestran las estructuras de los tipos de carragenina de acuerdo con su unidad repetitiva ideal. Se ha considerado que la μ y ν -carragenina son precursoras de la κ y ι -carrageninas durante la biosíntesis de estas últimas

por lo que existen pocos estudios en la literatura sobre estas estructuras. Las propiedades químicas y funcionales de cada carragenina son diferentes debido a la presencia de los grupos sulfatados, por ejemplo, la κ y ι -carragenina son capaces de formar geles en presencia de iones, mientras que la λ -carragenina no. Estas tres carrageninas son las más importantes en la industria de alimentos y de mayor producción, por lo que la mayoría de las preparaciones disponibles en el comercio contienen una mezcla con diferentes proporciones de estos tres polisacáridos. Se utilizan principalmente para formar una gran variedad de tipos de geles: claros o turbios, rígidos o elásticos, duros o blandos, estables al calor o termorreversibles y susceptibles o no de sufrir sinéresis (Whistler & BeMiller, 1997). La κ -carragenina II es un polímero híbrido ya que contiene ι -carragenina y κ -carragenina, en la cual la proporción molar de esta última puede variar entre 80 y 45% dependiendo de la familia y la especie de alga de la que se obtenga (Whistler & BeMiller, 1993). El presente trabajo se limita a estudiar la κ -carragenina I, simplemente mencionada como κ -carragenina.

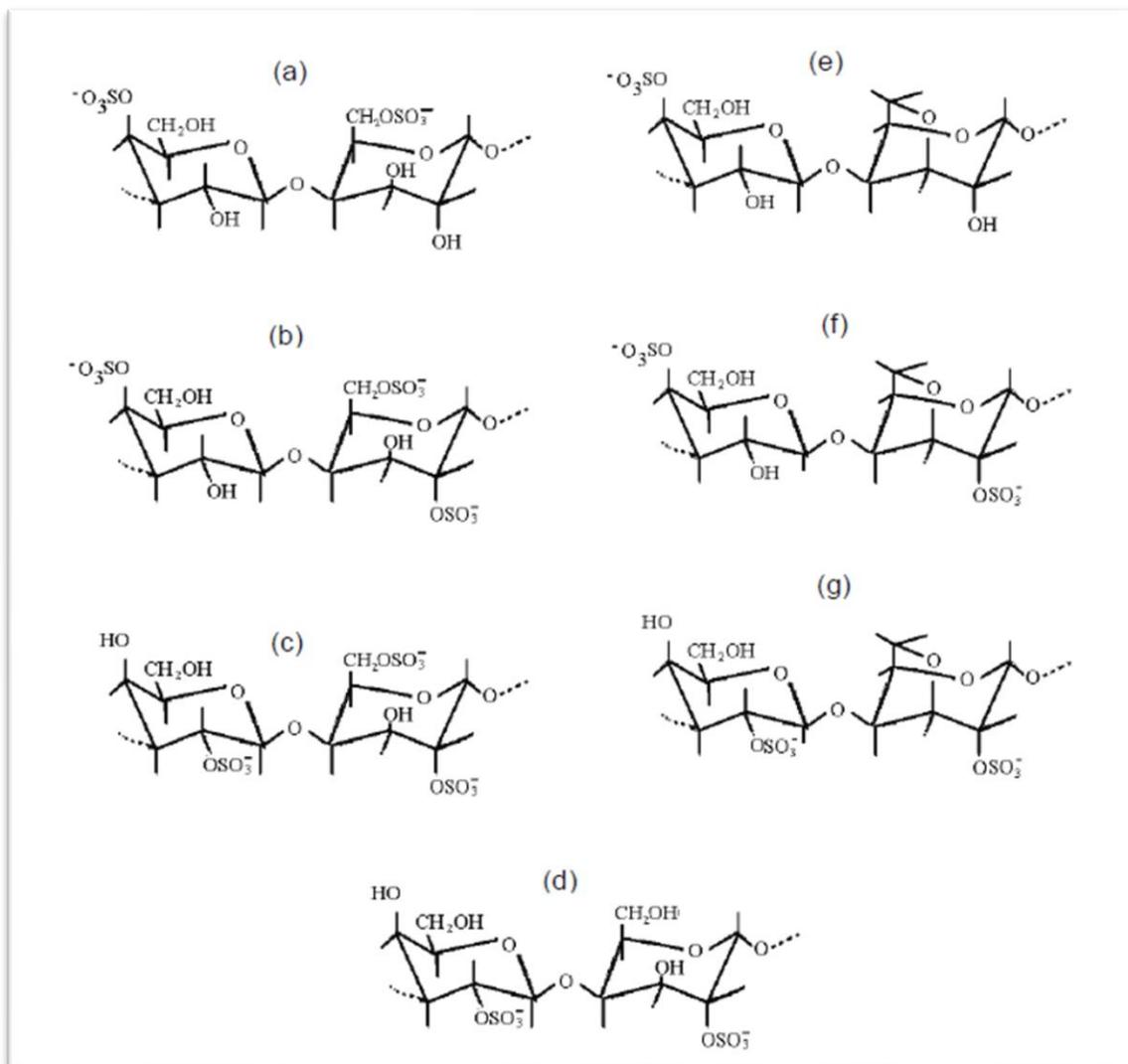


Figura 8. Unidad repetitiva ideal de las carrageninas (Stanley, 1987). (a) μ , (b) ν , (c) λ , (d) ξ , (e) κ , (f) ι y (g) θ carrageninas.

2.3.3 Propiedades de las carrageninas

Las carrageninas son polímeros fuertemente aniónicos, de gran tamaño y masa molar. Estas propiedades les confieren la capacidad de reaccionar e interactuar con otras moléculas a través de distintos mecanismos, como son los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, para formar estructuras complejas que usualmente implican cambios en las propiedades físicas del sistema en que se aplican (Glicksman, 1969)

La carrageninas son solubles en agua ($> 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) y son capaces de formar disoluciones de alta viscosidad aun a bajas concentraciones; 0.1 a 0.5% (Núñez-Santiago, 2007). La viscosidad desarrollada es muy estable en un amplio intervalo de pH, puesto que los grupos semiéster de sulfato están siempre ionizados, incluso en condiciones de fuerte acidez, lo que proporciona a las moléculas una carga neta negativa (Fennema, 2002).

2.3.4 κ -carragenina

La κ -carragenina se encuentra constituida por cadenas lineales alternadas de $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-galactosa-4-SO}_3^{\text{-}}(1\rightarrow4)\text{-3,6-anhidro-}\alpha\text{-D-galactosa}$, Figura 8e (Chandrasekaran, 1998). Debido a que las moléculas tienen una carga neta negativa, se les clasifica como un polielectrolito y esto la hace sensible a las interacciones iónicas con aniones y cationes.

2.3.5 Conformaciones de la κ -carragenina

La conformación ordenada en hélice está presente en el estado sólido. Estudios de rayos X en muestras de fibras de una sal de potasio de κ -carragenina han demostrado que la κ y la ι -carragenina forman hélices en el estado sólido (Cairns et al., 1991). Las fibras de κ -carragenina son menos orientadas y cristalinas que la de ι -carragenina, sin embargo, al igual que esta última, también se encuentra en conformación de doble hélice (Chandrasekaran, 1998). Como se muestra en la Figura 9 las dobles hélices se estabilizan en forma paralela siguiendo la dirección de la mano derecha, con ambas estructuras torcidas en forma escalonada, de tal forma que cuando un residuo de galactosa anhidra se encuentra frente un grupo sulfato de la otra molécula, se forma un enlace mediante puentes de hidrógeno. Los grupos sulfatos se encuentran en la periferia de la doble hélice, y son los que interactúan con los iones.

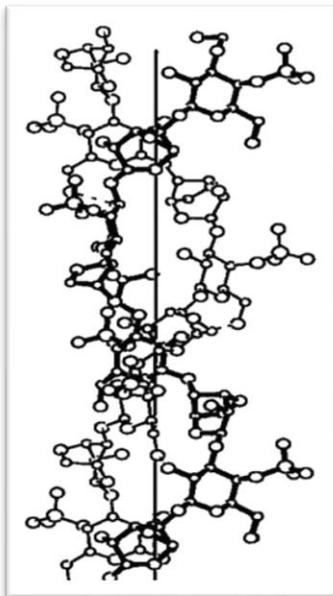


Figura 9. Estructura cristalina de la κ -carragenina (Chandrasekaran, 1998). Una hebra se representa clara y la otra oscura para diferenciarlas. La línea del centro es el eje de la hélice y las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno.

La conformación de la κ -carragenina en disolución depende en gran manera de los contraiones presentes, ya que estos causan la disminución de la carga efectiva del polímero. En disoluciones de NaCl, la κ -carragenina adopta una conformación desordenada (Snoeren, 1976) mientras que en disoluciones de NaI adopta una conformación en forma helicoidal. En el estado desordenado, la κ -Carragenina se describe como una hebra aleatoria (random coil) con flexibilidad intrínseca pero la cual se expande debido al efecto de volumen excluido y de las repulsiones electrostáticas que se establecen entre los segmentos de las cadenas (Snoeren, 1976) con una gran capacidad de absorción de agua. En esta conformación las cadenas son flexibles y sensibles a interacciones con iones.

La transición de la κ -carragenina se describe de un estado desordenado a un estado ordenado como: 2 hebras aleatorias \Leftrightarrow 1 doble hélice. La transición desorden-orden ocurre a una temperatura dada, llamada temperatura de transición, T_{o-d} (Rochas, 1982) cuyo valor depende de la naturaleza del contraión y de la concentración iónica total.

2.3.6 Microestructura de la κ -carragenina

La observación microscópica de los componentes de una matriz alimenticia ayuda a estudiar las posibles interacciones de las moléculas relacionadas y conocer su comportamiento. La κ -carragenina ha sido estudiada con diversas herramientas microscópicas para conocer sus propiedades en mezcla con otras macromoléculas o en presencia de iones, en la que la preparación de las muestras es distinta dependiendo la técnica microscópica que se utilice para su observación.

La CLSM es una técnica microscópica muy utilizada para la visualización de mezclas de biopolímeros en alimentos. En la CLSM el contraste es obtenido a través de la diferencia de fluorescencia ocasionada por la adición de moléculas, llamadas fluorocromos. Cuando se agrega una sonda fluorescente a la muestra, las moléculas de la sonda se extienden sobre la muestra de acuerdo con la accesibilidad local y la afinidad. Se pueden lograr imágenes más específicas mediante el etiquetado covalente de un solo componente, e.g., polisacáridos y proteínas (van de Velde et al., 2003). Núñez-Santiago (2007) tiñó de manera covalente la κ -carragenina con el Isotiocianato de Rodamina B (RITC) para evaluar el efecto de la concentración de κ -carragenina en la formación de una red tridimensional en presencia de iones K^+ (Figura 10). La κ -carragenina es capaz de formar redes tridimensionales aún a bajas concentraciones (0.05%) y las estructuras observadas por Núñez-Santiago (2007) son características de moléculas que forman geles. La reacción de tinción de la κ -carragenina afecta la viscosidad del hidrocoloide en disolución debido a una ligera hidrólisis durante la reacción de marcado con el RITC, sin embargo, esta hidrólisis se considera aceptable respecto a la posible modificación de una muestra sin marcar (Núñez-Santiago, 2007).

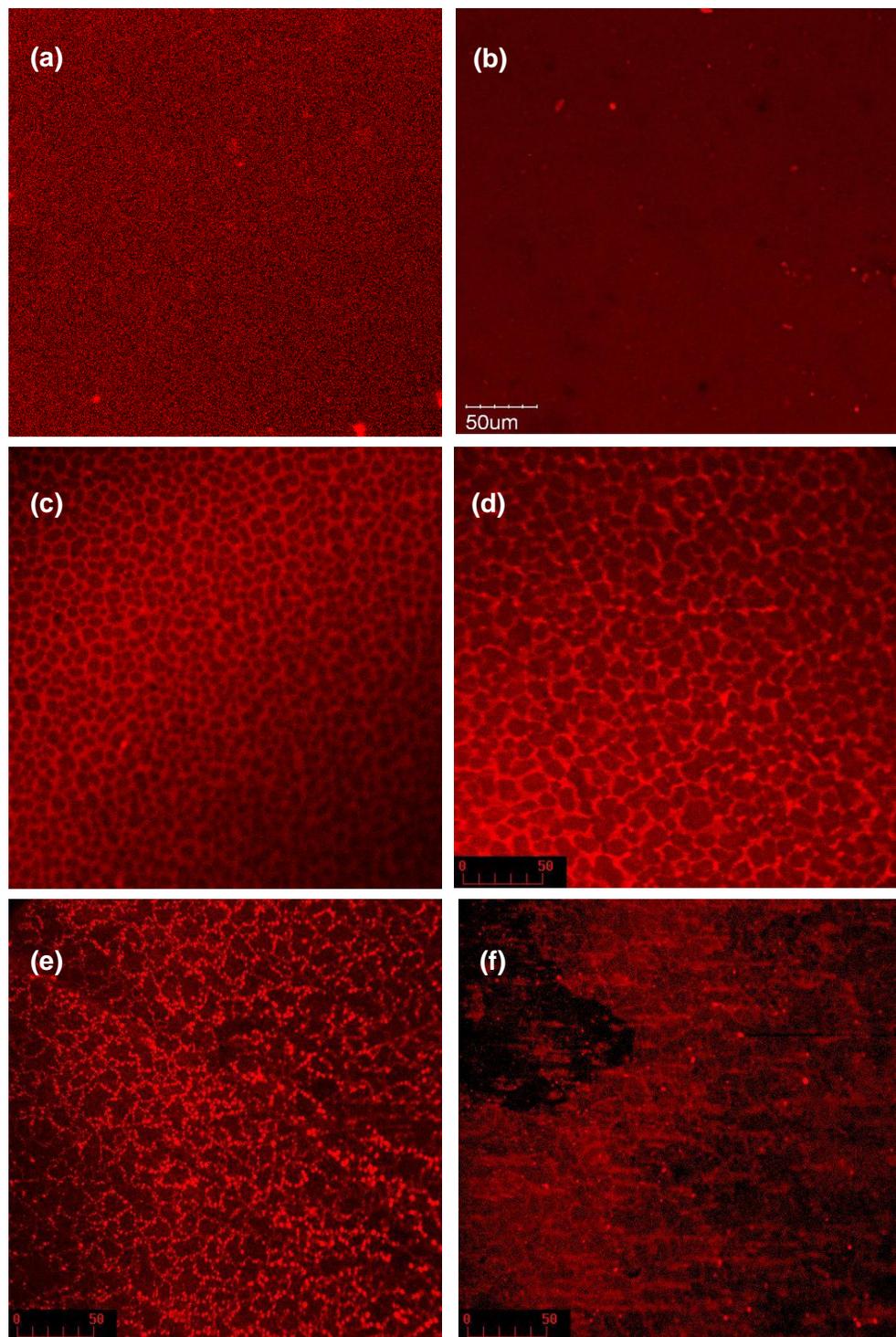


Figura 10. Microscopia confocal de barrido de RITC- κ -carragenina a $\lambda = 580$ nm. Efecto de la concentración de polisacárido sobre la formación de una red tridimensional en presencia de 40 mM de KCl. (a) 1, (b) 0.5, (c) 0.25, (d) 0.1, (e) 0.05 y (f) 0.01% masa del polímero (Núñez-Santiago, 2007).

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Almidón de maíz ceroso reticulado químicamente con ácido adípico y estabilizado con acetato (Clearam CH10®, Roquete Frères, Lestrem, France), κ -carragenina grado alimenticio (Ingredients Solutions, USA), y agua desionizada (DI). Isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma Aldrich) como fluorocromo no covalente para el CH10. Para la tinción covalente del CH10 se utilizó ácido-8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico (APTS, Sigma Aldrich). La κ -carragenina fue marcada de manera covalente con isotiocianato de Rodamina B (RITC, Sigma Aldrich).

3.2 Efecto de los procedimientos de mezclado del CH10 con la κ -carragenina. Difracción láser

La κ -carragenina y el CH10 se mezclaron siguiendo la metodología de Núñez-Santiago (2007) de tres maneras distintas para examinar el posible efecto del mezclado sobre el tamaño del gránulo de CH10 analizado por difracción láser.

Mezclado 1 (M1): Denominado “cocción conjunta”, el almidón fue cocido en presencia de la κ -carragenina en agua desionizada. El mezclado se realizó en un tanque de calentamiento sobre una parrilla con agitación magnética, usando una barra agitadora a 550 rpm. El almidón se dispersó en el agua de manera homogénea después de 3 minutos iniciada la mezcla en frío, sin embargo, la κ -carragenina comenzó a disolverse en la mezcla durante el tratamiento térmico a 40 minutos de su inicio a una temperatura de 60 °C.

Mezclado 2 (M2): Se coció el CH10 con agitación constante a 550 rpm y se disolvió la κ -carragenina en la etapa de enfriamiento de la pasta a una temperatura de 85-75 °C.

Mezclado 3 (M3): “Cocción independiente”, Se coció el CH10 sin presencia del hidocoloide y la κ -carragenina se preparó aparte, ambos componentes fueron mezclados durante la fase de calentamiento del tratamiento térmico a 75 °C.

Pasta de almidón 4% masa (A1): Esta pasta se preparó para usarla como blanco. Se determinó el tamaño de partícula de cada preparación por triplicado.

Las concentraciones de CH10 y κ -carragenina fueron en todos los casos 4 y 0.5% masa, respectivamente, considerando la humedad de cada polvo y reponiendo la masa de agua desionizada evaporada durante el tratamiento térmico. Cada mezcla se dejó estabilizar aproximadamente 18 h a temperatura ambiente.

3.2.1 Gelatinización del gránulo de almidón / Tratamiento térmico

El tratamiento para cocer el almidón se realizó en un tanque adaptado a un baño programado de la siguiente manera. El calentamiento fue de 25 a 90 °C a una tasa de 1.5 °C/min, sostenimiento a 90 °C por 10 min y enfriamiento a la misma tasa que el calentamiento hasta temperatura ambiente. (Núñez-Santiago & Tecante, 2007).

3.2.2 Tamaño de partícula por difracción láser

El equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) reporta una distribución de volumen como medida fundamental. Como tamaño de diámetro del gránulo de almidón se utiliza el diámetro mediano, $D [v, 0.5]$. Este es el tamaño de partícula que divide a la población exactamente en dos mitades iguales, es decir, 50 % de la distribución está por encima de este valor y 50 % por debajo (Malvern Instruments Ltd.1990). La difracción láser requiere la medida de los índices de refracción. Los índices de refracción usados son los reportados por Tecante y Doublier (1999), 1.3300 para la fase líquida y 1.5295 para el almidón.

Para saber si existe diferencia significativa entre los diámetros medianos de cada mezcla se realizó una prueba F de diferencia entre las varianzas, con un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha = 0.05$). Posteriormente, se realizó la prueba T de Student para varianzas iguales al 95 % de confianza, para saber si hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de las mezclas involucradas.

3.3 Tamaño del gránulo de almidón para distintas concentraciones de κ -carragenina

Se prepararon pastas de almidón 2% masa con distintas concentraciones de κ -carragenina para mostrar el efecto de la concentración de κ -carragenina sobre el tamaño del gránulo

gelatinizado y obtener la curva $D [v.0.5]$ vs [κ -carragenina]. Los polvos de CH10 y κ -carragenina se mezclaron en seco y posteriormente se dispersaron en agua desionizada a temperatura ambiente para después aplicar el tratamiento térmico ya descrito. Las concentraciones de κ -carragenina fueron escogidas en un intervalo de 0 a 5 mg/g: 0 (CH10 2%), 1, 2, 3, 4 y 5 mg/g, se utilizó dicho intervalo para poder apreciar claramente el efecto de la κ -carragenina en el tamaño de partícula, ya que a concentraciones mayores de 5 mg/g la κ -carragenina satura la superficie del gránulo de almidón y no se aprecia cambio en el tamaño del gránulo de almidón

Para comprender mejor el efecto de la concentración de κ -carragenina sobre la pasta de CH10, adicionalmente, se prepararon pastas de CH10 2% masa mezcladas con bajas concentraciones de κ -carragenina. Para ello se preparó una disolución stock de κ -carragenina (10 mg/mL), se hizo el cálculo correspondiente de la cantidad requerida en microlitros por adicionar a la dispersión de almidón en agua DI y posteriormente se aplicó el tratamiento térmico para cocer el almidón. Las concentraciones de κ -carragenina fueron: 1, 10, 50, y 100 μ g/g. El tamaño de partícula de cada mezcla fue determinado por difracción láser por triplicado, utilizando nuevamente el valor del diámetro mediano, $D [v.0.5]$, como medida del tamaño del gránulo de almidón. Se hizo una regresión polinomial de tercer orden para obtener el coeficiente de correlación r^2 .

3.4 Microscopia confocal de barrido láser (CLSM)

3.4.1 Tinción del gránulo de CH10

La tinción no covalente del almidón con FITC se realizó empleando el procedimiento descrito por Núñez-Santiago (2007) con algunas modificaciones. Se preparó una disolución de FITC (2 g/L) en una mezcla 50/50 de DMSO/agua desionizada a temperatura ambiente. La pasta de CH10 marcado se obtuvo adicionando a una suspensión al 2% masa de CH10, 25 μ L/g de la disolución marcadora a temperatura ambiente con agitación magnética. Posteriormente la suspensión almidón-marcador se calentó bajo las mismas condiciones del tratamiento térmico de gelatinización del gránulo y se almacenó a 4 °C durante 24 h previo a la observación en CLSM.

La tinción covalente del gránulo de CH10 con APTS se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Blennow (2003) con algunas modificaciones. Se preparó una disolución de marcador APTS 6 mM, APTS disuelto en una disolución al 15% de ácido acético, a temperatura ambiente. La pasta de CH10 marcado se obtuvo calentando una suspensión al 2% masa de almidón a 30 °C con agitación magnética, posteriormente se adicionaron 26 µL/g de la disolución de APTS seguidos de 45 µL de una disolución 1 M de cianoborohidruro de sodio. La mezcla de reacción se dejó incubar a 30 °C por 10 h. Pasado este tiempo se aplicó el tratamiento térmico de gelatinización del gránulo; la pasta se almacenó a 4 °C por 18 h previo a la observación en CLSM.

3.4.2 Tinción de la κ-carragenina para CLSM

La κ-carragenina se marcó de manera covalente de acuerdo con el procedimiento de De Belder y Granat (1973) con algunas modificaciones. Se disolvió 1 g de κ-carragenina en 50 mL de DMSO con agitación magnética a temperatura ambiente por 15 min. Se incorporaron cinco gotas de piridina, seguido por 0.06 g de RITC y 50 mL de dibutilindilaurato (DBTDL). La mezcla se calentó en una parrilla con agitación magnética por 2 h a 40 °C. Posteriormente la RITC-κ-carragenina se precipitó con etanol (95%) y se pasó a través de un filtro de vidrio poroso (40 – 60 µm). El precipitado se deshidrató con etanol absoluto y luego con acetona para remover el exceso de colorante. La RITC-κ-carragenina se dejó secar en una estufa a 30 °C por 24 h. Posteriormente se disolvió en agua a 80 °C por 15 min y se dializó contra agua desionizada con 0.02% de NaN₃ hasta no observar marcador libre para evitar el desarrollo microbiano. Posteriormente la RITC-κ-carragenina se liofilizó, se cortó en pedazos pequeños y se almacenó a 4 °C.

3.4.3 Mezcla de κ-carragenina y CH10 (componentes marcados).

Se prepararon dos mezclas: CH10-FITC con RITC-κ-carragenina y CH10-APTS con RITC-κ-carragenina. Se siguió el procedimiento ya descrito para teñir los gránulos de almidón. La RITC-κ-carragenina fue disuelta en la dispersión de almidón marcado durante el tratamiento térmico de gelatinización del gránulo, en la fase de calentamiento en el

intervalo de 40 – 60 °C. La concentración de las mezclas fue CH10 2% masa y κ -carragenina 0.5% masa.

3.4.3.1 Microscopia confocal de barrido láser

La CLSM se hizo en microscopio (Olympus FV1000, Olympus Fluoview) con un láser Ar/He, lámpara de mercurio y objetivos de inmersión en aceite (40 y 60x). Las muestras fueron preparadas colocando una gota de la preparación en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se observó en modo fluorescencia a temperatura ambiente. Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron: 543/575 a 640, 488/510 a 565 y 425/503 a 550 nm para el RITC, FITC y APTS, respectivamente. Se obtuvieron las observaciones en 2D y fueron almacenadas en un formato OIB. Las microscopias fueron editadas con el programa Olympus Fluoview (Versión 3.0).

3.5 Comportamiento viscoso

3.5.1 Cizalla estacionaria

Se prepararon tres mezclas: CH10 4% masa, CH10 4% masa y κ -carragenina 0.1% masa y CH10 4% masa y κ -carragenina 0.5% masa. Las mezclas se analizaron en un reómetro (ARES-G2, TA Instruments, USA). Se corrieron dos ciclos de ascenso y descenso para cada mezcla por duplicado. Se utilizó la geometría de placas paralelas de 50 mm de diámetro, con una distancia de separación entre placas de 1 mm a una temperatura de 19.4 °C. Se obtuvieron los valores del esfuerzo de cizalla ($[\tau] = \text{Pa}$) a distintas velocidades de corte ($\dot{\gamma}$: 0 – 100 s⁻¹) en dos ciclos de ascenso-descenso.

3.5.2 Curvas de flujo

Las mismas mezclas fueron analizadas en el reómetro (ARES-G2, TA Instruments, USA). Se hizo un barrido de flujo a cada muestra por duplicado. Se utilizó la geometría de placas paralelas de 50 mm de diámetro, con una distancia de separación entre cada placa de 1 mm

a una temperatura de 23 °C. Se obtuvieron los valores de viscosidad de cada mezcla a distintas velocidades de corte (γ : 0 – 200 s⁻¹).

4 Resultados y discusión

4.1 Tamaño del gránulo de almidón

4.1.1 Tipo de mezclado con κ -carragenina

El Cuadro 2 resume los tamaños del gránulo de almidón 4% con 0.5% de κ -carragenina, bajo tres distintos tipos de mezclado y de una pasta de almidón sin κ -carragenina como control. La prueba estadística T de Student permitió comprobar que no existe diferencia significativa entre los valores del diámetro mediano de las mezclas, lo cual indica que el tipo mezclado no afecta esta propiedad de las pastas. Esta determinación sólo se realizó con la finalidad de comprobar que el método de preparación de las mezclas no afecta la propiedad medida. Por lo tanto, se continuó con la determinación del tamaño de partícula de las pastas para las distintas concentraciones del κ -carragenina utilizando el tipo de mezclado 1, el cual consiste en mezclar los polvos en seco para su posterior cocción conjunta.

Cuadro 2. Diámetro mediano de las mezclas CH10 – κ -carragenina y almidón.

Muestra	D[v, 0.5] (μm)
A1 (Blanco CH10 4% masa)	42.1 \pm 0.26
M1 (Tipo de mezclado 1)	41.0 ^a \pm 1.36
M2 (Tipo de mezclado 2)	43.2 ^a \pm 1.86
M3 (Tipo de mezclado 3)	45.2 ^a \pm 1.11

^a Indica las muestras entre las que no hay diferencia significativa, T de Student.

4.1.2 Distintas concentraciones de κ -carragenina

Las distribuciones del tamaño de partícula se hicieron con una concentración 2% de CH10. En la Figura 11 se puede apreciar que el tamaño del gránulo de almidón tiende a aumentar conforme va incrementando la concentración de κ -carragenina. La línea continua en la Figura 10 es una regresión polinomial de orden tres. Los parámetros de regresión son: r^2 : 0.9675, con los coeficientes: $b [0] = 43.3765$, $b [1] = 5.6969$, $b [2] = -2.1070$, y $b [3] = 0.2530$.

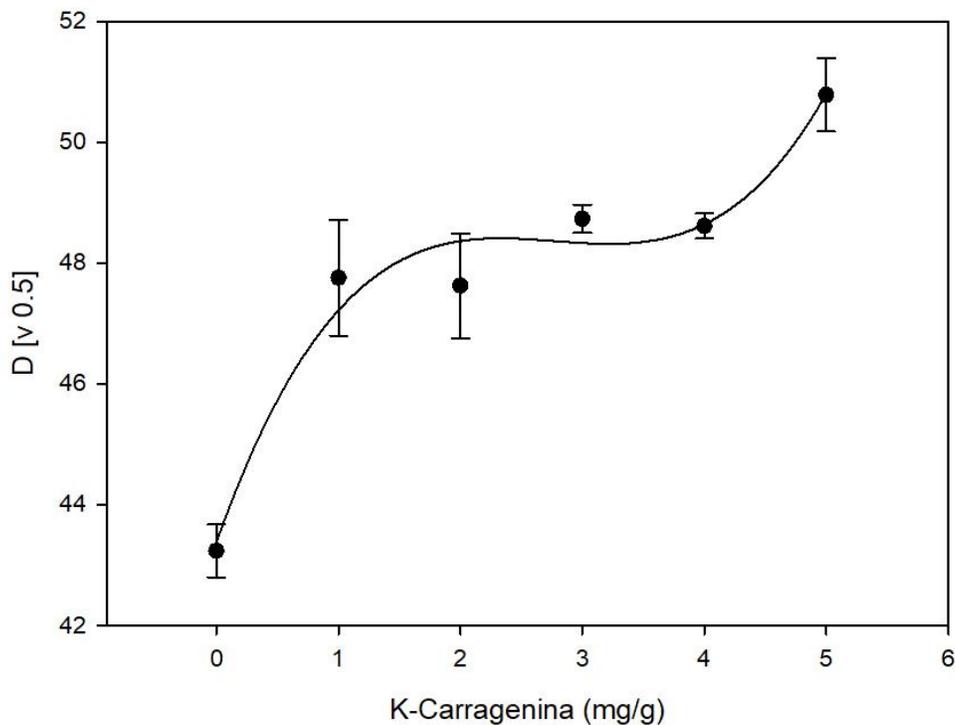


Figura 11. Distribución del tamaño de partícula de pastas de almidón al 2 % con distintas concentraciones de κ -carragenina.

El diámetro mediano es obtenido a través de distribuciones de tamaño, las cuales son transformaciones numéricas de ángulos de luz difractados usando la teoría de Mie y asumiendo partículas esféricas (Malvern Instruments Ltd.1990). Los gránulos gelatinizados se encuentran dispersos en agua desionizada, mientras que la κ -carragenina está disuelta en la fase continua, por lo tanto, el valor del diámetro mediano da una idea sobre el efecto que tiene el hidrocoloide en la gelatinización e hinchamiento del gránulo. El aumento en la concentración de κ -carragenina aumenta el diámetro mediano, sin embargo, entre 1 y 4 mg/g (Figura 11) se aprecia un comportamiento medianamente constante en el valor del diámetro medio. Durante el tratamiento térmico, mientras el almidón se gelatiniza e hincha, la κ -carragenina se disuelve y probablemente se adhiere a la superficie del gránulo. No obstante, puede ser que la superficie se haya “saturado” de κ -carragenina y por ello el diámetro mediano no aumentó más (Núñez-Santiago, 2007). Un posterior aumento hasta 5 mg/g muestra una nueva tendencia creciente, donde dicho repunte se puede asociar a la interacción de las moléculas de κ -carragenina en la superficie del gránulo.

Tecante y Doublier (1999) reportan que cocer almidón en presencia de κ -carragenina conduce a un aumento en el tamaño de los gránulos de almidón y del poder de hinchamiento. Para explicar este comportamiento, los autores sugirieron que la presencia de carragenina durante la cocción de almidón podría promover fricciones entre los gránulos de almidón y aumentar así su hinchamiento, aunque no se proporcionó una explicación a este fenómeno. Matignon et al. (2014a) realizaron la misma medición del diámetro mediano y nivel de hinchamiento mezclando un almidón de maíz ceroso modificado con carrageninas compuestas, en distintas proporciones, de κ , ι y λ carragenina, obteniendo el mismo comportamiento de aumento en el tamaño del gránulo y su hinchamiento. Concluyendo, al igual que Tecante y Doublier (1999), que la presencia y el "número" de macromoléculas distintas del almidón en el medio o adsorbidas en los gránulos de almidón podrían promover las fricciones entre los gránulos de almidón y aumentar así su hinchamiento.

En las mezclas de la Figura 11 se observó un incremento rápido del diámetro mediano para las concentraciones de κ -carragenina menores a 2 mg/g por lo que se investigó el efecto de la κ -carragenina sobre dicho diámetro en el intervalo de concentraciones de carragenina de 0 a 1 mg/g

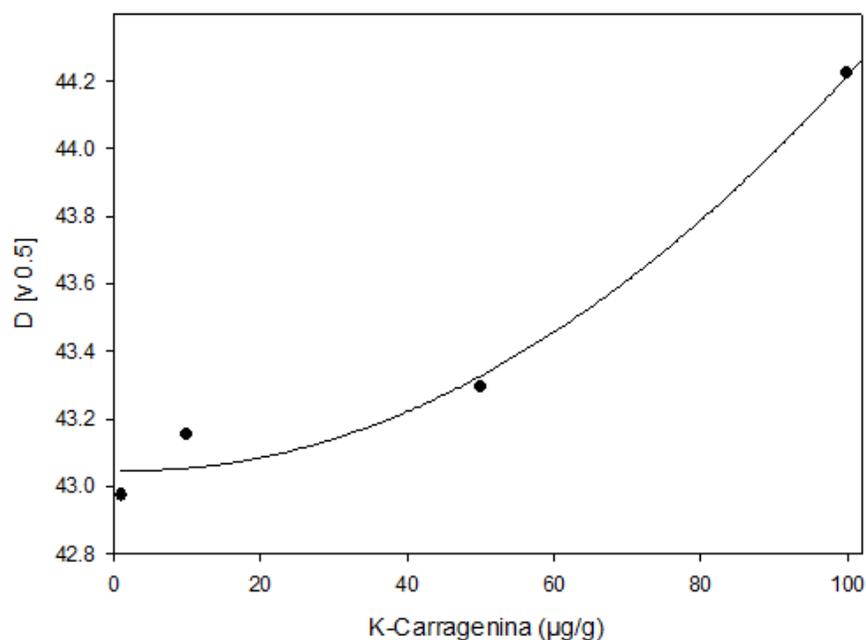


Figura 12. Distribución del tamaño de partícula de almidón al 2% a distintas concentraciones de κ -carragenina

En la Figura 12 se puede apreciar la misma tendencia en el diámetro mediano del gránulo de almidón, el cual aumenta conforme aumenta la concentración del hidrocoloide. La κ -carragenina, al ser un polisacárido de elevada masa molar no puede penetrar en el gránulo de almidón y hacer que éste aumente su diámetro. Entonces, una posible explicación de que el tamaño del gránulo aumente conforme se incrementa la concentración del hidrocoloide puede ser atribuida a un fenómeno de adsorción, en el cual la κ -carragenina se adsorbe sobre la superficie del gránulo de almidón (Núñez-Santiago, 2007). Este fenómeno de adhesión entre un hidrocoloide y los gránulos de almidón de maíz ceroso ha sido observado en mezclas de almidón con xantana (Gonera & Cornillon, 2002) y con gelana (van de Velde et al., 2003), donde dichos hidrocoloides mantienen la integridad de los gránulos de almidón, durante la gelatinización, debido a su asociación a la superficie de estos. Al igual que la κ -carragenina, la gelana y la xantana son polisacáridos aniónicos solubles en agua usados como espesantes en alimentos y también usados en la industria farmacéutica.

No se encontró información que respaldara la interacción entre la superficie del gránulo gelatinizado y la κ -carragenina, aunque, se sabe que en todas las mezclas preparadas la κ -carragenina se encuentra en disolución acuosa y en ausencia de iones, ésta adopta una conformación desordenada, en la cual el hidrocoloide se encuentra en forma de hebra expandida debido al efecto de las repulsiones electrostáticas de los segmentos de las cadenas y tiene una gran capacidad de absorción de agua (Harding et al., 1996). Con base en esta consideración en un sistema donde el almidón y la κ -carragenina absorben agua conforme ocurre la gelatinización se esperaría que hubiese una menor cantidad de agua disponible y, por ende, el tamaño del gránulo de almidón no aumentase en presencia del hidrocoloide. Sin embargo, al observar lo contrario con los diámetros medianos del gránulo de almidón para distintas concentraciones de κ -carragenina, se confirmó la necesidad de examinar la microestructura de las mezclas para visualizar alguna interacción de las macromoléculas y poder explicar el aumento ya señalado en el gránulo de maíz ceroso modificado y gelatinizado.

4.2 Microestructura

4.2.1 Microscopía confocal de barrido láser

Es posible obtener imágenes más específicas de cada uno de los componentes de las mezclas con marcadores específicos covalentes o no covalentes. De cualquier forma, en ambos tipos de marcaje, se espera que la presencia del marcador no cambie las propiedades de los componentes de las mezclas y, por ende, no afecte la estructura y la distribución del espécimen.

Tinción de CH10 con APTS

Una pasta de almidón de maíz ceroso modificado fue marcada con APTS y observada con CLSM en tres distintos campos, como se muestra en la Figura 13. La tinción de los gránulos con APTS muestra una fluorescencia considerable a pesar de que el marcaje por aminación reductora es más eficiente en almidones con mayor contenido de amilosa que de amilopectina (Blennow et al., 2003). Matignon et al. (2014b) demostraron, sin embargo, que el APTS puede marcar almidones cerosos y elucidar su estructura, lo cual se confirma en las microscopias obtenidas en este trabajo (Figura 13). En esta reacción, solo el extremo reductor de la molécula de almidón reacciona con el grupo amino primario del APTS para producir una base de Schiff, que, en presencia de exceso de cianoborohidruro de sodio, se reduce a una amina secundaria estable. Por lo tanto, solo un fluoróforo es introducido por oligómero (O'Shea et al., 1998).

Al aplicar el tratamiento térmico a la pasta de almidón teñida con APTS, el gránulo se hinchó y sólo en la periferia de los gránulos se pueden apreciar la fluorescencia. Las zonas oscuras no fluorescentes indican que no hay marcados en el interior del gránulo. Los gránulos de CH10 muestran una heterogeneidad de formas y los campos observados parecen estar saturados de gránulos, sin embargo, es posible apreciar en la Figura 13a algunos gránulos segregados. El tamaño de los gránulos como se ve en cada plano focal varía. Esto puede explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la observación se realizó en un plano focal que pasó a través de los gránulos de almidón hinchados a diferentes niveles. No se observaron

gránulos rotos o fragmentos de almidón producto de lisis del gránulo, por lo que la reacción de tinción no afectó ninguna característica del gránulo a nivel estructural.

Tinción de CH10 con FITC

El FITC es frecuentemente utilizado para marcar los gránulos de almidón por difusión (van de Velde et al., 2003) y es un marcaje no covalente. Existe una gran afinidad entre el almidón y el FITC lo cual se puede apreciar en las microscopías de la Figura 14 donde en un plano (Figura 14c) se puede apreciar la superficie de los gránulos totalmente cubierta con el fluorocromo.

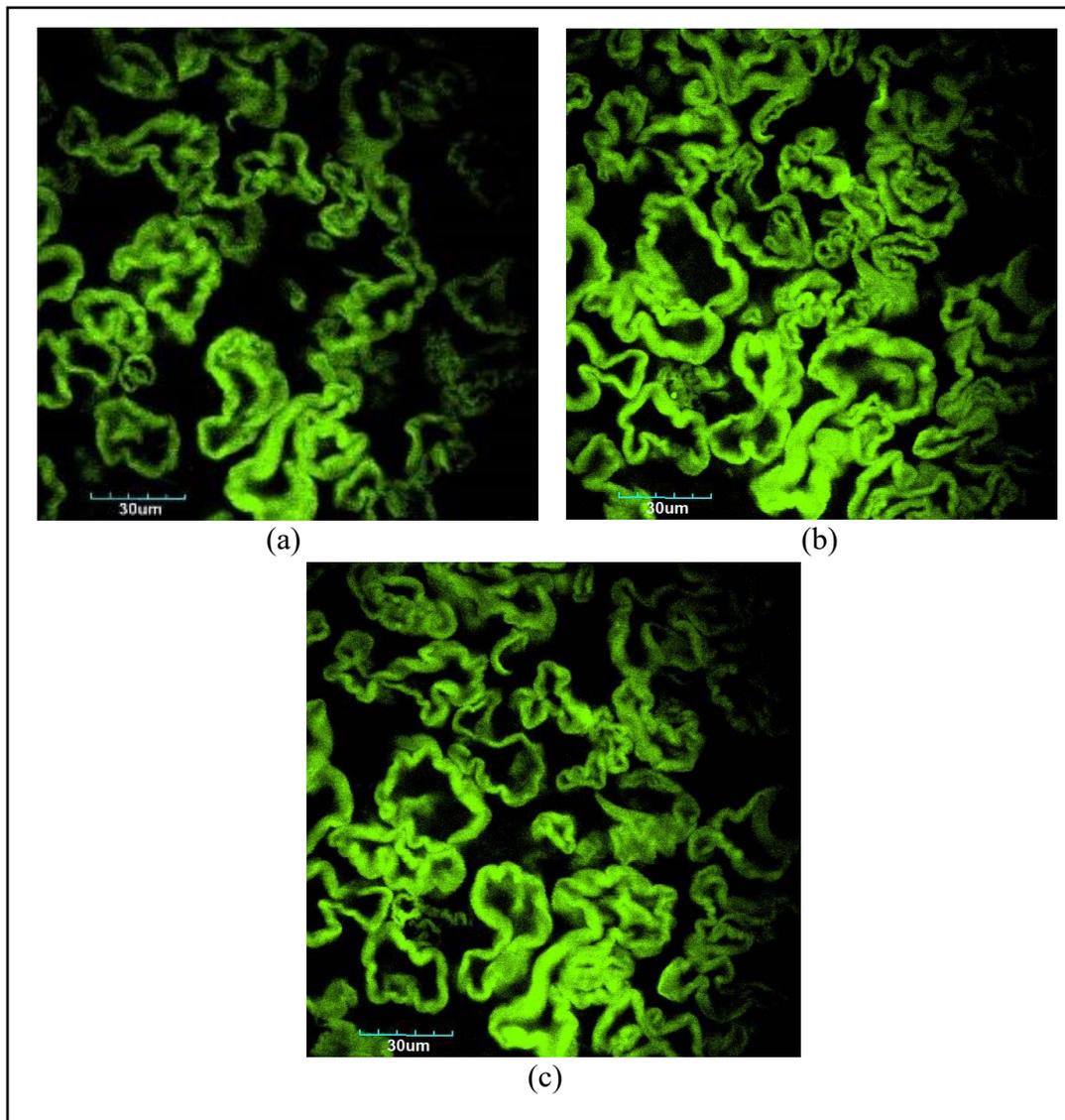


Figura 13. Imágenes de CLSM de almidón de maíz ceroso entrecruzado cocido (2% masa), marcado con APTS (26 $\mu\text{L/g}$) a $\lambda = 520 \text{ nm}$. (a), (b) y (c) son tres enfoques distintos del campo observado. Objetivo 60x

No obstante, no se puede afirmar que el marcador penetró en el gránulo ya que en los demás campos (Figuras 14a y 14b) las zonas de mayor fluorescencia son en la periferia de los gránulos, lo cual impide observar estructuras internas.

La naturaleza de la interacción FITC-CH10 no es bien conocida. Núñez-Santiago (2007) realizó determinaciones de distribución de tamaño de partícula de pastas de CH10 al 1% con marcaje y sin marcaje de FITC (12.5 mL/g) y demostró que el FITC no modifica la

distribución de tamaños del gránulo de CH10, lo cual es importante a nivel de estructura del gránulo gelatinizado marcado, ya que el marcador no afecta la absorción de agua por el gránulo. Aunque los marcadores (FITC y APTS) no penetraron en el gránulo, la técnica CLSM permite observar detalles en la superficie del gránulo y rugosidad producida por la resistencia del gránulo al tratamiento termo-mecánico durante la cocción. Todas estas características estructurales podrían influir en las reacciones granulares (Huber & BeMiller, 2000).

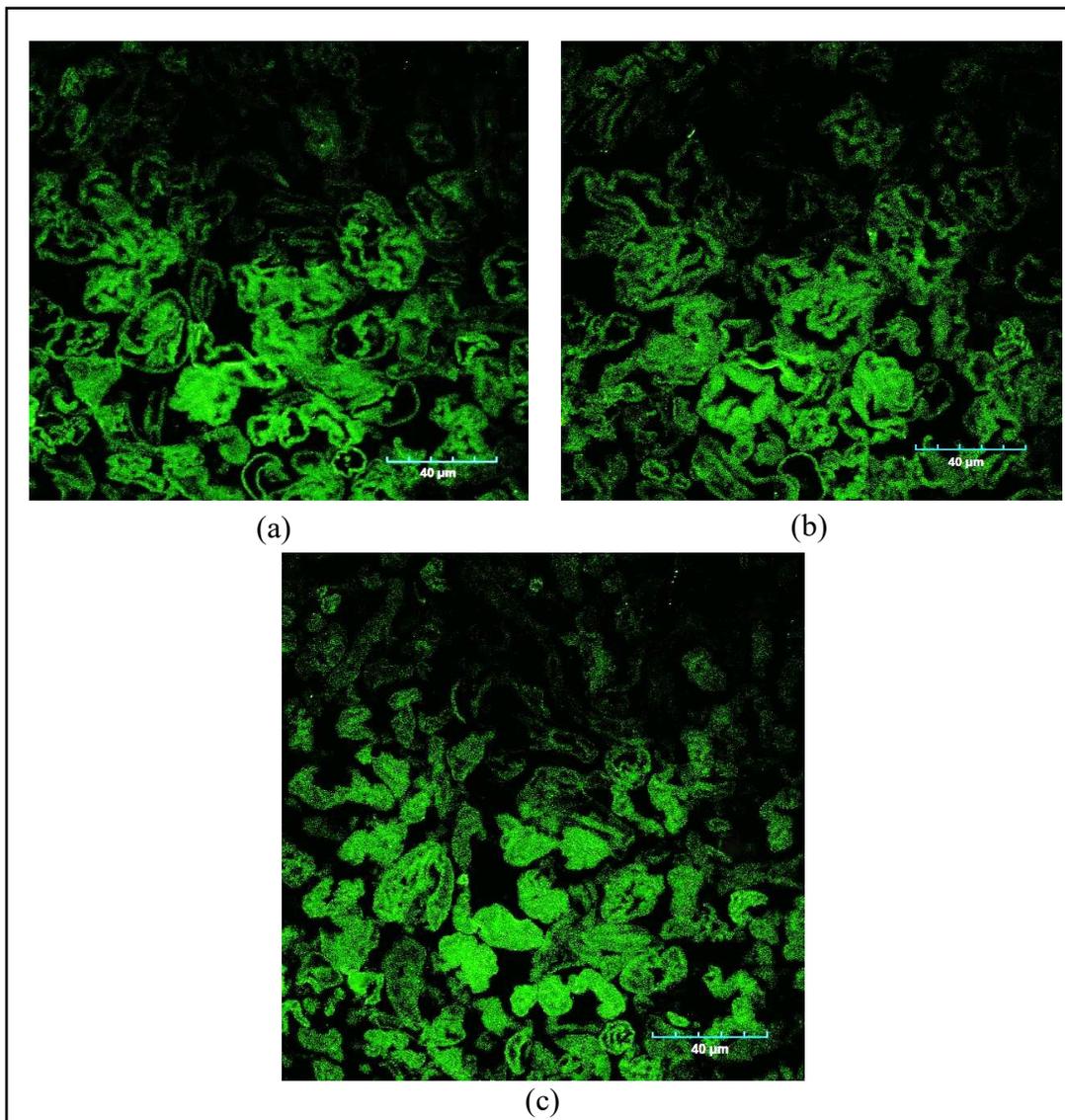


Figura 14. Imágenes CLSM de almidón de maíz ceroso entrecruzado cocido (2% masa), marcado con FITC (25 $\mu\text{L/g}$) a $\lambda = 528 \text{ nm}$. (a), (b) y (c) son 3 enfoques distintos del campo observado. Objetivo 40x

κ -carragenina (Tinción covalente con RITC)

La Figura 15 muestra la microscopía de κ -carragenina al 0.5% marcada de manera covalente con el RITC. El RITC se observa como la señal roja unida a la κ -carragenina, donde el hidocoloide se encuentra disperso en la fase continua, agua desionizada, en su estado desordenado sin la formación de redes tridimensionales debido a la ausencia de iones y con una distribución homogénea del fluorocromo. No obstante, la CLSM permite observar la microestructura del hidocoloide en presencia de otras moléculas mediante su observación simultánea por diferencia de fluorescencia.

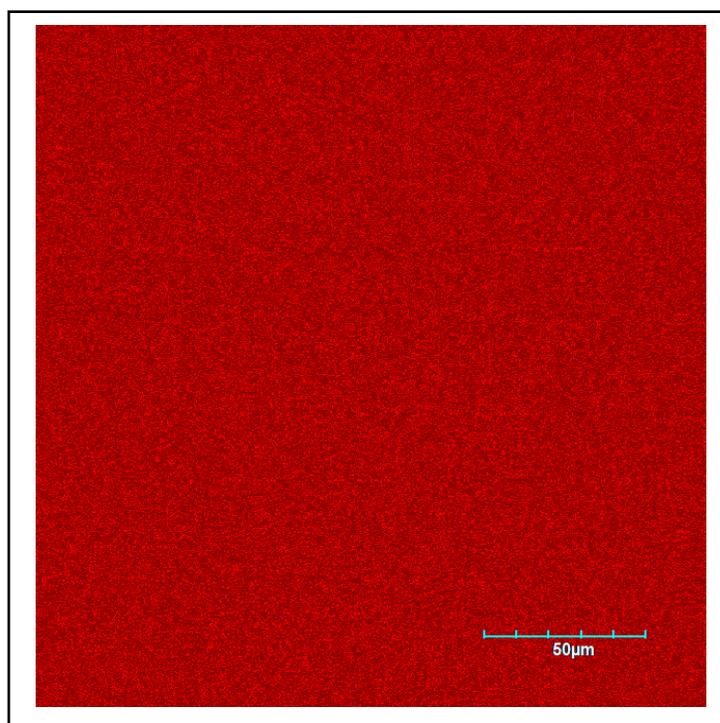


Figura 15. Imagen CLSM de RITC- κ -Carragenina (0.5%) a $\lambda = 575$ nm, en ausencia de iones potasio K^+ .

Mezcla FITC-CH10 con RITC- κ C

El estudio de mezclas binarias con CLSM permite resaltar con mayor precisión el comportamiento de los componentes y conduce a la comprensión secuencial de mezclas más

complejas. La Figura 16 muestra las observaciones de una pasta de CH10 al 2% teñido con FITC en una disolución de κ -carragenina 0.5% marcada covalentemente con RITC.

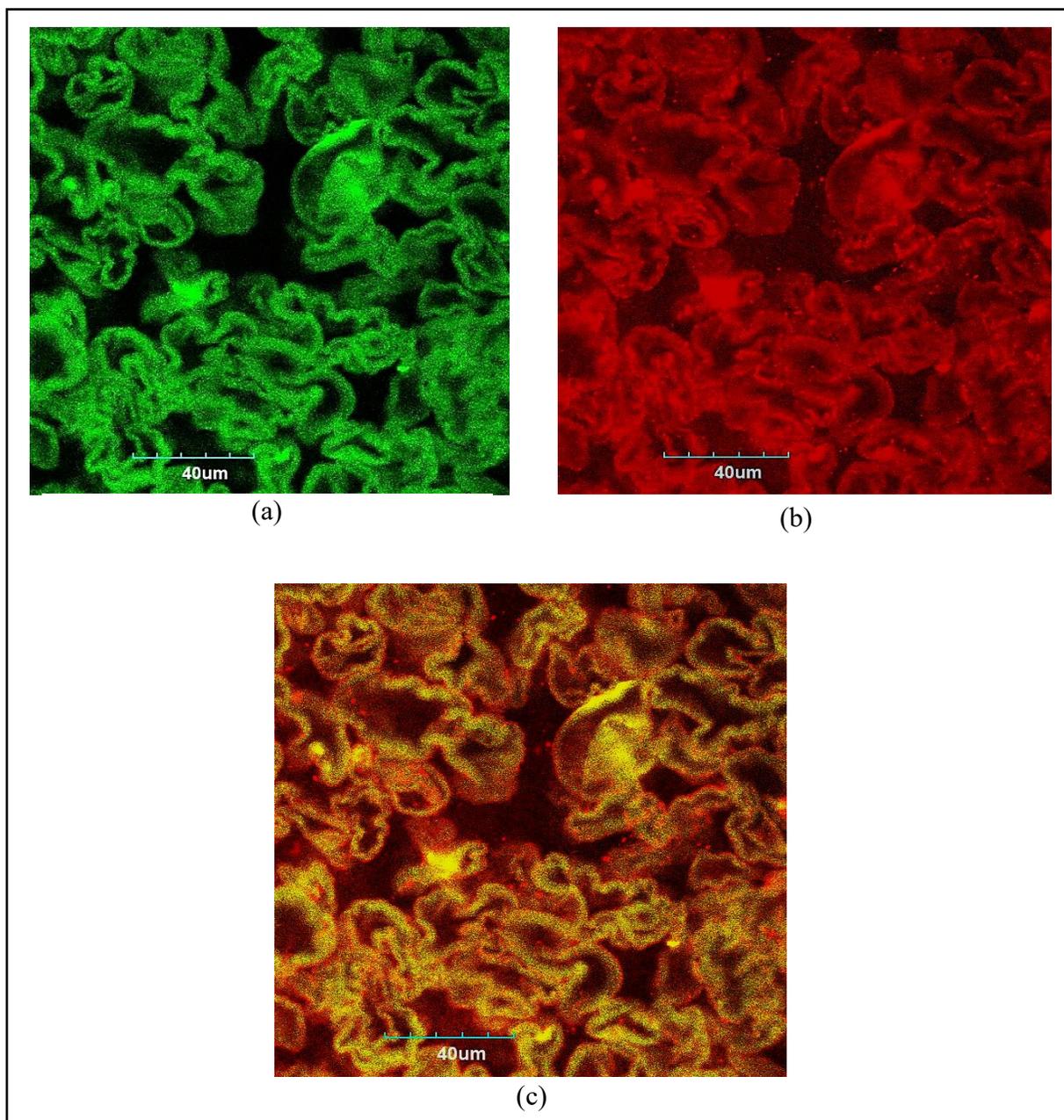


Figura 16. Imágenes CLSM de una mezcla de CH10-FITC (2%) con κ -Carragenina-RITC (0.5%) en agua desionizada y en ausencia de iones potasio K^+ .

Las imágenes de las Figs. 16a y b muestran las zonas que presentan fluorescencia debidas al APTS (señal verde) y al RITC (señal roja). Las zonas que se observan con mayor densidad en la Fig. 16a corresponden a los gránulos de almidón gelatinizados, los cuales, conservan su integridad y una distribución heterogénea. La Fig. 16b es muy idéntica con los gránulos teñidos de color rojo correspondiente al RITC unido covalentemente a las cadenas de κ -carragenina, no obstante, también se aprecia el fondo con una ligera tonalidad roja. Debido a que ambas moléculas fueron marcadas con distintos fluorocromos se observan a distintas longitudes de onda. La imagen empalmada (Fig 16c.) muestra las zonas de colocación o empalme del almidón/ κ -carragenina, en la cual los gránulos de almidón predominan con una tonalidad amarilla, obtenida de mezclar rojo y verde, y la κ -carragenina principalmente en la periferia de los gránulos y, en menor medida, sin asociarse con la superficie del gránulo en la fase dispersa. La notable señal amarilla y las zonas rojas en los contornos de los gránulos sugieren que la κ -carragenina presente durante la gelatinización del CH10 se adsorbe sobre la superficie de los gránulos o en los alrededores de estos. Resultados parecidos fueron obtenidos en mezclas de almidón con κ -carragenina-RITC por Matignon et al. (2014b) a una concentración del 2% de almidón y 0.17% de κ -carragenina marcada covalentemente y por Espinosa-Dzib et al. (2012) con concentraciones de CH10 1% y 0.75% de κ -carragenina-RITC.

Mezcla APTS-CH10 con RITC- κ C

La Figura 17 muestra las imágenes CLSM de la mezcla de CH10 al 2% marcado covalentemente con APTS (señal verde) en una disolución de κ -carragenina 0.5% marcada covalentemente con RITC (señal roja). Los gránulos de almidón aparecen teñidos totalmente por la señal verde del APTS (Figura 17a) y la κ -carragenina se aprecia principalmente en los contornos rojizos de los gránulos (Figura 17b). Aparentemente, la κ -carragenina no llenó todo el volumen de la fase continua; el fondo negro indica zonas ausentes de marcador debido a la afinidad de la κ -carragenina al gránulo. La colocación (Figura 17c) muestra los gránulos con coloración amarilla y resalta más la adsorción de la carragenina en el contorno y en la superficie del gránulo.

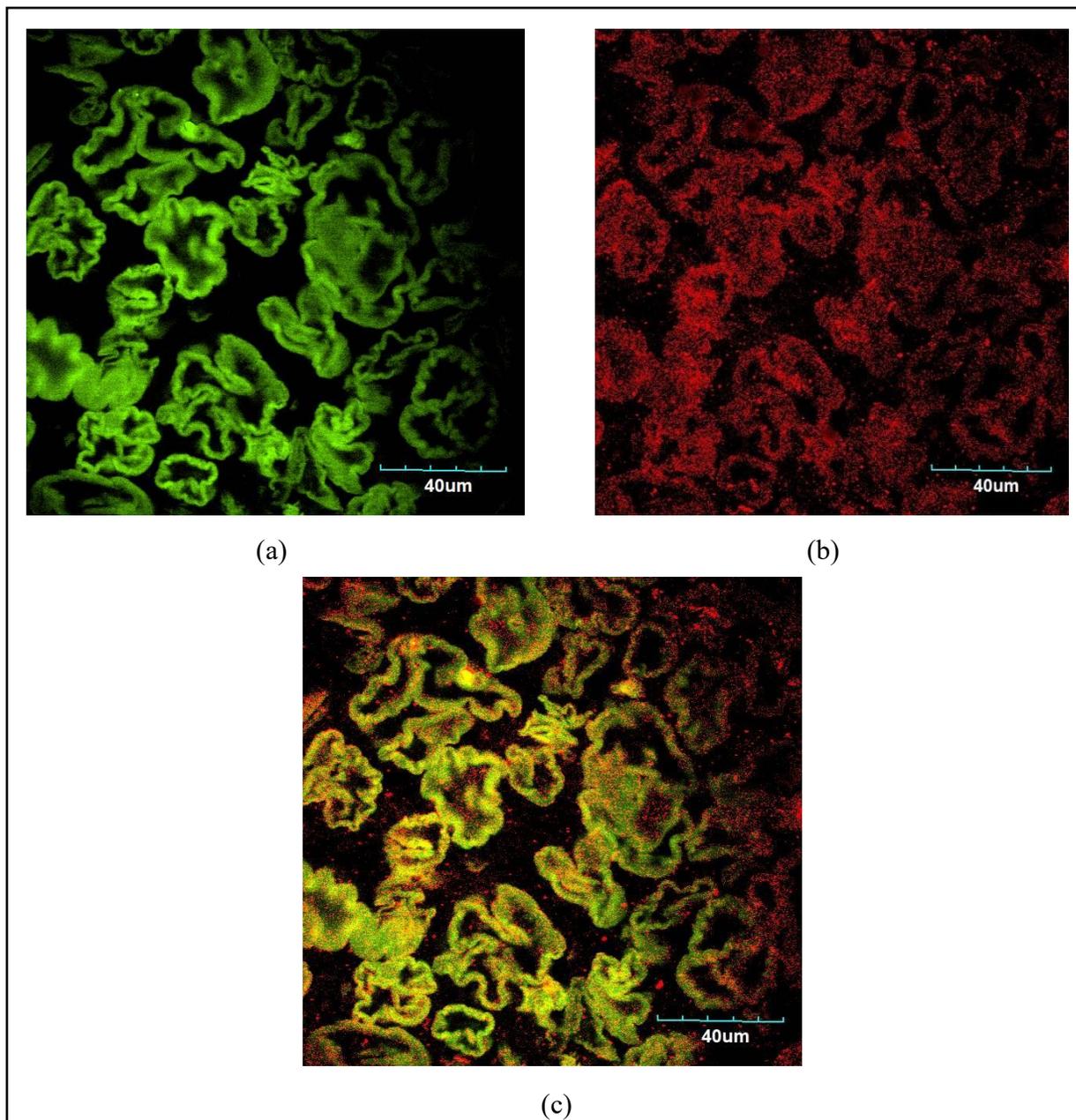


Figura 17. Imágenes CLSM de una mezcla de CH10-APTS (2%) con -K-Carragenina-RITC (0.5%) en agua desionizada y en ausencia de K^+ .

4.3 Mediciones de viscosidad

Las tres pastas presentan un comportamiento no Newtoniano y también es apreciable en la Figura 18 que hay una ligera histéresis entre los ciclos de cizalla en las tres pastas, aunque es mayor en la mezcla de CH10 al 4% con κ -carragenina al 0.1%, la mezcla que presenta el menor grado de histéresis es la que tiene la mayor concentración de carragenina (0.5 %). La histéresis es la propiedad de un material de tomar valores distintos de esfuerzo de corte para el mismo valor de la velocidad de cizalla en ascenso y descenso.

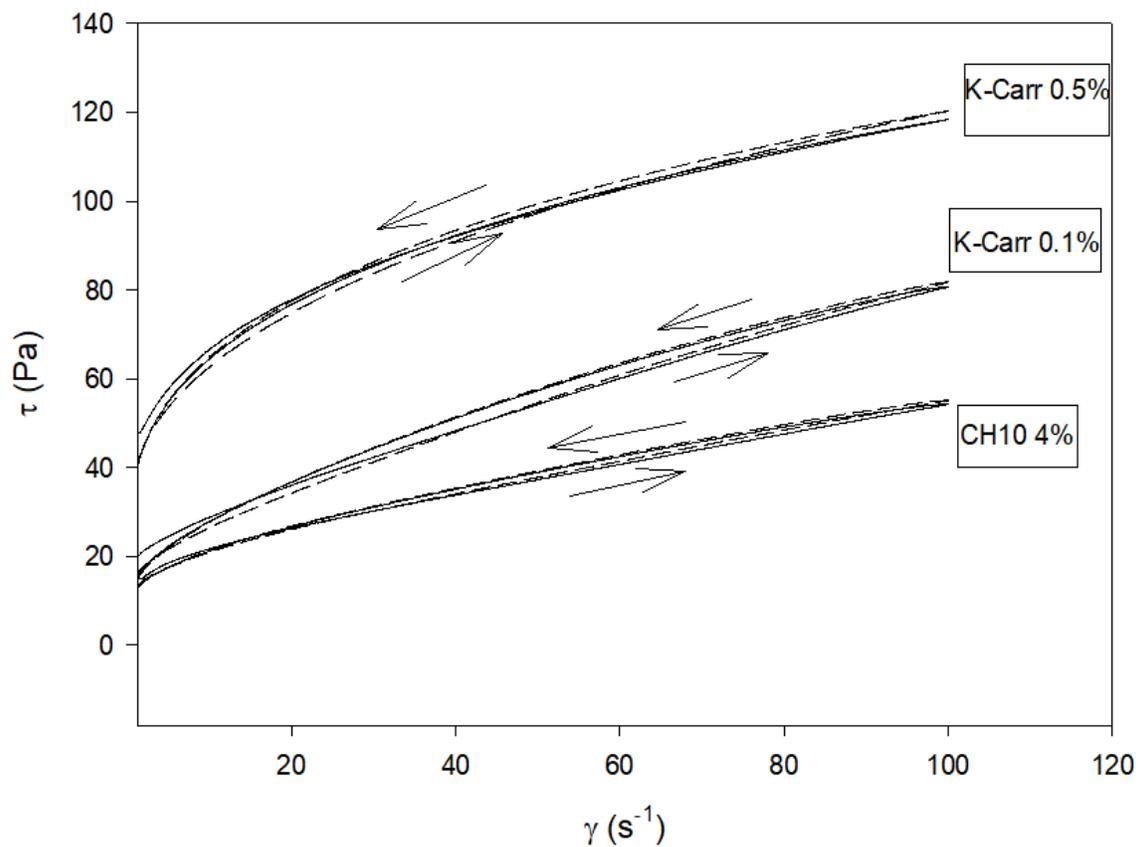


Figura 18. Cizalla estacionaria a 19 °C de almidón al 4 % y mezclas con κ -carragenina a dos distintas concentraciones. Las líneas punteadas indican el segundo ciclo ascenso-descenso.

En todos los casos la curva de ascenso de velocidad de deformación estuvo por debajo de la curva de descenso. Se ha citado este tipo de comportamiento como “anti-tixotropía”, el cual es un efecto del tiempo. Sin embargo, un segundo ciclo ascenso-descenso muestra la

desaparición de histéresis, lo que se debe a una reorientación de los gránulos de almidón inducida por la cizalla o corte. En otras palabras, la cizalla continua destruye los efectos del tiempo. Los valores de esfuerzo de la suspensión de CH10 con κ -carragenina 0.5 % son mayores que los de las otras suspensiones, lo que se debe a que hay una mayor interacción entre los gránulos y el hidrocoloide.

En la Figura 19 se aprecia que todas las pastas presentan un comportamiento no newtoniano fluidificado por cizalla. A mayor concentración de hidrocoloide en la pasta, se incrementan los valores de viscosidad. Las tres curvas obtenidas son características de este tipo de comportamiento, estos son materiales que ven reducida su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación. Si el valor de esta viscosidad disminuye también con el tiempo es el caso de un fluido tixotrópico, mientras que si aumenta con el tiempo a cizalla constante es un fluido anti-tixotrópico (antiguamente reopéctico). Ejemplos de fluidos tixotrópicos son pastas de almidón, gelatinas, mayonesas, pinturas, y adhesivos (Rojas & Briseño, 2012). La κ -carragenina, en ausencia de otras moléculas y iones, es soluble en agua caliente (75 °C) y forma soluciones de alta viscosidad muy estables aun a bajas concentraciones (0.1 a 0.5%), el aumento de la viscosidad es proporcional al aumento de la concentración del hidrocoloide y al aumentar la velocidad de deformación su viscosidad disminuye (Núñez-Santiago, 2007; Tran Nu Thanh Viet Bui, 2019)

Las causas más comunes que provocan la variación de la viscosidad con el tiempo suelen estar asociadas con la ruptura o la formación de agregados coloidales e interacciones que formen una estructura reticular en la muestra. Experimentalmente es difícil detectar diferencias entre el adelgazamiento por cizalla, antiguamente llamado pseudoplasticidad, o la tixotropía ya que los efectos combinados de la cizalla y el tiempo pueden empalmarse durante una medición, con el inconveniente añadido de que la mayoría de los fluidos tixotrópicos son adelgazados por cizalla. Muchos materiales muestran este tipo de comportamiento en mayor o menor grado y es el comportamiento muy común en los fluidos no newtonianos (Cárdenas et al., 2011).

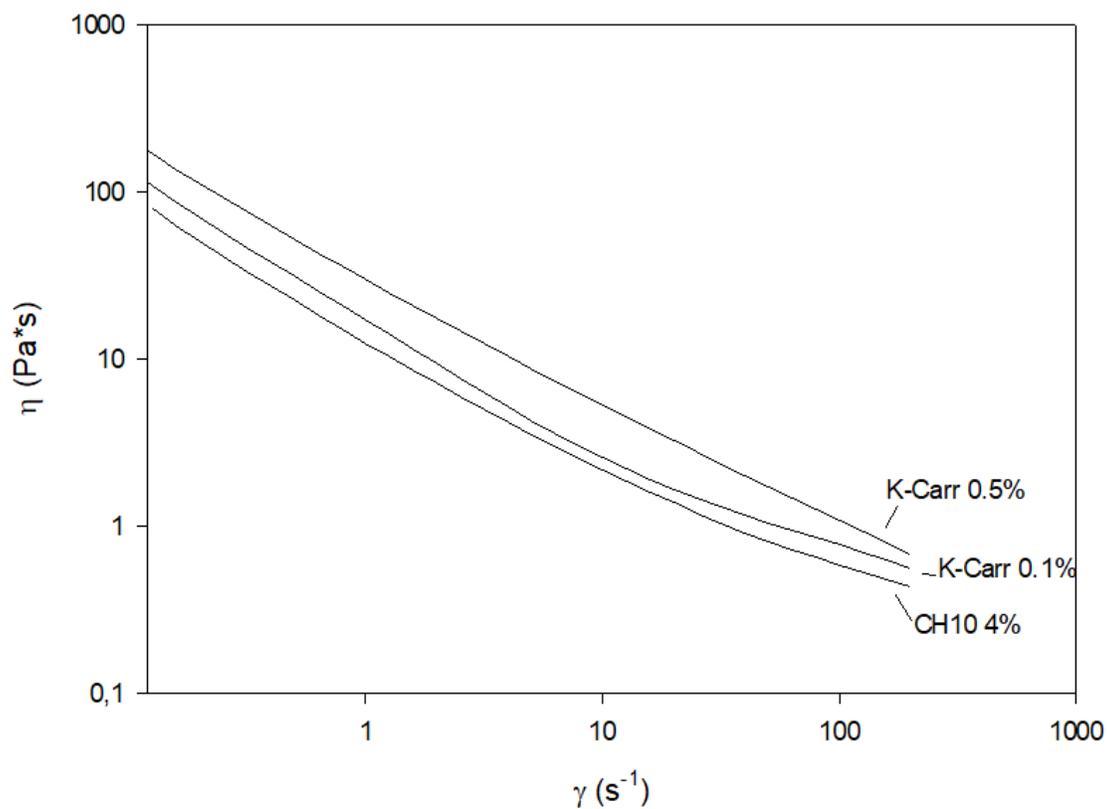


Figura 19. Curvas de flujo a 23 °C de almidón al 4 % y mezclas con κ -carragenina a dos distintas concentraciones.

4.4 Discusión

La difracción láser es una técnica que proporciona un valor aproximado del tamaño del gránulo, que se ve afectado durante el proceso de gelatinización debido a factores como la temperatura de gelatinización y la presencia de otras moléculas. Los valores del diámetro mediano del gránulo mostraron que en presencia de κ -carragenina, el tamaño del gránulo de CH10 gelatinizado aumenta de manera proporcional al aumento de la concentración del hidrocoloide en el intervalo estudiado. A concentraciones mayores de κ -carragenina se esperaría que tanto la saturación del hidrocoloide en la superficie del gránulo y las interacciones de repulsión entre las cadenas de κ -carragenina en el sistema, interfieran en la medición del diámetro mediano y se haga despreciable la tendencia creciente del gránulo en presencia de κ -carragenina.

La microscopía confocal de barrido láser resulta ser una herramienta muy útil para evaluar la interacción de ambas moléculas y así explicar el comportamiento observado. El marcaje fluorescente del almidón resulta ser eficiente tanto en la reacción covalente con el APTS, como en la difusión del FITC por afinidad con el gránulo a pesar de que el marcaje covalente es el recomendado para observar polisacáridos (van de Velde et al., 2013). Las imágenes colocalizadas de las mezclas de almidón- κ -carragenina muestran un comportamiento similar referente al acomodo de las moléculas donde la κ -carragenina interacciona en la periferia de los gránulos de almidón mediante una posible adsorción en la superficie que estaría estabilizada por puentes de hidrógeno.

En mezclas de diferentes hidrocoloides con almidón se ha demostrado la penetración de pequeñas moléculas como la sacarosa en los gránulos de almidón de maíz (Gonera & Cornillon, 2002). Sin embargo, las moléculas con una masa molar mayor de 1000 g/mol no pueden penetrarlos, tal es el caso de la κ -carragenina.

Los resultados obtenidos del tamaño de gránulo de almidón en presencia de κ -carragenina por difracción láser, se pueden complementar con lo observado en las microscopías de ambos componentes mezclados. A una concentración de 5 mg/g de κ -carragenina se obtuvo un mayor tamaño de gránulo (Figura. 11) y, visualmente, la señal roja de la κ -carragenina satura la superficie del gránulo (Figs. 16 y 17), indicando que la posición de la κ -carragenina en la superficie del gránulo influye en la lectura de difracción láser y en las propiedades estructurales del gránulo gelatinizado.

Aunado a las observaciones microscópicas, el estudio de viscosidad refleja el efecto de una molécula en presencia de la otra; a una concentración del 0.5% de κ -carragenina, en la pasta de almidón al 2%, la κ -carragenina adsorbida en la superficie del gránulo ocasiona que, al aplicar la cizalla estacionaria, el valor del esfuerzo sea mayor comparado con una mezcla similar con 0.1% de κ -carragenina. El gránulo suspendido en la fase dispersante se hincha conforme alcanza la temperatura de gelatinización, ocasionando que la fase dispersante disminuya e incremente la concentración de κ -carragenina disuelta en el medio; y debido a que la viscosidad de una solución de κ -carragenina depende en mayor parte de la viscosidad, la gelatinización del gránulo, en presencia de κ -carragenina, ocasiona un aumento de la

viscosidad en la pasta al 2% de almidón y es más viscosa la pasta con un 0.5% de κ -carragenina que con 0.1% del hidrocoloide.

5. Conclusiones generales

El tamaño de partícula del gránulo de una pasta al 2% de almidón de maíz ceroso modificado tiende a incrementar conforme hay más concentración de κ -carragenina. Los tipos de mezclado utilizados en el presente trabajo, para las pastas del almidón de maíz ceroso con la κ -carragenina, no afectan el tamaño de partícula determinado por difracción láser.

Se pudo observar la interacción del almidón de maíz ceroso reticulado químicamente con la κ -carragenina y mostrar que la κ -carragenina se encuentra principalmente adsorbida en la superficie del gránulo lo cual influye en el tamaño del gránulo que se determinó por difracción láser.

Las pastas de almidón son fluidos no newtonianos y su viscosidad aumenta en presencia de κ -carragenina.

Referencias

- BeMiller, J. N. (2011). Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 386-423.
- Blennow, A., Hansen, M., Shulz, A., Jorgensen, K., Donald, A.M., Sanderson, J. (2003) The Molecular deposition of trasgenically modified starch granule as imaged by functional microscopy. *Journal of Structural Biology*. 143, 229-241.
- Buléon, A., Colonna, Planchot, V. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 18, 85-112.
- Cairns, P., Atkins, E., Miles, M. & Morris, V. (1991) Molecular transforms of Kappa carrageenan and furcellaran from mixed systems. *International of Biological Macromolecules* 13, 65-67.
- Cárdenas. J. C., López O., Pinto K. (2011). Estudio reológico de los fluidos viscoelásticos surfactantes utilizados en operaciones de fracturamiento hidráulico. *El Reventón Energético*, Vol. 9, pp 5/12.
- Chandrasekaran, R. (1998). X-ray diffraction of food polysaccharides, in *Advances in food and nutrition research*, Vol 42, Taylor, S. pp. 131-210, Academic Press, ISBN 10: 0-12-374120-3, USA.
- Chaudemanche, C., & Budtova, T. (2007) Mixtures of pregelatinised maize starch and j-carrageenan: Compatibility, rheology and gelation. *Carbohydrate Polymers*, 72 579–589
- De Belder, A.N., Granat, K. (1973) Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. *Carbohydrate Research*, 30 375-378.
- De Ruiter, G. A., & Rudolph, B. (1997). Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 389–395.
- Descamps, O. Langevin, P. & Combs, D.H. (1986). Physical effect of starch/carrageenan interaction in water and milk. *Food Technology*. 40, 81-87
- Donald, A.M., Waigh, T.A., Jenkins, P.J., Debet, M.&Smith, A. (1997). Internal structure of starch granules. *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge pp.172-178.

Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., & Escher, F. (2001). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science & Technology*, 34(1), 11–17.

Espinosa-Dzib, A., Ramírez-Gilly, M., & Tecante, A. (2012). Viscoelastic behavior and microstructure of aqueous mixtures of cross-linked waxy maize starch, whey protein isolate and κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 28, 248–257.

Fennema, O. R., (2002). *Química de los alimentos*. 3ª edición. Zaragoza: Acribia, S.A

Fennema, O. R., & Tannenbaum, S. R., (1992) *Introducción a la química de los alimentos*. 2ª edición. Zaragoza: Acribia, S.A

Fitton, M.G., & Gonze, M., (1988) Procedimiento para la preparación del almidón reticulado. Patente No. 157601. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México.

Glicksman, M. (1969). *Gum technology in the food industry*. Ed. Academic, New York. EE.UU. 200-250

Gonera, A., & Cornillon, P. (2002). Gelatinization of starch/gum/sugar systems studied by using DSC, NMR, and CSLM. *Starch/Stärke*, 54, 508–516.

Harding, S.E., Day, K., Dhami, R. & Lowe, P.M. (1996). Further observations on the size, shape and hydration of kappa-carrageenan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, 32, 81-87.

Heinze, T., Liebert, T., Koschella, A., (2006) *Esterification of Polysaccharides.*, Vol. XVI, pp. 232.

Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 269–276.

Imeson, A. P. (2000). Carrageenan. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (pp. 87–102). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.

Matignon, A., Barey, P., Desprairies, M., Mauduit, S., Sieffermann, J. M., & Michon, C. (2014a). Starch/carrageenan mixed systems: Penetration in, adsorption on or exclusion of carrageenan chains by granules? *Food Hydrocolloids*, 35, 597e605.

Matignon, A., Moulin, G., Barey, P., Desprairies, M., Mauduit, S., Sieffermann, J. M., & Michon, C. (2014b). Starch/carrageenan/milk proteins interactions studied using multiple staining and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 99, 345–355.

Mizukami, H., Takeda, Y. & Hizukuri, S. (1999). The Structure of the hot-water soluble components in the starch granules of new japanese rice cultivars. *Carbohydrate Polymers*, 38, 329-332.

Moss G. E., (1976) The microscopy of starch, in *Examination and Analysis of Starch and Starch Products*, Ed by Radley JA, Applied Science Publishers, Londres, pp 1-32

Multon, J.L. (2000). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias 2ª edición*. Zaragoza: Acribia, S.A

Núñez-Santiago, M., C., (2007) *Reología y ultraestructura de pastas y geles de mezclas de κ -carragenina y almidón de maíz ceroso reticulado*. (Tesis doctoral). UNAM, México.

Núñez-Santiago, M., C., & Tecante, A., (2007). Viscoelastic properties of cross-linked waxy cornstarch and κ -carrageenan mixtures under a wide range of potassium counterion concentrations. *J. Cent. South Univ. Technol.*

O'Shea, M. G., Samuel, M. S., Konik, C. M., & Morell, M. K. (1998). Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydrate Research*, 307(1-2), 1–12.

Prajapati, D. V., Maheriya, P. M., Jani, G. K. & Solanky, H. K. (2014). Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 105, No. 1, pp. 97-112

Rochas, C. (1982). *Etude de la transition sol-gel du kappa-carraghenane*. Tesis doctoral en Ciencias Físicas. Université Scientifique et Médicale et Institut National Polytechnique du Grenoble. Francia.

Rojas, O., Briseño, M. (2012). *Fundamentos de Reología*. Venezuela: FIRP

San José State University, (2012). *Introduction to Tetrahymena Nutrition, Fluorescence Microscopy, Flow Cytometry, and Experimental Microbiology*. [Figura] Recuperado de <http://www.biology.sjsu.edu/specialprogs/flocyto/html/fc-p01.html>

Shogren, R. L., (2003) Rapid preparation of starch esters by high temperature/pressure reaction., *Carbohydrate Polymers*, Vol. 52, No. 3, pp. 319-326.

Snoeren, T.H.M (1976) κ -Carrageenan. A study on its physico-chemical properties, sol-gel transition and interaction with milk proteins. Tesis doctoral. Wageningen, Holanda.

Solís-Bravo, I.M. (2007). Estudio comparativo de las propiedades finales de extractos de carragenina κ -I/ κ -II utilizando distintas algas productoras de κ -II. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fas687e/doc/fas687e.pdf>. Consultada 03/06/2019.

Stanley, N. (1987). Production and utilization of products from commercial seaweeds. In D. J. McHugh (Ed.), *FAO. Documento técnico de pesca* (Vol. 288) (pp. 116–146). Rome: FAO.

Takeda, Y., Shibahara, S. & Hanashiro, I. (2003). Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. *Carbohydrate Research* 338, 471-475.

Tecante, A., & Doublier, J. L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch- κ -carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers*, 40, 221–231.

Thomas, D.J. & Atwell, W.A. (1999). *Starches practical guides for food industry*. St. Paul. M, N. Eagan press Handbook Series AACC, pp.19-22.

Tran Nu Thanh Viet Bui. (2019) Structure, Rheological Properties and Connectivity of Gels Formed by Carrageenan Extracted from Different Red Algae Species. *Organic chemistry. (Doctoral Thesis) Université du Maine, France*.

van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M.W., van der Linden, E. & Trom, H. (2003). Visualisation of biopolymer mixtures using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and covalent labelling techniques. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 31, 159-168.

Whistler, RL & BeMiller, J.N. (1997) *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. St Paul. MN Egan Press. pp. 65.