

Análisis estructural del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta* C.) empleando técnicas morfométricas, químicas, térmicas y reológicas

Structural analysis of the cassava native starch (*Manihot esculenta* C.) using morphometric, chemical, thermal and rheological techniques

L. Sívoli¹, E. Pérez² y P. Rodríguez³

¹Centro de Bioquímica Nutricional, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ³Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Resumen

En este trabajo se caracterizó, el tamaño, forma, contenido de amilosa y las propiedades reológicas del almidón de yuca (*Manihot esculenta* C.) comercial proveniente del Brasil, empleando microscopía óptica y electrónica (SEM), difracción láser, calorimetría de barrido diferencial, viscoamilógrafo Brabender y viscosímetro Brookfield. Los resultados morfométricos muestran una población granular bimodal; con una parte de la población formada de gránulos con tamaños de 0,5 a 7,5 μm , y otra con gránulos mas grandes (7,6 μm hasta 35,6 μm) con formas ovaladas y ovaladas-truncadas, respectivamente, características en este tipo de almidón. Ambas poblaciones presentaron Cruz de Malta y los gránulos con formas truncadas presentaron superficies suaves y ciertas depresiones. Es remarcable en algunos de estos gránulos, la presencia de aristas definidas. Los resultados reológicos indican el comportamiento de un fluido pseudoplástico no-Newtoniano. El perfil de gelatinización indica que este almidón tiene un relativo alto asentamiento (181UB), con temperatura inicial de gelatinización de 64,9°C.

Palabras clave: almidón de yuca, estructura granular, propiedades reológicas, microestructura.

Abstract

In this work was characterized the size and shape, amylose content, and rheological properties of (Brazilian commercial) cassava starch by using the optic and electronic microscopes (SEM), laser diffraction, differential scanning calorimetric (DSC), Brabender viscoamylograph and Brookfield viscosimeter. The morphometric data are indicating that the granular population varies in a bimodal form, in two granular sizes; one small and round with sizes from 0.5 to 7.5 μm , and another one with oval-truncated and biggest size, varying from 7.6 to 35.6 μm . In the round and oval-truncated forms which have a delineated Malta cross, several small agglomerations on them are observed. The truncated forms show smooth surface and certain depressions can be appreciated on them. It is also remarkable in some of grains, the presence of defined edges or aristaes. The rheological results are pointing out a behavior of pseudoplastic, non-Newtonian fluid. The gelatinization profile is showing that this starch displays a relatively high setback (181UB) and an initial gelatinization temperature of 64.9°C.

Key words: Cassava starch, cassava, granular structure, rheological properties, microstructure.

Introducción

Aun cuando el almidón procedente de distintas fuentes, exhiben una estructura fundamental similar, ellos difieren en detalles específicos de su micro y ultraestructura. Las diferencias entre los tipos de almidones con respecto a la morfología del gránulo (tamaño, forma, presencia de poros, canales y cavidades), estructura molecular (amilosa y amilopectina) y composición (relación amilosa/amilopectina, contenido de componentes no amiláceos), son las responsables de las variaciones en las propiedades funcionales del mismo (Whistler *et al.*, 1984; Huber y BeMiller, 2000). Estas diferentes propiedades se ven reflejadas en los patrones de difracción de Rayos X, rango de temperatura de gelatinización, propiedades del gel, tendencia a la retrogradación, poder y patrón de hinchamiento de los gránulos.

Introduction

Even when the starch coming from different sources exhibit a similar main structure, they differ in specific details of the micro and ultrastructure. The differences between the types of starch regarding the morphology of the grain (size, shape, presence of pores, canals and cavities), molecular structure (amylase and amylo-pectin) and composition (relation amylase/amylo-pectin, component of non amylase content), are the responsible of the variations in the functional properties of it (Whistler *et al.*, 1984; Huber and BeMiller, 2000). These different properties are reflected in the diffraction patterns of X Rays, temperature rank of gelatinization, properties of the gel, tend to the retrogradation, power and pattern of the grain's swelling, among the most

los, entre las más importantes; y las cuales son indicativas de la divergencia estructural entre almidones de diversos orígenes (Huber y BeMiller, 2000).

Los dos componentes principales del almidón (amilosa y amilopectina), son los responsables de formar la estructura semi cristalina de sus gránulos, la cual consiste de una lámina o membrana cristalina (ordenada, de cadena de glucanos paralelos estrechamente empacada) y una lámina o membrana amorfa (regiones menos ordenadas, donde predominan puntos de ramificación). Los almidones de diferentes orígenes tienen diferentes patrones y grados de cristalinidad (Atichokudomchai *et al.*, 2000).

En la raíz de la yuca el componente más importante de la materia seca es el almidón (Beleia *et al.*, 2006). El almidón de yuca, es muy utilizado en la industria papelería, textilera y alimentaria en los países tropicales (Radley, 1976; Whistler *et al.*, 1984; Nabeshima y Grossmamm, 2001), debido a que en su estado nativo, posee una variedad de propiedades interesantes; por ejemplo, sus gránulos se hinchan rápidamente a bajas temperaturas dando pastas claras, adhesivas y fibrosas (Whistler *et al.*, 1984).

El almidón juega un rol importante en el desarrollo de nuevos productos; en la actualidad, existen numerosas formulaciones desarrolladas, donde el almidón es vital como ingrediente funcional, los cuales satisfacen la demanda; no solo de la industria de alimentos, sino de las industrias de cosméticos, textil, fármacos, papel, entre otras. Las diferencias entre los tipos de almidones con respecto a su

importante; and which are indicators of the structural divergence among starches of different origins (Huber and BeMiller, 2000).

The two main components of starch (amylose and amylo-pectin), are the responsible of forming a semi-clear structure of their grains, which consists on a lamina or clean membrane (ordered, with paralleled glucan-chain widely packed) and a lamina or amorphous membrane (less ordered regions, where predominate the ramification points). Starches with different origins have different patterns and clear degrees (Atichokudomchai *et al.*, 2000).

In the root of cassava, the most important component of the dry matter is the starch (Beleia *et al.*, 2006). Cassava's starch is very used in the paper, textile and food industry in tropical countries (Radley, 1976; Whistler *et al.*, 1984; Nabeshima and Grossmamm, 2001), due to on its native state it has a variety of interesting properties; for example, their granular swell rapidly at low temperatures creating clear, adhesives and fibrous pasting (Whistler *et al.*, 1984).

Starch has an important role in the development of new products; currently, there are different formula developed, where starch is vital as a functional ingredient; which satisfy the demand, not only in the food's industry but also in cosmetics, textile, pharmaceuticals, and paper, among others. The differences among the types of starches regarding the structure (size, shape, presence of porous, canals and cavities) are known, since these support their botanical

estructura (tamaño, forma, presencia de poros, canales y cavidades) son reconocidas; debido a que estas atienden a su origen botánico e inciden en sus propiedades funcionales. Es por ello, que su conocimiento es importante en la aplicación del mismo, para usos específicos y en la tecnología de su modificación. El tamaño y forma granular definen propiedades; como su temperatura, rata de gelatinización, "pasting" y pico de viscosidad, también su capacidad de dispersión en líquidos; específicamente en agua y su capacidad de aspersión como sólido o como líquido. En la industria de cosméticos su tamaño es apreciable; ya que se prefieren los gránulos pequeños. En el procedimiento de modificación es relevante la presencia de poros o canales en el gránulo y su tamaño y forma incidirán en la eficiencia de la misma. La evaluación estructural de almidones de diferentes fuentes botánicas, por lo tanto, predecirá propiedades funcionales específicas y de importancia para su aplicación. Por último, en el campo de la nanotecnología el tamaño del gránulo de almidón y su forma son propiedades muy importantes al momento de decidir cual tipo usar.

La Microscopía (óptica y electrónica) y la difracción con rayos láser juegan un rol importante para el entendimiento de la estructura granular de los almidones (Sívoli *et al.*, 2009). La microscopia, ha sido muy empleada para detectar cambios estructurales causados por los procesos de modificación físicas, químicas y/o enzimáticas, incluyendo el conocimiento de las regiones más sustituidas en los gránulos del almidón (Singh *et al.*, 2007). Estos cambios estructurales también pueden ser relacio-

origin and influence in their functional properties. Thus, its knowledge is important in the application of it for specific uses and in the technology of its modification. The size and granular shape define properties; such as, temperature, gelatinization rate, pasting and viscosity peak, as well as its capacity of dispersion in liquids, specifically in water and its aspersión capacity as solid or liquid. In the cosmetic industry, its size is appreciable, since the small granular are preferred. In the modification process, it is relevant the presence of porous or canals in the granular and their size will influence in the efficiency of it. The structural starches evaluation of different botanical sources, will predict specific functional properties with great importance for their application. Finally, in the nanotechnology, the granular size of the starch and their shapes are very important properties at the moment of deciding the type to be used.

The microscopy (optical and electric) and the diffractometry with laser rays have an important role for understanding the granular structure of starches (Sívoli *et al.*, 2009). The microscopy has been employed to detect structural changes caused by the physical, chemical and/or enzymatic modification processes, including the knowledge of the most substituted regions in the starch's granular (Singh *et al.*, 2007). These structural changes can also be related to rheological properties to distinguish its functional role.

Because of the latter, the objectives of this research is the employment of microscopy, chemical,

nados a las propiedades reológicas para discernir su carácter funcional.

Por lo antes expuesto, se plantean como objetivos en el siguiente estudio, el empleo de técnicas microscópicas, químicas, térmicas y reológicas para evaluar la estructura del almidón nativo de yuca y relacionarlas con sus propiedades funcionales.

Materiales y métodos

Materiales

Almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta* C.) proveniente del Brasil, suministrado por Industrias del Maíz (INDELMA) Cagua, estado Aragua, Venezuela.

Métodos

Microscopía óptica

Microscopía de luz y campo oscuro con y sin tinción con iodo

Para la observación de la estructura granular se utilizaron dos campos: un campo oscuro y un campo con luz intensa. Adicionalmente, las muestras observadas en el campo con luz intensa, también se observaron después de su tinción con iodo. Cuando se empleó campo oscuro y luz intensa sin iodo, una pequeña porción de almidón fue esparcida en centro de la lámina porta objeto y se le añadieron 2 a 3 gotas de agua destilada y con la ayuda de una lámina cubre objeto se esparció la mezcla almidón agua hasta que adquirió el tamaño adecuado para ser cubierta la lámina cubre-objeto, cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aires, se le colocó la lámina cubre-objeto. (Blaszczak *et al.*, 2003; Koroteeva *et al.*, 2007). Cuando se empleó luz intensa y tinción con iodo, en vez de colocar agua destilada a la pequeña porción de almidón es-

thermal and rheological techniques to evaluate the structure of the native starch of cassava and relate them to their functional properties.

Materials and methods

Materials

Starch native from cassava (*Manihot esculenta* C.) coming from Brazil, supplied by the Corn Industry (INDELMA) Cagua, Aragua state, Venezuela.

Methods

Optical microscopy

Light microscopy and dark scope with or without iodine tinting

For observing the granular structure two scopes were used: a dark scope and a scope with intense light. Additionally, the samples were observed in the scope with intense light, and were also observed after being tinted with iodine. When a dark scope and intense light without iodine was employed, a small portion of starch was put in the center of the slide and 2 to 3 drops of distilled water were added, and using a top slides the starch-water mix was spread until it acquired the adequate size to carefully cover the top-slide, carefully and avoiding the formation of air bubbles the top-slide was put (Blaszczak *et al.*, 2003; Koroteeva *et al.*, 2007). When intense light and iodine tinting was applied instead of adding distilled water to the small portion of the spread starch in the center of the slides, 2 to 4 drops of Lugol solution were added and kept in stand by for 5 minutes, using a top-slide was done the preparation of the starch-iodine solution the same way described

parcida en el centro de la lamina portaobjeto se le añadieron 2 a 3 gotas de solución de Lugol y se mantuvo en reposo por 5 minutos, con ayuda del cubre objeto se realizó la preparación de la solución de almidón-iodo de la misma manera como se describió anteriormente. Una vez preparadas, las laminas fueron observadas y fotografiadas usando magnificaciones de 40X y 100X, con un microscopio Nikon Optiphot con una cámara adaptada Nikon FX-35DX. Para el caso de campo oscuro, una vez obtenido un campo nítido, se observó la muestra usando el condensador especial para campo oscuro que ilumina la muestra con luz fuerte indirecta. En este caso, el campo visual se muestra como un fondo oscuro sobre el cual aparecen pequeñas partículas brillantes de la muestra que reflejan parte de la luz hacia el objetivo.

Microscopía de Luz Polarizada (MLP)

Para evaluar la forma de los gránulos y la cruz de malta, se empleó un microscopio óptico estándar Nikon Optihot 2 con dispositivo fotográfico incorporado marca Nikon FX – 35D y filtro de luz polarizada, según metodología descrita por Pérez *et al.*, (2005). Para ello una pequeña cantidad de almidón fue esparcido en el portaobjeto, al cual se le añadieron 1-2 gotas de agua destilada como vehículo dispersante; sobre éste, se colocó el cubre objeto y se mantuvo en reposo por dos minutos; posteriormente se observaron los mejores campos.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La forma granular, tamaño y distribución de los gránulos fueron estudiadas empleando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La muestra de almidón, fue suspendida en una

previously. Once prepared, the slides were observed and photographed using magnifications of 40X and 100X, with a microscope Nikon Optiphot with an adapted camera Nikon FX-35DX. For the case of the dark scope, once obtained a clear scope, the sample was used using the special condenser for dark scopes that illuminates the sample with strong indirect light. In this case, the visual scope is shown as a dark scope on which appears small brilliant particles of the sample that reflect part of the light towards the objective.

Microscopy of Polarized light (MLP)

To evaluate the granular shape and the malt's cross; a standard optical microscope was employed Nikon Optihot 2, with incorporated photographic device Nikon FX – 35D brand and filter of polarized light, according to the methodology described by Pérez *et al.*, (2005). For this, a small quantity of starch was spread in the slide, and 1-2 drops of distilled water were added as a spreader vehicle, on it, was put the top-slide and kept in stand by for two minutes, later, the best scopes were observed.

Electronic microscopy scanning (MEB)

The granular shape, size and distribution of grains were studied employing electronic microscopy scanning (MEB). The starch sample was immersed in an ethanol solution at 40% v/v and totally spread in an ultrasound for 2 minutes approximately, with the aim of avoiding agglomerations. Later, 2 drops of the sample were added in an identified slide. The prepared sampled were covered with an alloy of

solución de etanol al 40% v/v y dispersada en su totalidad en un baño ultrasónico, alrededor de 2 minutos con la finalidad de evitar aglomeraciones. Luego se colocaron 2 gotas de la muestra en un porta muestra identificado. Las muestras preparadas fueron cubiertas con una aleación de platino/paladium por ocho min en un cubridor iónico Hitachi E 102 Ion Sputter. Luego se examinaron a 20,0 kV, y se fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S 2400. El diámetro promedio de los gránulos de almidón fue estimado midiendo al azar 20-30 gránulos para microfotografías por triplicado (Sívoli *et al.*, 2005).

Determinación del contenido de Amilosa

El contenido de amilosa fue determinado empleando el método colorimétrico que se fundamenta en medir la formación del cromógeno entre la amilosa y solución de yodo y el método calorimétrico el cual se basa en medir el cambio de entalpia por efecto del acomplejamiento de la amilosa con una solución de lisofosfatidilcolina (Mestres *et al.*, 1996).

Determinación de la Distribución del tamaño de la partícula por Difracción Láser

El tamaño de los gránulos y su distribución fueron medidos con Difracción Láser (DL) (Blaszczak *et al.*, 2003; Merca y Juliano, 1981). Este equipo permite obtener resultados en un amplio rango de tamaños (0,02 -2000 μm). Este análisis provee información del área superficial específica, diámetro del volumen proyectado (μm) y diámetro promedio de la superficie proyectada (μm). Para llevar a cabo el análisis, 100 mg de muestra fueron suspen-

platinum/palladium for eight minutes in an ionic cover Hitachi E 102 Sputter. Later, were examined at 20.0 kV and photographed in an electronic scanning microscope Hitachi S 2400. The average diameter of the starch granular was estimated measuring at random 20-30 grains for triple microphotography (Sívoli *et al.*, 2005).

Determination of the amylose content

The amylose content was determined employing the colorimetric method based on measuring the formation of the chromogen between the amylase and the iodine solution and the calorimetric method, which is based on measuring the enthalpy change by effect of amylase complexation with a lysophosphatidylcholine solution (Mestres *et al.*, 1996).

Distribution determination of the particle size by Laser Diffraction

The granular size and their distribution were measured by Laser Diffraction (DL) (Blaszczak *et al.*, 2003; Merca and Juliano, 1981). This equipment allows obtaining results in a wide rank of sizes (0.02–2000 μm). This analysis provides information of the specific superficial area, diameter of the projected volume (μm) and average diameter of the projected surface (μm). To perform the analysis, 100 mg of the sample were immersed in 100 mL of distilled water and totally scattered in an ultrasound. The scattered samples were transferred to a sample slide and evaluated in a Laser Diffractometer Malvern Mastersizer 200, following the instructions of the Mastersizer 2000 Software overview.

didadas en 100 mL de agua destilada y dispersada totalmente en un baño de ultrasonido. Las muestras dispersadas fueron transferidas a un porta muestra y evaluadas en el Difractómetro Láser Malvern Mastersizer 2000 siguiendo las instrucciones del Mastersizer 2000 Software overview.

Propiedades reológicas

Análisis en el viscoamiloógrafo Brabender

Las propiedades de la pasta del almidón, fueron determinadas con el viscoamiloógrafo Brabender (7% de concentración) con OHG Duisburg, tipo 800221 No. 930138 empleando en método descrito en la AACC (2003). Los parámetros evaluados fueron temperatura inicial de gelatinización (A), viscosidad máxima (B), viscosidad a 90°C, viscosidad (90°C por 15 minutos) (E), viscosidad a 50°C (F). Los índices de breakdown (B-E), setback (F-B) y la consistencia (F-E), fueron evaluados. Los valores obtenidos fueron expresados en Unidades Brabender (UB), siguiendo los parámetros descritos por Mazur *et al.*, (1957) y Merca y Juliano (1981).

Por otra parte, se evaluó la viscosidad aparente de una suspensión de almidón nativo al 3% a 50°C y 30°C, empleando un viscosímetro Brookfield synchrolectic (Modelo LVT, serial 34154, Brookfield Laboratories Inc., Stoughton, MA, USA). Para llevar a cabo el ensayo, se usó la aguja N° 3 a velocidades de 6, 12, 30 y 60 rpm. Los resultados fueron expresados en *centipoises* (Smith, 1967).

Resultados y discusión

La figura 1 representa dos microfotografías del almidón de yuca

Rheological properties Analysis in the Brabender viscoamylograph

The properties of the starch pasting were determined with a Brabender viscoamylograph (7% of concentration) with OHC Duisburg, type 800221 No. 930138, employing the method described in AACC (2003). The evaluated parameters were initial temperature of the gelatinization (A), maximum viscosity (B), viscosity at 90°C, viscosity (90°C, 15 min) (E), viscosity at 50°C (F), the breakdown (B-E), setback (F-B) and consistency (F-E) indexes were evaluated. The obtained values were expressed in Brabender units (UB), following the parameters described by Mazur *et al.*, (1957) and Merca and Juliano (1981).

On the other hand, the apparent viscosity was evaluated of a native starch suspension at 3% at 50°C and 30°C, employing a viscosimeter Brookfield synchrolectic (LVT model, serial 34154, needle N° 3 at velocities of 6, 12, 30 and 60 rpm). The results were expressed in centipoises (Smith, 1967).

Results and discussion

Figure 1 represents two microphotographies of native cassava starch, observed by optical microscopy (a) with and (b) without tinting at magnifications of 40X and 100X, respectively. On these are observed well defined and abundant granular structure with oval, oval-truncated shapes which are characteristics of cassava starches. Are also observed, in less proportion, small rounded granular. The observation at lower

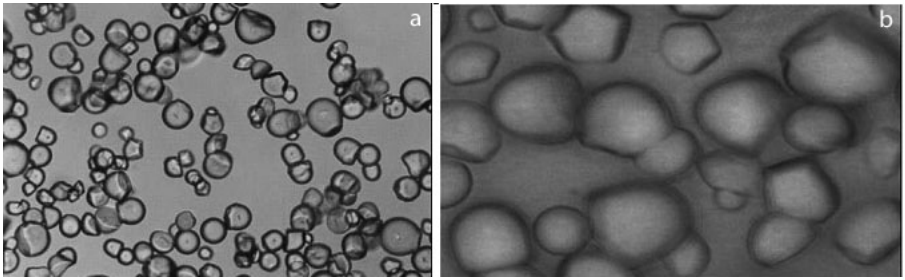


Figura 1. Microfotografía de almidón nativo de yuca, Microscopía Óptica (a) con (40X) y (b) sin (100 X) tinción con yodo.

Figure 1. Microphotography of native starch of cassava, Optical Microscope (a) with (40X) and (b) without (100 X) iodine tinting.

nativo, observados por microscopía óptica (a) con y (b) sin tinción con yodo a magnificaciones de 40X y 100X, respectivamente. En ellas se observa bien definida y abundantemente la estructura granular de formas ovaladas y ovaladas-truncadas característica de los almidones de yuca. También se observan, en menor proporción, pequeños gránulos redondos. La observación a menor magnificación (40X) correspondiente a la observación con tinción con yodo, da una visualización de la característica bimodal de la población granular. La birrefringencia natural de los gránulos que además del grado de cristalinidad y su orientación dentro la estructura molecular, indica si este ha sido modificado o no, puede ser inferido con la observación microscópica bajo luz polarizada.

En la microfotografía que fue obtenida en MLP, se observó una cruz de malta bien definida, indicando la naturaleza nativa de los gránulos; así como sus formas ovaladas-truncadas con un *hilum* céntrico, los marcados bordes de los gránulos y pequeñas aglo-

magnification (40X) correspondent to the observation with iodine tinting, visualizes the bimodal characteristics of the granular population. The natural birefringence of the grains that besides the crystallinity degree and its orientation in the molecular structure, indicates if this has been modified or not, it can be inferred with the microscopy observation under polarized light.

In the microphotography that was obtained in MLP, was observed well defined malt cross, indicating the native nature of the grains, as well as their oval-truncated shapes with a hilum center, the border markers of the grains and small agglomerations and the small rounded grains (figure 2).

The microphotographies of cassava starch taken with an electronic scanning microscope (figure 3), confirm the oval and oval-truncated shapes of starch. These grains show some deformity and average size of 12.61 μm ; these agreed to the ones observed with the optical

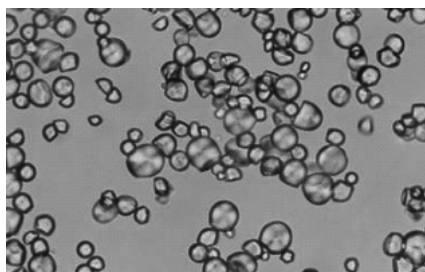


Figura 2. Microfotografía de almidón nativo de yuca, Microscopía Óptica con luz polarizada (40X).

Figure 2. Microphotography of native starch of cassava, Optical Microscope with polarized light (40X).

meraciones y los pequeños gránulos redondos (figura 2).

Las microfotografías del almidón de yuca, tomadas con el microscopio electrónico de barrido (figura 3), confirman las formas ovaladas y ovaladas-truncadas del almidón. Estos gránulos muestran algunas deformidades y tamaño promedio de 12,6 μm ; estas fueron acordes a las observadas con el microscopio óptico (figura 1) y por la reportada en la literatura (Ellis *et al.*, 1998; Ceballos *et al.*, 2007; Tester *et al.*, 2006).

microscope (figure 1) and by the reported in the literature (Ellis *et al.*, 1998; Ceballos *et al.*, 2007; Tester *et al.*, 2006).

On the other hand, values of sizes from 5-35 μm and, 6-17 μm , (Pérez *et al.*, 2005; Sívoli *et al.*, 2005), have been reported respectively and 21.4 -23.2 μm with biconvex spherical shape and spherical and with bimodal distribution (Sívoli *et al.*, 2005). The surface of the grains was observed soft and without pores. This indicates that it is a pure starch, without apparent damage,

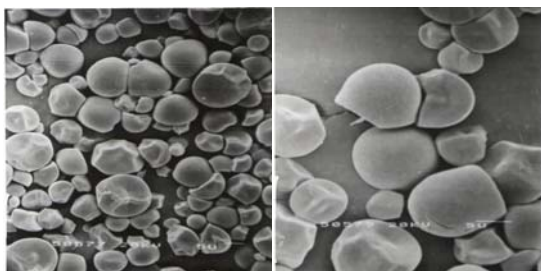


Figura 3. Microfotografía de almidón nativo de yuca, vistas con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (20Kv).

Figure 3. Microphotography of native starch of cassava seen from the Electric Scanning Microscope (MEB) (20Kv).

Por otra parte, se han reportado valores de tamaño entre 5-35 μm y 6-17 μm (Pérez *et al.*, 2005; Sívoli *et al.*, 2005), respectivamente y 21,4 -23,2 μm de forma esférica biconvexa y esféricas y con distribución bimodal (Sívoli *et al.*, 2005). La superficie de los gránulos se observó suave y sin presencia de poros. Esto indica que es un almidón muy puro, sin daño aparente, demostrando que se trata de un almidón nativo (presencia de Cruz de Malta) de excelente calidad que mostrará propiedades funcionales características del almidón de yuca. En general todas las microfotografías muestran gránulos libres de material contaminante, lo cual indicó que el proceso de extracción fue eficiente y las características del material y su naturaleza no fueron afectadas. Lo antes mencionado se puede corroborar en la microfotografía tomada a 4kv (figura 4), donde se confirma una textura suave y superficie limpia, en la cual claramente se distingue la presencia de círculos concéntricos y algunas grietas en la zona truncada (ver flechas).

showing that it is a native starch (presence of malt cross) of excellent quality which will show functional properties characteristic of the cassava starch. Generally, all the microphotographies show grains free from polluted material, which indicated that the extracting process was efficient and the characteristics of the material and its nature were not affected. The latter can be corroborated in the microphotography taken at 4kv (figure 4), where is confirmed a soft texture and clean surface, where is clearly distinguished the presence of concentric circles and some cracks in the truncated area (see lines)

Laser Diffraction (figure 5), the size distribution was the following: from 0 to 10% of the population had sized from 0–6.62 μm ; 40% corresponds to sizes from 6.62 to 12.7 μm ; 40% from 12.7 to 19.4 μm , and at least 10% from 19.4 to 35.6 μm ; being the last value the highest reported. In general, the granular population varies bimodally. This bimodal curve is formed by two different sizes of

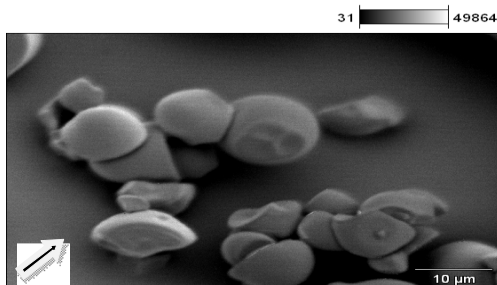


Figura 4. Microfotografía del almidón nativo de yuca, vistas con Microscopía Electrónica de Barrido MEB (4Kv).

Figure 4. Microphotography of native starch of cassava seen with Electric Scanning Microscope MEB (4Kv).

En el análisis de Difracción Láser (figura 5), la distribución de tamaño fue de la siguiente manera: entre un 0 a 10% de la población presentó tamaños entre 0 – 6,62 μm ; 40% corresponden a tamaños entre 6,62 y 12,7 μm ; 40% entre 12,7 y 19,4 μm , y al menos un 10% entre 19,4 y 35,6 μm ; siendo este último el valor mas elevado reportado. En general, la población granular varía en forma bimodal. Esta curva bimodal está formada por dos diferentes tamaños de gránulos, unos desde 0,5 a 7,5 μm y otros desde 7,6 a 35,6 μm . Se ha postulado que el tamaño de los gránulos y su distribución influyen en el desarrollo del perfil de viscosidad del almidón (Puncha-arnon *et al.*, 2008), existiendo un efecto aditivo en relación al tamaño granular, es decir a mayor tamaño los gránulos colapsaran en menor tiempo que los pequeños, lo que hace que la viscosidad se mantenga en constante ascenso durante el desarrollo de la pasta en un almidón con diferentes tamaños granulares y el “breakdown” y la con-

grains, ones from 0.5 to 7.5 μm and others from 7.6 to 35.6 μm . It has been said that the sizes of the grains and their distribution influence in the profile development of the starch's viscosity (Puncha-arnon *et al.*, 2008), existing an additive effect in relation to the granular size, that is, at lower size the grains will collapse in less time that the high, what makes that the viscosity keeps in constant increment during the development of the paste in a starch with different granular sizes and the breakdown and consistency be more steady. It has also been reported an inverse relation between the granular size and the in vitro digestion rate of the starch (Dhital *et al.*, 2010).

The amylose content has a significant effect on the functional properties of the starch; therefore, its quantification before the processing of food is important. Starches waxy type, that is, with low content of amylase, have functional properties different to amylo-types. For example, a waxy

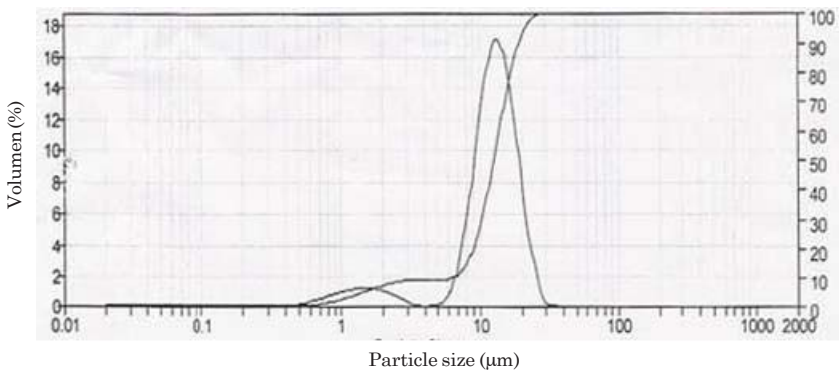


Figura 5. Distribución del tamaño de la particular del almidón nativo de yuca.

Figure 5. Distribution of the particular size of native starch of cassava.

sistencia sean más estables. También se ha reportado una relación inversa entre el tamaño granular y la rata de digestión *in vitro* del almidón (Dhital *et al.*, 2010).

El contenido de amilosa tiene un efecto significativo sobre las propiedades funcionales del almidón; así que es importante su cuantificación antes del procesamiento de los alimentos. Almidones tipo *waxy* es decir con bajo contenido de amilosa, presentan propiedades funcionales diferentes a los amilotipos. Por ejemplo, un almidón tipo *waxy* retrograda menos que su contraparte alta en amilosa, por lo que son más estables a la congelación-descongelación. Los almidones *waxy* de raíces y tubérculos (papa, batata y yuca) presentan mayor claridad de la pasta, menor solubilidad y mayor poder de hinchamiento, que los almidones de contenido intermedio y alto de amilosa (Pérez *et al.*, 2011). Por otro lado los resultados de las investigaciones de Lu *et al.*, 2008 sobre almidones de arroz y maíz *waxy* indican que las características granulares y su interacción con la amilosa desempeña un papel importante durante la gelatinización del almidón.

Por otra parte, la literatura menciona un punto de controversia en la determinación y cuantificación, del contenido de amilosa y el procedimiento empleado para esto, mencionando que cada método empleado en la determinación tiene sus beneficios y limitaciones. El método mas usado es el colorimétrico; sin embargo, los resultados no son muy consistentes, debido posiblemente a las diferencias en la longitud de la cadena de amilosa, factor que puede interferir con la forma-

starch retrogrades less that its counterpart high in amylase, thus, are steadier to the frosting-defrosting. Waxy starches of roots and tubers (potato, sweet potato, cassava) have greater clarity of the paste, less solubility and higher swelling power than starches with intermediate content and high in amylase (Pérez *et al.*, 2011). On the other hand, the results of the research carried out by Lu *et al.*, 2008, about rice and waxy corn starches indicate that the granular characteristics and their interaction to amylose have an important role during the gelatinization period of the starch. On the other hand, the literature mentions a controversial point in the determination and quantification of the amylose content and the procedure employed for it, mentioning that each method employed in the determination have their own benefits and limitations. The most used method is the colorimetric; however, the results are not too consistent, maybe due to the differences in the longitude of the amylose chain, factor that might interfere to the formation of a chromogen complex (Mestre *et al.*, 1996, Pérez, 2000, Himmelsbach *et al.*, 2001, Zhu *et al.*, 2008; among others). Another method employed is measuring the enthalpy variation obtained by a specific complex between the amylose and a lipid substance (lysophosphatidylcholine) using a differential scanning calorimetric (DSC), (Mestres *et al.*, 1996). The amylose content found on this research employing a colorimetric method was $24.56 \pm 3.90\%$ (table 1) (complexation with iodine) and $17.11 \pm 1.07\%$ when

ción de un complejo cromógeno (Mestre *et al.*, 1996, Pérez, 2000, Himmelsbach *et al.*, 2001, Zhu *et al.*, 2008; entre otros). Otro método empleado es midiendo la variación de entalpía obtenida por un complejo específico entre la amilosa y una sustancia lipídica (lisofosfatidilcolina) usando el calorímetro de barrido diferencial (DSC), (Mestres *et al.*, 1996). El contenido de amilosa encontrado en este estudio empleando en método colorimétrico fue de $24,56 \pm 3,90\%$ (cuadro 1) (acomplejamiento con yodo) y de $17,11 \pm 1,07\%$ cuando se empleó la determinación por DSC (figura 6, cuadro 1). Se ha reportado en la literatura (Paes *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 1996; Kasemsuwan *et al.*, 1998; Defloor *et al.*, 1998; Thitipraphunkul *et al.*, 2003; Moorthy, 2002; Moorthy *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2008) in varieties of cassava starch, a rank in the amylose content which varies from 16.0 to 9.3; mentioning the authors that these reported values depend on the methodology employed for their determination. Marques *et al.*, (2006) using DSC and following the methodology described by Mestres (1996) reported values of 16% in cassava starch coming from Brazil, which is similar to the found in this research. On the other hand, clones

employed the determination by DSC (figure 6, table 1).

It has been reported in the literature (Paes *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 1996; Kasemsuwan *et al.*, 1998; Defloor *et al.*, 1998; Thitipraphunkul *et al.*, 2003; Moorthy, 2002; Moorthy *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2008) in varieties of cassava starch, a rank in the amylose content which varies from 16.0 to 9.3; mentioning the authors that these reported values depend on the methodology employed for their determination. Marques *et al.*, (2006) using DSC and following the methodology described by Mestres (1996) reported values of 16% in cassava starch coming from Brazil, which is similar to the found in this research. On the other hand, clones

Cuadro 1. Perfil Amilográfico y contenido de amilosa del almidón nativo de yuca.

Table 1. Amilo-graphic profile and amylose content of native starch of cassava.

| Parámetros | |
|--|---------------|
| Temperatura inicial de gelatinización (A) | 64,9 ± 0,0 °C |
| Temperatura Pasta | 64,9-79,5 °C |
| Máxima Viscosidad (B) | 633 ± 0,0 UB |
| Viscosidad a 90°C (C) | 524 ± 0,0UB |
| Viscosidad (30 minutos at 90 °C) (E) | 318 ± 0,0 |
| Viscosidad a 50°C (F) | 499 ± 0,0 |
| Viscosidad enfriamiento (30 minutos at 50°C) | >500 UB |
| Breakdown (B-E) | 315 ± 0,0 |
| Consistencia (F-B) | - 134 ± 0,0 |
| Set back (F-E) | 181 ± 0,0 |
| Contenido de Amilosa (Colorimetría) (%) | 24,56 ± 3,90 |
| Contenido de Amilosa (DSC-Calorimetría) (%) | 17,11 ± 1,07 |

Resultados promedios de tres replicas.

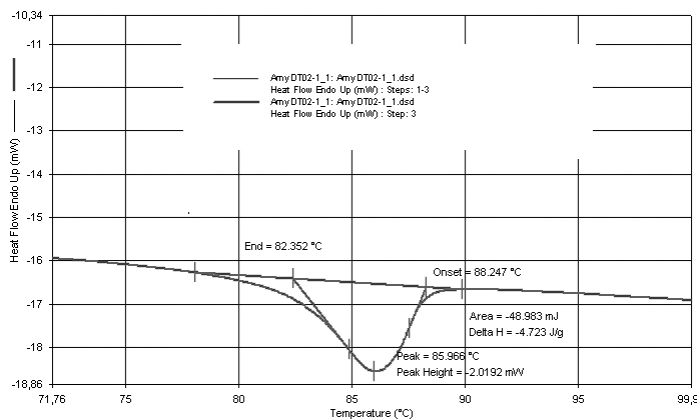


Figura 6. Determinación de amilosa por Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

Figure 6. Amylose determination by Differential Scanning Calorimetric (DSC).

et al., 2008; Marques *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2008) en variedades de almidón de yuca, un rango en el contenido de amilosa que varía desde 9,3 hasta 16,0%; señalando los autores que estos valores reportados son dependientes de la metodología empleada para su determinación. Marques *et al.*, (2006) utilizando el DSC y siguiendo la metodología descrita por Mestres, (1996), reporta valores de 16% en almidones de yuca provenientes de Brasil, lo cual es similar a lo encontrado en este estudio. Por otro lado, recientemente han sido reportados clones con altos contenidos en amilosa y clones libres de amilosa por Ceballos *et al.*, 2007 y Ceballos *et al.*, 2008, respectivamente. Aquellos clones libres en amilosa mostraron ausencia de la enzima GBSS en sus raíces, y aquellas con alto valor de amilosa, fueron obtenidas por mutación inducida.

Los resultados de viscosidad (figura 7), determinaron el comporta-

have been recently reported by Ceballos *et al.*, 2007 and Ceballos *et al.*, 2008, with high contents of amylose and clones free from amylose, respectively. Those clones free from amylose showed absence of the enzyme CBSS in their roots, and those with high content of amylose, were obtained by induced mutation.

The viscosity results (figure 7) determined the behavior of starch as a pseudo-plastic non-Newtonian fluid, observing that the viscosity reduces when the cut's strength increased (Sívoli *et al.*, 2005). In addition, a great development in the viscosity was observed when the measures were done at 30°C, with the formation of a rigid gel during the cooling process, which indicates a high tendency to the retrogradation; similar results are shown in the literature for cassava starch (Sívoli *et al.*, 2005).

Figure 8 and table 1 shows the amylo-graphic profile of cassava

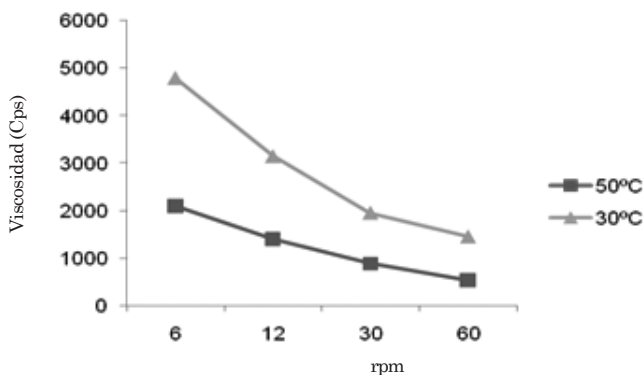


Figura 7. Viscosidad aparente del almidón nativo de yuca a 30 y 50°C.

Figure 7. Apparent viscosity of native starch of cassava at 30 and 50°C.

miento del almidón como un fluido pseudoplástico no-Newtoniano, observándose que la viscosidad disminuyó cuando se incrementó la fuerza de corte (Sívoli *et al.*, 2005). En adición, un gran desarrollo en la viscosidad fue observado cuando se realizaron las mediciones a 30°C, con la formación de un gel rígido durante el enfriamiento, lo que indica una alta tendencia a la retrogradación; resultados similares son mostrados en la literatura para el almidón de yuca (Sívoli *et al.*, 2005).

La figura 8 y cuadro 1 muestra el perfil amilográfico del almidón de yuca. Como resultado de la fuerza de conexión intermolecular, se observó una elevada fragilidad (“breakdown”) del gránulo (315 UB), esta drástica caída de la viscosidad después de alcanzar el pico máximo de viscosidad, durante el tiempo de calentamiento sostenido (90°C), se corresponde con lo previamente discutido, es decir la influencia del tamaño y distribución granular en relación al desarrollo de viscosidad. En este estudio, se observó por microscopía y difracción laser, que

starch. As a result of the intermolecular connection strength, was observed a high fragility (breakdown) of the grain (315 UB), this dramatic fall of the viscosity after had reached the maximum peak of viscosity during the sustain heating time (90°C) corresponds to the previously discussed, that is, the influence on the size and granular distribution in relation to the viscosity development. In this research, was observed on the microscope and laser diffraction, that in spite of being bimodal populations, the highest proportion of grains are of bigger size (average of 12.6 μm). This higher content of big grains in relation to the general population would somehow explain the viscosity fall after had reaching the maximum peak, according to the reported by Puncha-arnon *et al.*, 2008), since there is not an additive and sustainable development of viscosity after that point by the little fraction of small grains. In the analysis was detected an initial gelatinization

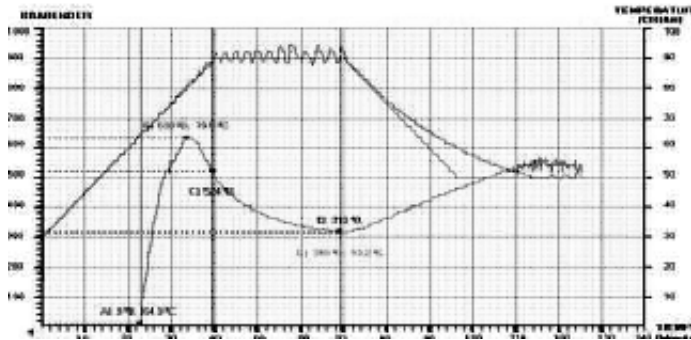


Figura 8. Perfil Amilográfico del almidón nativo de yuca.

Figure 8. Amylo-graphic profile of native cassava starch.

a pesar de ser una población bimodal, la mayor proporción de gránulos son de mayor tamaño (12,6 μm en promedio). Este mayor contenido de gránulos grandes en relación a la población general, explicaría en cierta medida la caída de viscosidad después de alcanzar el pico máximo, según lo reportado por (Puncha-arnon *et al.*, 2008), ya que no hay un aditivo y sostenido desarrollo de viscosidad después de este punto por la poca fracción de gránulos pequeños. En el análisis se detectó una temperatura inicial de gelatinización de 64,9°C, alcanzando la máxima viscosidad a 79,5°C, con un valor de viscosidad de 633 UB, la cual disminuyó hasta 318 UB al final del periodo de calentamiento sostenido a 90°C.

Similares resultados son reportados para diferentes variedades de almidones de yuca (Ceballos *et al.*, 2007, Ceballos, 2008; Fernández *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1998; Nwokocha *et al.*, 2009). Algunos autores reportaron curvas amilográficas similares (González y Pérez, 2003; Nwokocha *et al.*, 2009), señalando que el proceso de gelatinización en sistemas con exceso

temperature of 64,9°C, reaching the maximum viscosity at 79,5°C, with a viscosity value of 633 UB, which reduced until 318 UB at the end of the heating sustainable period at 90°C.

Similar results were reported for different varieties of cassava starches Ceballos *et al.*, 2007, Ceballos, 2008; Fernández *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1998; Nwokocha *et al.*, 2009). Some authors reported similar amylo-graphic curves (González and Pérez, 2003; Nwokocha *et al.*, 2009), mentioning that the gelatinization process in systems with excess of water, involve events of molecular disorganization with water entrance in the structure of starch. The authors also indicate that when producing the thermal dissociation of crystals formed by the double helixes of amylo-pectin chains, also increase the granular swelling. At the end of this event, in some cases; for instance in cassava starch, this dissociation is the catalyst that allows a fast granular swelling, as observed in the viscosity development (figure 8).

de agua, involucra eventos de desorganización molecular con entrada de agua en la estructura del almidón. Los autores también indican que al producirse la disociación térmica de los cristalitas que están formados por las doble hélices de las cadenas de amilopectina, se aumenta el hinchamiento granular. Al final del evento, en algunos casos; por ejemplo en el almidón de yuca, esta disociación es el catalizador que permite un rápido hinchamiento granular; como fue observado en el desarrollo de viscosidad (figura 8).

Conclusiones

Con las técnicas empleadas, son bien determinadas las características de tamaño y morfología de los gránulos de almidón de yuca. Cada una de estas es considerada como criterio al momento de definir el uso de un tipo de almidón. El ensayo de Difracción Láser da información acerca de la talla de los gránulos y el posible comportamiento del almidón en un sistema nutricional. Esta técnica demuestra la variación en el tamaño de los gránulos y su distribución bimodal. En adición, los resultados del estudio indican, que el almidón nativo es un fluido pseudoplástico no-Newtoniano, que incrementa la firmeza del gel con el enfriamiento. El almidón mostró una leve tendencia a retrogradar y baja consistencia. Todos estos parámetros están fuertemente relacionados con la estructura granular.

Conclusions

With the employed techniques, the characteristics of size and grains morphology of cassava starch are well determined. Each of these are considered as criteria at the moment of defining the use of a starch type. The Laser Diffraction essay informs about the size of the grains and the possible behavior of the starch in a nutritional system. This technique shows the variation in the size of the grains and their bimodal distribution. Additionally, the results of this research indicate that the native starch is a pseudo-plastic non-Newtonian fluid, which increases the firmness of the gel with cooling. The starch showed a tendency to retrograde and low consistency. All these parameters are strongly related to the granular structure.

Acknowledgement

The authors acknowledge CDCH-UCV by the financing given to the Project N° PI-11-00-5913-2005.

End of english version

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento recibido para este proyecto N° PI-11-00-5913-2005.

Literatura citada

- Atichokudomchai, N., S. Shobsngob y S. Varavinit. 2000. Morphological Properties of Acid-modified Tapioca Starch. *Starch/Stärke*. 52:283-289.
- Beleia, A., S. Butarelo y R. Silva. 2006. Modeling of starch gelatinization during cooking of cassava (*Manihotesculenta Crantz*). *LWT*, 39:399-404.
- Blaszczak, W., S. Voalverde, J. Fornal, R. Amarowicz y K. Borkoski. 2003. Changes in the microstructure of wheat, corn and potato starch granules during extraction of non-starch compounds with sodium dodecyl sulfate and mercaptoethanol. *Carb. Polym.* 53:63-73.
- Ceballos, H., T. Sanchez, N. Morante, M. Fregene, D. Dufour, A. Smith, K. Denyer, J.C. Pérez, F. Calle y C. Mestres. 2007. Discovery of an Amylose-free Starch Mutant in Cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *J. Agric. Food Chem.* 55 (18): 7469-7476.
- Ceballos, H., T. Sanchez, K. Denyer; A.P. Tofiño; E. Rosero, D. Dufour, A.M. Smith, N. Morante, J.C. Pérez y F. Brendan. 2008. Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *J. Agric. Food Chem.* 56 (16): 7215-7222.
- Defloor, I., I. Dehin y J.A. Delcour. 1998. Physicochemical properties of cassava starch. *Starch/Stärke*. 50:58-64.
- Dhital, S. A.K. Shrestha y M.J. Gidley. 2010. Relationship between granule size and *in vitro* digestibility of maize and potato starches. *Carb. Polym.* 82 (2):480-488.
- Ellis, R.P., M.P. Cochrane. M.F.B. Dale., C.M. Duffus, A. Lynn, I.M. Morrison, R.D.M. Prentice, J.S. Swanston y S.A. Tiller. 1998. Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* 77(3):289-311.
- Fernandez, A., J. Wenham, D. Dufour y C.C. Wheatley. 1996. The influence of variety and processing on the physicochemical and functional properties of cassava starch and flour. p.263-269 En: Dufour, D. G. M. O'Brien, R. Best. (Eds.). *Cassava Flour and Starch: Progress in Research and Development*. First Edition. CIRAD/CIAT Publishing, Francia.
- González, Z. y E. Pérez. 2003. Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) pregelatinizados y calentados con microondas. *Acta Cient.Ven.* 54:127-137.
- Himmelsbach, D. S., F.E. Barton, II, A.M. McClung y E.T. Champagne. 2001. Protein and apparent amylose contents of milled rice by NIR-FT/Raman spectroscopy. *Cereal Chem.* 78:488-492.
- Huber, K.C. y J.N. BeMiller. 2000. Channels of maize and sorghum starch granules. *Carb. Polym.* 41: 269-276.
- Kasemsuwan, T., T. Baile y J. Jane. 1998. Preparation of clear noodles with mixtures of tapioca and high-amylose starches. *Carb. Polym.* 36(4):301-312.
- Koroteeva, D.A., V.I. Kiseleva, A.V. Krivandin, O.V. Shatalova, W. Blaszcak, E. Bertoft, K. Piyachomkwan y V.P. Yuryev. 2007. Structural and thermodynamic properties of rice starches with different genetic background. Part 2. Defectiveness of different supramolecular structures in starch granules. *Intern. J. Biol. Macromol.* 41:534-547.
- Lu, T.J., C.S. Duh, J.H. Lin y Y.H. Chang. 2008. Effect of granular characteristics on the viscoelastic properties of composites of amylose and waxy starches. *Food Hydrocol.* 22 (1):164-173.
- Marques, P.T., C. Pérégó, J.F. Le Meins, R. Borsali y V. Soldi. 2006. Study of gelatinization process and viscoelastic properties of cassava starch: Effect of sodium hydroxide and ethyleneglycol diacrylate as cross-linking agent. *Carb. Polym.* 66:396-407.
- Mazur, E., T. Schoch y F. Kite. 1957. Graphical analysis of the Brabender viscosity

- curves of the various starches. *Cereal Chem.* 34 (8):141-151.
- Merca F.E. y B.O. Juliano. 1981. Physicochemical properties of starch of intermediate-amylose and waxy rice differing in grain quality. *Starch/Stärke.* 33(8):253-260.
- Mestres C. 1996. Los estados físicos del almidón. p. 1-16. En: *Memorias de Conferencia Internacional. Almidón Propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricional. Usos.*
- Cyted/Proyecto. Precompetitivo XI.8. (Eds.). Instituto de Investigación Tecnológica de la Escuela Politécnica Nacional, Quito-Ecuador.
- Mestres, C., F. Matencio, B. Pons, M. Yajid y G. Fliedel. 1996. A rapid method for determination of amylase content by using differential scanning calorimetry. *Starch/Stärke.* 48(1):2-6.
- Moorthy, S.N. 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tubers starches: A review. *Starch/Stärke,* 54(12):5559-592.
- Moorty, S.N., H. Larsson y C.H. Eliasson. 2008. Rheological characteristics of different tropical root starches. *Starch/Stärke* 60:233-247.
- Nabeshima, E.H. y M.V.E Grossmann. 2001. Functional properties of pregelatinized and cross-linked cassava starch obtained by extrusion with sodium trimetaphosphate. *Carb. Polym.* 45:347-353.
- Nwokocho, L.M., N.A. Aviara, C. Sena y P.A. Williams. 2009. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carb. Polym.* 76(3):362-367.
- Paes, S., I. Yakemets y J. Mitchell. 2008. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocol.* 22: 788-797.
- Pérez, E. 2000. Determination of the correlation between amylose and phosphorous content and gelatinization profile of starches and flours obtained from edible tropical tubers using differential scanning calorimetry and atomic absorption spectroscopy. Master Thesis. Disponible en: <http://www.uwstout.edu/lib/thesis/2000/2000pereze.pdf>
- Pérez, E., W. Breene y Y. Bahanasey. 1998. Variation in the gelatinization profiles of cassava, sagu and arrowroot native starches as measured by different thermal and mechanical methods. *Starch/Stärke,* 50:70-72.
- Pérez, E., F. Schultz y E. Pacheco de Delahaye. 2005. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocasia esculenta* (taro). *Carb. Polym.* 60(2):139-145.
- Pérez Sira, E., O. Gibert, A. Sabate, Y. Jiménez, T. Sánchez, A. Giraldo, B. Pontoire, S. Guilois, M. C. Lahon, M. Reynes y D. Dufour. 2011. Physicochemical, functional and macromolecular properties of waxy yam starches discovered from seven genotypes of "Mapuey" (*Dioscorea trifida*) traditionally consumed in the Venezuelan Amazon. *J. Agric. Food Chem.* 59:263-273. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf100418r>.
- Puncha-arnon, S., W. Pathipanawat, C. Puttanlek, V. Rungsardthong y D. Uttapap. 2008. Effects of relative granule size and gelatinization temperature on paste and gel properties of starch blends. *Food Res. Intern.,* 41(5): 552-561.
- Radley J. 1976. Examination and analysis of starch products. Applied Sciences Publishers LTD, London.
- Singh, N., D. Chawla y J. Singh. 2007. Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starches. *Food Hydrocol.* 17:63 72.
- Sívoli, L., E. Pérez, P. Rodríguez y M.B. Raymúndez. 2005. Cambios en la estructura granular durante el proceso de modificación química (fosfatado-acetilado) del almidón de yuca analizados por microscopía óptica y electrónica. *Acta Microsc.* 14(1-2): 5-9.

- Sívoli, L, E. Pérez, P. Rodríguez, M.B. Raymúndez y C. Ayesta. 2009. Técnicas microscópicas y de dispersión de luz empleadas en la evaluación de la estructura del almidón de yuca (*Manihot esculenta* C). Acta Microsc. 18 (3):195-203. Disponible en: <http://actamicroscopica.ivic.ve/>.
- Smith, R. 1967. Characterization and analysis of starches. Vol. II, p. 607. En: Whistler RL, Paschall EF. (Eds.). Starch Chemistry and Technology. Academic Press, USA.
- Tester, R.F., X. Qi y J. Karkalas. 2006. Hydrolysis of native starch with amylases. Ani. Feed Sci. Technol. 130:39-54.
- Thitipraphunkul, K., D. Uttapap, K. Piyachomkwan y Y.A. Takeda. 2003. Comparative study of edible canna (*Canna edulis*) starch from different cultivars. Part II. Molecular structure of amylose and amylopectin. Carb. Polym. 54(1): 489-498.
- Whistler, R., J. BeMiller y E. Paschall. 1984. Starch, chemistry and technology. Second edition. Academic Press, Orlando, USA. pp.313-314.
- Zhu, T., D.S. Jackson, R.L. Wehlin y B. Geera. 2008. Comparison of amylase determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding Technique. Cereal Chem. 85(1):51-58.